



**VORLÄUFIGER ENDBERICHT DES BMLFUW FORSCHUNGSPROJEKTES 1244**

**„ABBAU VON TSE ERREGENDEN PRIONEN UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN;  
VALIDIERUNG DER PRIONEN-ANALYTIK IN EINER UNBEKANNTEN  
FAULSCHLAMMMATRIX UND PRIONEN-ABBAUVERSUCHE UNTER ANAEROBEN  
BEDINGUNGEN“**

**TULLN, NOVEMBER 2002**

**IFA-TULLN**

**AO.UNIV.-PROF. DI DR. RUDOLF BRAUN**

**DI ROLAND KIRCHMAYR**

**3430 TULLN, KONRAD LORENZ STRASSE 20**

**T: 02272 66280 502**

**F: 02272 66280 503**

**M: BRAUN@IFA-TULLN.AC.AT**

**WWW.IFA-TULLN.AC.AT**

## Inhalt

<b>A.</b>	<b>Conclusio</b> .....	<b>5</b>
A.1.	Kurzfassung der Ergebnisse .....	5
A.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	6
A.2.1.	Aufreinigungs- und Nachweisverfahren: .....	6
A.2.2.	Abbau von TSE erregenden Prionen .....	7
<b>A.3.</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
A.4.	Ausblick für weitere Forschungsaktivitäten .....	9
A.5.	Kontakte, Erfahrungsaustausch und Projektbegleitende Tätigkeiten, .....	9
A.6.	Tabellarische Zeitablauf des Projekts .....	11
<b>B.</b>	<b>Zusammenfassung der Experimente</b> .....	<b>12</b>
B.1.	Vorversuche und Optimierung 1 (IAH-Edinburgh; =Vorbericht) .....	12
B.2.	Optimierung 2 (AGES vet. med. Untersuchungen Mödling).....	13
B.2.1.	Allgemeines.....	13
B.2.2.	Grundzüge der Arbeitsprozedur zur Detektion von PrP <sup>Sc</sup> in Faulschlamm.....	14
B.2.3.	Verbesserung des Detergenseinflusses.....	16
B.2.3.1.	SDS und GuSCN.....	16
B.2.3.2.	Temperatur, Expositionsdauer und mechan. Eintrag .....	17
B.2.3.3.	Zentrifugation nach der Detergensextraktion .....	17
B.2.3.4.	Proteasehemmer (PMSF, AEBSF, Inhibitor-Mix) .....	18
B.2.4.	Optimierung PrP <sup>Sc</sup> Fällung.....	19
B.2.4.1.	Vergleich unterschiedlicher Schlammarten; Ethanol-fällung? .....	19
B.2.4.2.	BSA als Fällungsmittel .....	20
B.2.5.	Vergleich Verdaupufferkombination aus dem Prionics Check Western <sup>®</sup> Kit und Tris/HCl pH 7,4.....	21
B.3.	Optimierung 3 (L3 Sicherheitslabor AGES vet. med. Unters. Mödling).....	22
B.3.1.	Alterungseinflüsse .....	22
B.3.1.1.	Schlammqualität.....	22
B.3.1.2.	Alterung des Hirnhomogenats.....	23
B.3.2.	Lösung von PrP <sup>Sc</sup> .....	23
B.3.2.1.	Proteaseinhibitoren .....	23
B.3.2.2.	Aufbrechen von Zellwänden mit Glaskugeln .....	24
B.3.2.3.	Aufbrechen von Zellwänden mit Phospholipase D.....	24
B.3.3.	Verdau mit Proteinase K .....	25
B.3.3.1.	Proteinase K.....	25
B.3.3.2.	Verdautemperatur .....	26
B.3.3.3.	Verdaupuffer.....	26
B.3.3.4.	PK-Stopp: PMSF .....	27
B.3.4.	Ethanol-fällung .....	27
B.3.4.1.	Vergleich Gradientenzentrifugation und Ethanol-fällung .....	28
B.3.4.2.	Vergleich Ethanol-Methanol als PrP <sup>Sc</sup> Fällungsreagens.....	28
B.3.4.3.	BSA als Mitfällungsreagens .....	29
B.3.5.	Verbesserung der Auflösung.....	29

B.3.5.1. Fraktionierte Ethanol­fällung und Unterschiedliche Ethanol­konzentrationen .....	30
B.3.5.2. Verdünnung der Faulschlamm­matrix vor der Lauroylsarcosin­behandlung .....	31
B.3.5.3. Ethanol­fällung vor oder nach dem PK-Verdau .....	31
B.3.5.4. Waschen mit Ethanol .....	32
B.3.6. Div. Einflüsse und Optimierungen .....	32
B.3.6.1. Manipulationstemperatur .....	32
B.3.6.2. Resuspensionsvolumen .....	33
B.3.6.3. TBST oder Blockingpuffer für Antikörper 1 .....	33
B.3.6.4. Inkubationstemperatur für Antikörper 1 .....	33
B.3.7. Detektionslimits .....	34
B.3.7.1. Detektionslimit .....	35
B.3.7.2. Schlamm­pellet .....	36
B.4. Validierung 1 + Optimierung 4 .....	38
B.5. Validierung 2 .....	39
B.6. Abbauversuche .....	42
B.7. Hämosan .....	49
<b>C. Literatur .....</b>	<b>49</b>
<b>D. Adressen .....</b>	<b>51</b>
<b>E. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>52</b>

## ANHÄNGE

I	ZWISCHENBERICHT: VORVERSUCHE UND VERSUCHE AM IAH-E
II	ARBEITSPROTOKOLLE OPTIMIERUNG 2 (L2-LABOR)
III	ARBEITSPROTOKOLLE OPTIMIERUNG 3 (L3-LABOR)
IV	ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 1 UND OPTIMIERUNG 4 (L3-LABOR)
V	ARBEITSPROTOKOLLE VALIDIERUNG 2
VI	ARBEITSPROTOKOLLE ABBAUVERSUCHE

## **DANKE...**

- ... der AGES f. vet. med. Unters. Mödling unter HR Prof. W. Schuller, Dr. H. Schildorfer, und Dr. E. Vanek für die Ermöglichung der Versuche und der ganzen Belegschaft des BSE-Labors für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.
- ... der Fa. Hämosan Life Science Services unter Mag. H. Reichl für die Unterstützung bei der Partnersuche, die kritischen Gespräche und den experimentellen Beitrag.
- ... dem Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit in Edinburgh insbesondere Dr. R. Somerville, Dr. J. Rodger, K. Fernie, F. McDonald, P. Steele und S. Hamilton für die Ermöglichung und Begleitung der ersten Versuche und einem beträchtlichen Beitrag an Know-How.
- ... Herrn Dr. K. Klein, Roche Diagnostics, für die Einladung zum BSE-Symposium in Zürich und für die kritischen Gesprächesbeiträge.
- ... der OÖ.TKV Ges.m.b.H unter Dr. F. Baumann für die Freistellung zur Projektbearbeitung und der Finanzierung des Gedankenaustausches.
- ... dem BMLFUW insb. Herrn Dr. S. Vetter nicht nur für die Finanzierung des Projektes, sondern auch für die Unterstützung und kulante Abwicklung.
- ... der Fa. Mediscan in Seibersdorf für die unkomplizierte und kostenlose Abwicklung der Gammabestrahlung des Faulschlammes.

## A. CONCLUSIO

### A.1. KURZFASSUNG DER ERGEBNISSE

In diesem Projekt sollte überprüft werden ob BSE erregende Prionen in anaerobem Faulschlamm wiederfindbar sind und ob ein Abbau derselben unter anaeroben Bedingungen stattfindet.

Das Ergebnis in Kurzform bedeutet, dass eine Wiederfindung von Prionprotein in Faulschlamm möglich ist und in beschränktem Ausmaß ein Abbauverhalten beobachtet werden konnte.

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit in Edinburgh in den L2 und L3-Labors der AGES, vet.med. Untersuchungen Mödling durchgeführt.

Als Basis für ein Nachweisverfahren von Prionen (in Folge PrP<sup>SC</sup>, Prionprotein Scrapie-Form, genannt) wurde der als Testkit erhältliche, für Routinescreening von BSE in Österreich angewandte Prionics-Check Western<sup>®</sup> (Prionics AG, Zürich) gewählt. Dieses auf einer SDS-PAGE und Western-Blot beruhende Verfahren musste modifiziert werden, da es in der Testkit-Version nur zum Nachweis von Prionprotein in Stammhirnmatrix geeignet ist.

PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm kann durch eine Spülmittelbehandlung (Lauroylsarcosin 0,5% w/v) unter starkem Schütteln so gut in Lösung gebracht werden, dass eine nachfolgende Zentrifugation alle anderen suspendierten Bestandteile des Faulschlammes in ein Pellet konzentriert und durch eine Dekantierung entfernt werden können.

Die Aufkonzentrierung des PrP<sup>SC</sup> aus dem Überstand kann durch eine nachfolgende Tief-temperatur-Ethanol-fällung (Mitfällung mit BSA, Fraktion V) durchgeführt werden.

Die weiteren Analysenschritte entsprechen im Prinzip dem Prionics-Check Western<sup>®</sup>, wengleich nur die Antikörper aus dem Testkit verwendet wurden. Die Diskriminierung zwischen physiologischem, nicht-pathologischem Prionprotein und der pathologischen Form PrP<sup>SC</sup> erfolgt durch einen Proteinase K-Verdau. Das Hydrolysat wird dann mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und fixiert. Die Detektion erfolgt dann durch die Anlagerung eines primären Antikörpers (6H4, Prionics, erkennt eine Prionproteinsequenz) und der Anlagerung eines sekundären enzymgekoppelten Antikörpers (gegen den ersten Antikörper), dessen Enzym (alkalische Phosphatase) mit einem geeigneten Substrat eine Lichtreaktion verursacht, die mittels Schwärzung eines sensiblen Röntgenfilms ausgewertet werden kann.

Dieses Verfahren liefert jedoch nur einen qualitativen Nachweis auf das Prionprotein PrP<sup>SC</sup>. Durch Verdünnungsreihen kann die Bestimmungsgrenze ungefähr erfasst werden. Einige Einflussfaktoren, die die Intensität des Signals beeinflussen, können jedoch nicht standardisiert werden: Antikörper- und Enzymaktivitäten werden von den Herstellern mit einem Unsicherheitsfaktor von  $\pm 40\%$  angegeben; Umgebungstemperaturen, Entwicklerlösungen, etc..

Eine Ermittlung und statistische Absicherung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen wurde nicht durchgeführt, da die ermittelten Werte nur auf die Bedingungen des einen Labors und auf die verwendeten Chemikalienchargen zutreffend gewesen wären. Eine Übertragbarkeit auf andere Laborbedingungen und Schlammarten wäre nicht gegeben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das oben kurz beschriebene Verfahren entwickelt, in den einzelnen Arbeitsschritten auf Alternativen überprüft und optimiert.

Die nachfolgenden Validierungsexperimente konnten in vierfacher Wiederholung beweisen, dass das Prionprotein PrP<sup>SC</sup> aus unterschiedlicher Quelle (Homogenate aus folgenden TSE infizierten Hirnmaterialien: 22A/SV: in Maus passiertes Scrapie; 301V/VM: in Maus passiertes BSE und BSE in Rind) in unterschiedlichen Schlammqualitäten (mesophiler und thermophiler Schlamm bzw. Wasser) mit ausreichender Sicherheit wiedergefunden werden konnte.

Ein Vergleich der Nachweisbarkeit von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm mit dem Platelia<sup>®</sup> Test von BioRad und dem von Hämosan entwickelten Verfahren bestätigen, dass PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm tatsächlich wiedergefunden werden kann.

Die Inkubationsversuche im Kleinstmaßstab führten zum Schluss, dass ein Abbau von TSE erregenden Prionen in höherer Umsatzrate nur unter thermophilen Bedingungen (55°C) stattfinden wird. Unter mesophilen Bedingungen (35°C) konnte innerhalb einer Inkubationsdauer von 380 Stunden im Gegensatz zu thermophiler Temperatur kein Abbau nachvollzogen werden.

In dampfsterilisiertem und mit Natriumazid inhibiertem Faulschlamm konnte im Gegensatz zur Inkubation mit Wasser und aktivem Faulschlamm nach sehr kurzer Zeit kein PrP<sup>SC</sup> mehr nachgewiesen werden. Die Gründe für dieses unerwartete Resultat konnten im Rahmen dieses Projektes nicht verifiziert werden.

## **A.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE**

### **A.2.1. AUFREINIGUNGS- UND NACHWEISVERFAHREN:**

Das im Rahmen dieses Projektes entwickelte Aufreinigungs- und Nachweisverfahren für Prionproteine in Faulschlamm beruht auf einer Detergensbehandlung und einem nachfolgenden qualitativen Nachweis auf PrP<sup>SC</sup>.

Einer der Schlüsselschritte in diesem Verfahren ist die Detergensbehandlung. Extraktionen beruhen auf dem Nernst'schen Verteilungsgesetz und sind daher von der zur Verfügung stehenden Oberfläche abhängig. Ein auf eine Schlammqualität optimiertes Verfahren wird aus anderen Schlammarten (mit unterschiedlichen Feststoffanteilen und Ladungsverteilungen der entsprechenden Feststoffe) zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Weiters ist zu beachten, dass in diesen Versuchen nur das Hirnmaterial von Tieren mit klinischen TSE Anzeichen verwendet wurde. Es war nicht bekannt, wie hoch der jeweilige Gehalt an infektiösen Einheiten bezogen auf die Hirnfrischmasse ist. Dies hätte nur über eine

Titration über Tierversuche durchgeführt werden können, die den Rahmen dieses Projektes zeitlich und finanziell gesprengt hätte. Die Angaben sind daher immer nur auf Hirn-Frischmasse bezogen. Unterschiedliche Hirnmaterialien sind daher miteinander nur sehr bedingt vergleichbar.

Die in ein Prionproteinaufreinigungs- und Analysenverfahren gestellten Anforderungen um dieses Projekt durchzuführen, konnten mit dem entwickelten Verfahren in ausreichendem Maße erfüllt werden. Für eine Extrapolation auf andere Bedingungen ist mit den hier erworbenen Erfahrungen jedoch Vorsicht geboten.

Dieses hier entwickelte Verfahren ist nur bedingt ohne entsprechende Adaptierung und Überprüfung (neuerliche Validierungsversuche) zum generellen Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm anwendbar.

Aus der sich in diesen Versuchen abzeichnenden für analytische Zwecke sehr hohen Bestimmungsgrenze und dem oben genannten ist anzumerken, daß sich dieses Verfahren daher nicht als „*Post-Treatment-Monitoring*“-Verfahren eignet.

Es kann mit diesem Analysenverfahren weder am Reaktorinhalt noch am Fermentationsendprodukt überprüft werden, ob in einen Anaerobreaktor (Biogasanlage) unbeabsichtigt TSE-kontaminiertes Material gelangt ist, da durch den Verdünnungseffekt die Bestimmungsgrenze dieses Verfahrens wahrscheinlich unterschritten wird. Ausgehend von einer das infektiöse Agens enthaltenen Hirnmenge von 100 g je BSE-Rind von 500 kg, würde in einem Homogenat desselben Rindes die Konzentration des Prionproteins gerade in der Größenordnung der theoretischen Bestimmungsgrenze von ca. 100 mg/l Hirn im Homogenisat liegen. Weiters vorausgesetzt, dass die Prionproteinkonzentration in jenem Rinderhirn der Konzentration von PrP<sup>SC</sup> in den hier eingesetzten Maushirnen entspricht.

#### **A.2.2. ABBAU VON TSE ERREGENDEN PRIONEN**

Eine Reduktion des PrP<sup>SC</sup>-Titers während der Inkubation mit Faulschlamm konnte in beschränktem Ausmaß festgestellt werden. Die zu einem besseren Abbau nötigen Bedingungen konnten im Rahmen dieses Projektes nicht beleuchtet werden und geben daher die Basis für weitere Forschungsaktivitäten.

Es ist zu bedenken, dass in diesem Projekt nur das Verhalten des Prionproteins beobachtet wurde. TSE-Infektiosität und das „pathologische Prionprotein“ PrP<sup>SC</sup> treten in den meisten Fällen gemeinsam auf. Es gibt jedoch noch keinen eindeutigen Beweis, dass TSE-Infektiosität immer in Form dieser Proteinkonformation auftritt. Eine Beobachtung der „TSE-Infektiosität“ unter anaeroben Bedingungen über Bio-Assays sollte daher Inhalt weiterer Forschung sein.

Allgemein wird für Sterilisationen und Dekontaminationen im Fermentations- und Lebensmittelsektor eine Reduktion des Pathogentiters um den Faktor 10<sup>6</sup> gefordert. Untersuchungen der TSE-Infektiosität während des TKV-Prozesses (D. Taylor) haben ergeben,

dass bei einer Sterilisation nach der europäischen Tierkörperverwertungsgesetzgebung (133°C/3bar/20min) mit einer Reduktion des TSE-Titers um den Faktor  $10^3$  zu rechnen ist.

Eine Kombination von Sterilisation und nachfolgender anaerober Verwertung würde nur von technischer Bedeutung sein, wenn mit der zweiten Stufe auch eine gesicherte Reduktion um den Faktor  $10^3$  nachgewiesen werden könnte. Aus den hier vorliegenden Versuchsergebnissen kann dies nicht abgeleitet werden. Die in den hier vorliegenden Versuchen festgestellte Reduktion des PrP<sup>SC</sup>-Titers lag etwa bei  $10^1$  -  $10^{1,5}$ .

Eine Risikobewertung von Überschussschlamm aus der Abwasserbehandlung von TSE-Produkte verarbeitenden Betrieben (Schlachthöfe) von Gale und Stanfield hat ergeben, dass der Schlüsselpunkt der Reduktion der BSE-Übertragung über auf Grünland ausgebrachtem Überschussschlamm in der primären Entfernung des Risikomaterials besteht. In dieser Studie wurde das Risiko der Übertragung von BSE unter der Annahme der BSE-Kennzahlen aus Großbritannien über Klärschlamm auf Weideflächen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich theoretisch nur eine sehr geringe Zahl an BSE-Fällen auf Klärschlamm zurückführen lassen.

Eine umfassende Risikobewertung für österreichische Bedingungen kann aus derzeitiger Sicht entsprechend entfallen.

### **A.3. ABSTRACT**

Most of the scientific work in the field of TSE is focussed on the clinical appearance of spongiform encephalopathies. The environmental impact of the BSE-crisis in Europe is not investigated and understood at all. Here, a method for the detection of TSE-causing prions in anaerobic sludge was developed. The principal steps in this extraction-procedure are a treatment with a detergens followed by a centrifugation and subsequently an ethanol precipitation. The final detection is carried out by western-blotting. The used antibodies are identically with the antibodies used in the Prionics-Check Western<sup>®</sup> (Prionics AG, Zurich, Switzerland).

Finally, the degradation of TSE causing prions under anaerobic conditions was experimented. Under mesophilic (35°C) conditions there was no reduction of the PrP<sup>SC</sup>-titre detected. The reduction of PrP<sup>SC</sup> under thermophilic conditions was about 1 to 1.5 orders of magnitude within 200 to 250 hours. However, in sterilized and with azide inhibited sludge the time until no PrP<sup>SC</sup> was detected was significantly below the time the same effect was achieved by the incubation with active anaerobic sludge or water. Further research has to be done to understand this results completely.

Because of the insensitivity of the western-blot assay, the developed method will not be able to detect prion-protein (introduced accidentally) in the effluent of sewage treatment plants and the effluent of anaerobic reactors.



#### **A.4. AUSBLICK FÜR WEITERE FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN**

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass einerseits der Nachweis von Prionprotein in Faulschlamm möglich ist und andererseits ein gewisses Abbauverhalten beobachtet wurde. Im Rahmen dieses Projektes konnte jedoch kein Modell entwickelt werden, das es erlaubt diese Versuche mit geringerem Hirnhomogenataufwand in größeren Reaktormaßstäben durchzuführen. Dies würde zu einer Realitätsannäherung der Versuche und Versuchsbedingungen führen.

Es besteht bezüglich des Abbaues von Prionen oder der Reduktion des BSE-Erregers unter anaeroben Bedingungen daher noch weiterer Forschungsbedarf, da die erzielten Ergebnisse ohne weitere Forschung nicht eindeutig interpretiert werden können.

Eine Optimierung und Erforschung der Abbaubedingungen der BSE-Infektiosität mittels Bio-Assay sollte in weiterer Folge durchgeführt werden.

In Österreich besteht keine weitere Arbeitsgruppe, die sich dieser Thematik widmet. International sind 2 Arbeitsgruppen, von denen eine Kontaktaufnahme ausging und eine Kooperationsbereitschaft signalisiert wurde, herauszuheben:

- Technischen Universität Dänemark unter Prof. Birgitte Ahring
- Institut für Tierhygiene der Universität Hohenheim unter Prof. Reinhard Böhm

Am bereits an diesem Projekt beteiligten Institute for Animal Health in Edinburgh wird ein Projekt zum Abbauverhalten des BSE-Erregers im Boden bereits seit 2 Jahren durchgeführt.

Wie am Arbeitsaufkommen an diesem Projekt abzusehen ist, wäre es wünschenswert, wenn weitere Forschungsaktivitäten auf internationale Kooperation aufgebaut, koordiniert und durchgeführt würden.

#### **A.5. KONTAKTE, ERFAHRUNGSUSTAUSCH UND PROJEKTBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN,**

Der erste Kontakt mit einer essenziellen ersten Beratung zum Thema Prionenanalytik konnte mit der Fa. Hämosan geknüpft werden. Dieser Kontakt konnte über den ganzen Projektzeitraum aufrechterhalten werden und bot immer wieder die Möglichkeit zur reflektiven und kritischen Auseinandersetzung. Um einen Überblick über die Prionenanalytik und BSE-Problematik im Tierkörperverwertungsbereich zu bekommen, wurde im November 2001 ein von der Oberösterreichischen Tierkörperverwertungsgesellschaft finanzierter Gedankenaustausch u.a. mit Dr. Radulf Oberthür und Dr. Rainer Söller organisiert (siehe Anhang I).

Die ersten Experimente zum Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm konnten im Labor des Institute for Animal Health in Edinburgh durchgeführt werden. Der Arbeitsgruppenleiter Dr. Robert Somerville stand auch für eine Beratung und kritische Durchsicht der Zwischenergebnisse im Juni 2002 zur Verfügung.

Dr. Hermann Schildorfer ermöglichte, das der Großteil der Versuche in den L2 und L3-Labors der AGES vet. med. Unters. in Mödling durchgeführt werden konnte.

Ähnliche Projektideen und Pläne wie sie in diesem Projekt ausgeführt wurden, werden auch von Prof. Birgitte Ahring von der TU Dänemark und von Prof. Reinhard Böhm (Institut für Hygiene der Universität Stuttgart-Hohenheim) verfolgt. Von beiden Gruppen wurde eine Kontaktaufnahme angestrengt und von unserer Seite eine Erfahrungs- und Wissensweitergabe vereinbart.

Erfahrungen und Teilergebnisse aus diesem Projekt konnten in einem Vortrag im Rahmen eines am IFA-Tulln veranstalteten Workshops (Impacts of Waste Management Legislation on Biogastechnology; 12-14. Sept. 2002) einem internationalen Publikum präsentiert werden.

Folgende Seminare und Workshops wurden während der Projektlaufzeit besucht:

- Symposium BSE-Analytik, BioRad, Edinburgh (5. Oktober 2001)
- Gedankenaustausch Wien (13. November 2001)
- ASAC-Minisympodium QS in der Bioanalytik, BOKU-Wien (16. November 2001)
- Symposium BSE-Analytik Anlässlich der Eröffnung des neuen Firmengebäudes von Prionics AG in Zürich (14. Juni 2002)
- Internat. Workshop: Impacts of Waste Management Legislation on Biogas Technology, IFA-Tulln (12. - 14. September 2002)

## A.6. TABELLARISCHE ZEITABLAUF DES PROJEKTS

22. März 2001	Einreichung des Projektes beim BMLFUW und BMSG
26. - 28. März 2001	Symposium „TSE“ der Arbeitsgruppe Downstreamprocessing in Cambridge, UK; DI Kirchmayr
06.-08. April 2001	Projektbesprechung in Edinburgh: Dr. Somerville, Dr. Rodger, Mag. Reichl, Prof. Braun, DI Kirchmayr
04. - 05. Mai 2001	BSE- Wahnsinn und Wirklichkeit, Leopoldina-Symposium VMU-Wien
25. Mai 2001	Unterzeichnung des Projektantrages
Juni - September 2001	Vorbereitungen und Erste Versuche in der AGES-Mödling, Proteaseaktivität, Vorbereitungen für die Versuche in Edinburgh (Importgenehmigung und Veterinärzeugnisse für Faulschlamm, Gammabestrahlung des Faulschlammes etc.)
24. Sept. - 11. Oktober 2001	Versuche in Edinburgh IAH-E; DI Kirchmayr
5. Oktober 2001	Symposium BSE-Analytik, BioRad, Edinburgh
13. November 2001	Gedankenaustausch Wien
16. November 2001	ASAC-Minisympodium QS in der Bioanalytik, BOKU-Wien
21. November 2001	Fortschrittsbericht
Oktober 2001 - Februar 2002	Vorbereitungen für die Versuche in Mödling: Organisation und Programmausarbeitung, Importgenehmigung für das Prionenrohmaterial aus Schottland
12. Februar - 08. April 2002	Optimierung im L2-Labor
10. April bis 18. Juli 2002	Optimierung im L3-Labor
14. Juni 2002	Symposium BSE-Analytik Anlässlich der Eröffnung des neuen Firmengebäudes von Prionics AG in Zürich
20. - 24. Juni 2002	Diskussion der Zwischenergebnisse in Edinburgh: Dr. Somerville, Dr. Rodger, DI Kirchmayr
18. - 31. Juli 2002	Validierungsversuche 1
02. - 07. August 2002	Validierungsversuche 2
07. August - 30. Oktober 2002	Abbauversuche
12. - 14. September 2002	Internat. Workshop: Impacts of Waste Management Legislation on Biogas Technology, IFA-Tulln
01. - 22. November 2002	Endbericht

## **B. ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTE**

### **ALLGEMEINES**

Dieser Endbericht stellt eine Zusammenfassung der Versuche zur Detektion und Abbau von BSE erregenden Prionen in anaerobem Faulschlamm dar. Die einzelnen Versuche können durch die im Anhang aufgelisteten Arbeitsprotokolle nachvollzogen werden und werden im Detail nicht angeführt.

### **B.1. VORVERSUCHE UND OPTIMIERUNG 1 (IAH-EDINBURGH; =VORBERICHT)**

Dieser Abschnitt wurde im Zwischenbericht bereits veröffentlicht und ist im Anhang I zu finden.

Eine Überprüfung der direkten Anwendbarkeit des Prionics Check Western<sup>®</sup> ergab die Notwendigkeit den kommerziell erhältlichen Testkit zu adaptieren. Eine direkte Anwendung zum Nachweis von Prionprotein in Faulschlamm war wegen der störenden Feststoffbestandteile des Faulschlammes und der rechnerisch ungenügenden Bestimmungsgrenze nicht möglich.

Die im Labor des IAH-E durchgeführten Versuche kamen zum Ergebnis, dass das Prionprotein in Faulschlamm durch Zugabe eines Detergens, nachfolgender Zentrifugation und Ethanolfällung nachweisbar ist. Eine bessere Detektierbarkeit ergab sich in vorsterilisiertem Faulschlamm. Eine Temperaturbehandlung der Faulschlamm-Hirnhomogenatmischung führte trotz der Verwendung eines nachweislich temperaturstabilen PrP<sup>SC</sup>-Stammes zu keinem PrP<sup>SC</sup> Nachweis.

Die Bestimmung der Proteolytischen Aktivität sollte als Indikator und Anhaltspunkt für den Abbau von Prionproteinen dienen. Der Assay wurde mit Azocasein und Azoalbumin als Substrat ausgeführt. Die festgestellte Aktivität betrug im Vergleich zu der Proteinase K (eine der stärksten Serinproteasen) zu einem Wert von  $1,0 \cdot 10^{-3}$  -  $3,5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml PK. Im Vergleich dazu wird bei der Diskriminierung zwischen physiologischem und pathologischem Prionprotein im Prionics-Test eine Proteinase K-Konzentration von 50 µg/ml während einer halben Stunde angewandt. Einen Rückschluss auf die proteolytische Aktivität in Bezug auf das Prionprotein lässt sich damit nur bedingt machen.

## **B.2. OPTIMIERUNG 2 (AGES VET. MED. UNTERSUCHUNGEN MÖDLING)**

Die in diesem Kapitel erwähnten Arbeitsprotokolle sind im Anhang II zu finden.

### **B.2.1. ALLGEMEINES**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden im L2-Labor für BSE-Routineanalytik in der AGES für vet. med. Untersuchungen in Mödling durchgeführt. Das notwendige Prionenmaterial (Hirngewebe von mit TSE-Agenzien infizierten Mäusen; die selben Agenzien wurden auch in den Vorversuchen im Labor der IAH-E verwendet) wurde dankenswerterweise von der IAH-E für weitere Versuche in Österreich zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Importgenehmigungen wurden vom BMSG ausgestellt.

Die im Kapitel A beschriebenen Versuche und die daraus resultierende Arbeitsprozedur zur Detektion von PrP<sup>SC</sup> sollten mit den neuen Arbeitsbedingungen in Österreich verifiziert werden. Es standen im IAH-Edinburgh andere Arbeitsgeräte und Reagenzien zur Verfügung. In Edinburgh wurden keine Antikörper der Fa. Prionics verwendet. Die Detektion der Anwesenheit von PrP<sup>SC</sup> indizierenden Lichtblitzes erfolgte in Edinburgh mittels Digitalkamera, was eine Überwachung der Exposition ermöglicht. Im Prionics-Check Western<sup>®</sup> wird der Lichtblitz durch eine andere Kette von Antikörper - Enzym - Substrat erzeugt und mittels Belichtung eines Röntgenfilmes gemessen. Dies ist zweifelsfrei die fälschungssichere Variante, jedoch für Forschungszwecke nur bedingt von Vorteil. Im BSE-Routinelabor (L2) in Mödling standen im Gegensatz zum IAH-Edinburgh und dem L3 Sicherheitslabor (in dem die Versuche mit BSE durchgeführt wurden; Kapitel A) Titerplatten mit Klebeverschluss mit den entsprechenden Heizblöcken anstatt einzelnen Eppendorfgefäßen zur Verfügung (womit das zeitaufwendige Öffnen und Verschließen der einzelnen Röhrchen z.T. wegfiel).

Der in den vorgehenden Versuchen verwendete Faulschlamm war  $\gamma$ -bestrahlt bzw. sterilisiert, um die im Gebäude des IAH-E befindlichen sterilen Mauskulturen nicht zu gefährden. Für die Abbauversuche ist jedoch der Einsatz von aktiver Biomasse (Faulschlamm) nötig.

In diesem Kapitel wurde Hirnhomogenat von mit Scrapie infizierten Mäusen (22A/SV) als PrP<sup>SC</sup>-Quelle verwendet.

Die Erarbeitung bzw. Optimierung eines Nachweisverfahrens entspricht einer Iteration. Verbesserungen von nachfolgenden Arbeitsschritten können die Ergebnisse der Optimierung von vorgehenden Arbeitsschritten wieder relativieren. Daher erscheint die Abfolge der Experimente auf den ersten Blick unchronologisch. In der folgenden Zusammenfassung der Ergebnisse werden nur die übergeordneten Ziele und die entsprechenden Antworten in konzentrierter Form beschrieben. Die entsprechenden Experimente sind in den Arbeitsprotokollen detailliert beschrieben.

## B.2.2. GRUNDZÜGE DER ARBEITSPROZEDUR ZUR DETEKTION VON PrP<sup>SC</sup> IN FAULSCHLAMM

Der Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm gliedert sich in vier prinzipielle Verfahrensgruppen:

1. Detergensextraktion (Schritte 1 - 4)
2. Ethanolfällung (Schritte 5 - 7)
3. PK-Verdau (Schritte 8, 9)
4. Western Blot (Schritte 10 - 15)

Die Verfahrensgruppen 1 und 2 wurden zum Nachweis von PrP<sup>SC</sup> aus der Faulschlamm-matrix im Rahmen dieses Projekts entwickelt.

Der direkte Nachweis von PrP<sup>SC</sup> aus Faulschlamm ohne vorherige Aufreinigung führt zu einer sehr schlechten Wiederfindungsrate bzw. hohen Detektionsgrenze. Durch die Einwirkung eines Detergens (Lauroylsarcosin, welches auch im Homogenisierungspuffer bzw. Verdauopuffer des OIE Standardprotokolls zur PrP<sup>SC</sup> Analyse vorkommt) wird PrP<sup>SC</sup> aus der Hirnhomogenat - Faulschlamm-mischung von den Faulschlamm-partikeln gelöst und bei der folgenden Zentrifugation in Schwebelage gehalten. Dadurch kann der Großteil der Störstoffe aus dem Faulschlamm entfernt werden. Durch eine nachfolgende Ethanolfällung bei tiefen Temperaturen (-17°C) werden weitere Alkohollösliche Faulschlammbestandteile entfernt und PrP<sup>SC</sup> um den Faktor 5 aufkonzentriert.

Die darauf folgenden Verfahrensgruppen 3 und 4 entsprechen dem Prion-Protein-Nachweis, wie er im OIE-Western Blot (Standardmethode zum PrP<sup>SC</sup> Nachweis) und auch dem kommerziell erhältlichen Prionics-Check Western angewandt wird. Ab dem Verfahrensschritt 11 wurden in den hier beschriebenen Versuchen auch die Chemikalien aus dem Testkit Prionics Check Western<sup>®</sup> (Prionics AG, Zürich) verwendet.

Um die gesamte Aufreinigung im Eppendorf-Reaktionsgefäß Maßstab (1,8 - 2,0 ml) durchführen zu können, beträgt die maximal aufreinigbare Probenmenge 500 µl (Faulschlammprobe, mit Hirnhomogenat versetzt). Dadurch ist es möglich für alle in dem Verfahren nötigen Zentrifugationsschritte die selbe Zentrifuge bzw. den selben Rotor zu verwenden.

Die detaillierte Beschreibung der Arbeitsschritte ist in den jeweiligen Arbeitsprotokollen angeführt.

<b>SCHRITT</b>	
<b>1</b>	∇ Probe: 500 µl
<b>2</b>	9 Zugabe von Lauroylsarcosin (Detergens)
<b>3</b>	9 Exposition (Schütteln, Vortexen)
<b>4</b>	9 Zentrifugation zur Entfernung der festen Bestandteile aus dem Faulschlamm
	Pellet 8 ∇ Überstand:
<b>5</b>	9 Zugabe von BSA Fraktion V (als Fällungsmittel)
<b>6</b>	9 Ethanolfällung bei tiefen Temperaturen (-17°C)
<b>7</b>	9 Zentrifugation
	Überstand 8 ∇ Pellet:
<b>8</b>	9 Resuspension im Verdauopuffer
<b>9</b>	9 PK-Verdau um PrP zu zerstören und von PrP <sup>SC</sup> zu unterscheiden
<b>10</b>	9 Denaturierung
<b>11</b>	9 Gel-Elektrophorese
<b>12</b>	9 Blot auf Membran
<b>13</b>	9 Antikörper 1 (Anti PrP-Antikörper 6H4; Prionics)
<b>14</b>	9 Antikörper 2 (Antimaus Antikörper)
<b>15</b>	9 Röntgenfilmbelichtung

Abbildung 1: Grundzüge der Arbeitsprozedur zur Detektion von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm

### B.2.3. VERBESSERUNG DES DETERGENSEINFLUSSES

Wie die Versuche am IAH-E ergeben haben, wird PrP<sup>SC</sup> stark an die Biomasse adsorbiert. Das hier gewählte Verfahren der Trennung von PrP<sup>SC</sup> von der Biomasse und die entsprechende bessere Detektierbarkeit hängt stark davon ab, ob PrP<sup>SC</sup> abgelöst bzw. bei der nachfolgenden Zentrifugation (Schritt 4, Kap.B.2.2) das Prionprotein in Schwebelage gehalten werden kann. Im Verdauerpuffer (Schritt 9, Kap.B.2.2) ist Lauroylsarcosin enthalten. Dieses Detergens wurde daher auch für die Spülmittelextraktion gewählt, da es entsprechend keinen oder geringen Einfluss auf das Protein hat. Die Zugabe von Lauroylsarcosin wird daher als Basis angesehen. Im Folgenden werden Maßnahmen überprüft, die zusätzlich die Detektierbarkeit von PrP<sup>SC</sup> verbessern könnten.

#### B.2.3.1. SDS UND GUSCN

Zur Verbesserung der Detergenswirkung wurde zusätzlich zu 0,5 % w/v Lauroylsarcosin der Zusatz von SDS (Natriumlaurylsulfat; wirkt leicht denaturierend, sättigt Ladungen der Aminosäuren ab) und GuSCN (Guanidinthiocyanat; wirkt leicht denaturierend, chaotropes Reagens) überprüft. Die Resultate sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die ersten Versuche wurden wegen der besseren Detektierbarkeit von PrP<sup>SC</sup> mit sterilisierter Biomasse und einer Expositionsdauer von 5-10 min. durchgeführt.

Tabelle 1: Einfluss von SDS und GuSCN auf die Detektion von PrP<sup>SC</sup>.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020212 sterilisierte BM	SDS 0,1-0,4% (w/v)	nicht signifikant	5 min.
020214 sterilisierte BM	SDS 0,1% (w/v) GuSCN 0,1% (w/v) GuSCN+SDS	? ? ?	5 min.; zu hohe PrP <sup>SC</sup> Konz. um den Einfluss festzustellen
020228 sterilisierte BM	SDS 0,1% (w/v) GuSCN 0,1% (w/v) GuSCN+SDS	nicht signifikant nicht signifikant nicht signifikant	5 min.
020321 nicht sterile BM	SDS 0,1% und 0,2% GuSCN 0,1% und 0,2%	nicht signifikant 0,2%: ja	breitere Banden
020326 nicht sterile BM	GuSCN 0,2% und 0,5%	?	5 min.; zu starke Adsorption?
020327 nicht sterile BM	GuSCN 0,2% (w/v)	nicht signifikant	+ 30 min Vortexen
020403 nicht sterile BM	GuSCN 0,2% (w/v)	Verschlechterung	verschmierte Banden



Weder der Einsatz von SDS noch von GuSCN konnte die Detektierbarkeit verbessern. Zu hohe Konzentrationen an SDS und GuSCN können jedoch das PrP<sup>SC</sup> zu stark denaturieren und es so beim Enzymverdau durch die Proteinase K wie PrP zerstört werden. Daher wurden nur Konzentrationen von SDS und GuSCN bis zu 0,2 % w/v angewandt.

Eine deutliche Verbesserung wurde durch 30 minütiges Vortexen unter Lauroylsarcosineinfluss erzielt (siehe Kapitel B.2.4.2).

### B.2.3.2. TEMPERATUR, EXPOSITIONSDAUER UND MECHAN. EINTRAG

Die Detergensextraktion von PrP<sup>SC</sup> durch Lauroylsarcosin kann durch mehrmaliges vortexen oder schütteln am Vortexschüttler (ca. 1000 rpm) während einer Zeit von 30 Minuten im Vergleich zu einer Exposition von 10 min. ohne Schütteln bedeutend verbessert werden. Die Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur (20-23°C) während der Extraktion auf 37°C hat keinen (oder geringen) Einfluss (siehe Tabelle 2).

***Die Exposition des Hirnhomogenat-Faulschlamm-Gemisches mit 0,5 % (w/v) Lauroylsarcosin unter starkem Schütteln während 30 min. bei Raumtemperatur ist einer der Schlüsselpunkte zur Detektion von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm.***

Tabelle 2: Einfluss von Temperatur, Expositionsdauer und mechan. Eintrag (Vortexen)

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020304 sterile BM	Temp: 20°C (Raumtemp.)	nicht signifikant	kein Vortexen; Referenz
	Temp. 0°C		kein Vortexen
	Temp. 37°C		kein Vortexen
	Expositionsdauer: 7 min.	nicht signifikant	kein Vortexen; Referenz
	Expositionsdauer: 17 min.		kein Vortexen
Expositionsdauer: 37 min.	nicht signifikant	kein Vortexen	
020321 nicht sterile BM	<b>30 min. expos./ 4x vortexen</b> Temp. 23 und 37°C	37°C: nicht sign.	Insgesamt verbesserter Nachweis
020327	sequentielles Vortexen 30 min. Vortexschüttler	kein Unterschied	

### B.2.3.3. ZENTRIFUGATION NACH DER DETERGENSEXTRAKTION

Eine Aufkonzentrierung von PrP<sup>SC</sup> zur Verbesserung der Nachweisgrenze ist nur möglich, wenn die Feststoffe im Faulschlamm von PrP<sup>SC</sup> getrennt werden können. Durch den Einsatz eines Detergens (siehe vorgehende Kapitel) sollte PrP<sup>SC</sup> in Lösung gehalten werden und die restlichen Feststoffe durch Zentrifugation entfernt werden (siehe Schritt 4, Kapitel B.2.2).

Bei einer Zentrifugation von 3 - 5 Minuten kann bei größtmöglicher PrP<sup>SC</sup>-Ausbeute auch der größte Störstoffanteil entfernt werden.

Tabelle 3 Einfluss der Zentrifugationsdauer

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020307	1 min	+ / -	
	2 min	+ / -	
	3 min	+	
	5 min	+	
	7 min	+ / -	
	10 min	+ / -	

#### B.2.3.4. PROTEASEHEMMER (PMSF, AEBSF, INHIBITOR-MIX)

Die Ursache der unterschiedliche Nachweisbarkeit von PrP<sup>SC</sup> in nativem und sterilisiertem Faulschlamm könnte ein partiellen Abbau während der Lauroylsarcosinbehandlung sein. Um diese Hypothese zu verifizieren wurde der Einsatz von handelsüblichen Proteasehemmern überprüft. Der Proteasehemmer sollte im folgenden Ethanol-fällungsschritt mit dem Alkohol ausgewaschen werden und so den PK-Verdau nicht stören.

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride; wird auch zum Abstoppen des PK-Verdaues in der weiteren Testprozedur verwendet, nicht wasserlöslich)

AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; teurer, wasserlöslich)

Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma).

Keiner der eingesetzten Proteasehemmer konnte eine eindeutige Verbesserung der Test-performance bewirken (siehe

Tabelle 4). Bei den Proben mit dem Proteaseinhibitor Cocktail konnten breitere, besser getrennte Banden von PrP<sup>SC</sup> beobachtet werden.

Tabelle 4: Einfluss von Proteasehemmern während der Detergensbehandlung.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020311	Proteaseinhibitor Mix (Sigma)	kein Nachweis von PrP <sup>SC</sup>	sterile BM
020313	Proteaseinhibitor Mix (Sigma)	breitere Banden, bessere Auftrennung	native BM
020327	Proteaseinhibitor Mix (Sigma)	deutlichere Banden	insg. keine Verbesserung
	AEBSF	?	
020403	PMSF	?	insg. keine Verbesserung
	Proteaseinhibitor Mix (Sigma)	deutlichere Banden	
020406	PMSF	?	
	Proteaseinhibitor Mix (Sigma)	nicht signifikant	
		nicht signifikant	

## B.2.4. OPTIMIERUNG PRP<sup>SC</sup> FÄLLUNG

### B.2.4.1. VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER SCHLAMMARTEN; ETHANOLFÄLLUNG?

In diesen Versuchen wurde die unterschiedliche Nachweisbarkeit aus vorher sterilisiertem im Vergleich zu „nativem“ Faulschlamm nochmals gegenübergestellt. Weiters wurde überprüft ob die Ethanol-fällung (Schritte 6-9, Kapitel B.2.2) tatsächlich den bedeutend höheren Aufwand für eine bessere Nachweisbarkeit von PrP<sup>SC</sup> gerechtfertigt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich von temperaturbehandeltem und nativem Faulschlamm;  
Vergleich des PrP<sup>SC</sup> Nachweise mit und ohne Ethanol-fällung

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020311	Temperaturbehandelte BM „native“ Biomasse Ethanol-fällung keine Ethanol-fällung	Referenz Verschlechterung  Verschlechterung	Unter 2500µg/ml Hirn in Faulschlamm ist der PrP <sup>SC</sup> Nachweis nur mit Ethanol-fällung möglich
020313	Temperaturbehandelte BM „native“ Biomasse Ethanol-fällung keine Ethanol-fällung	Referenz nicht signifikant  Verschlechterung	Unter 1250µg/ml Hirn in Faulschlamm ist der PrP <sup>SC</sup> Nachweis nur mit Ethanol-fällung möglich
020321	Überstand der Detergens- extraktion Pellet der Detergensextr.		Der Großteil des PrP <sup>SC</sup> kann im Überstand nachgewiesen werden
020406	Ethanol-fällung (aus Wasser) keine Ethanol-fällung (aus W.)	Referenz Verschlechterung	37 µg Hirn nachw. 150 µg Hirn nachw.

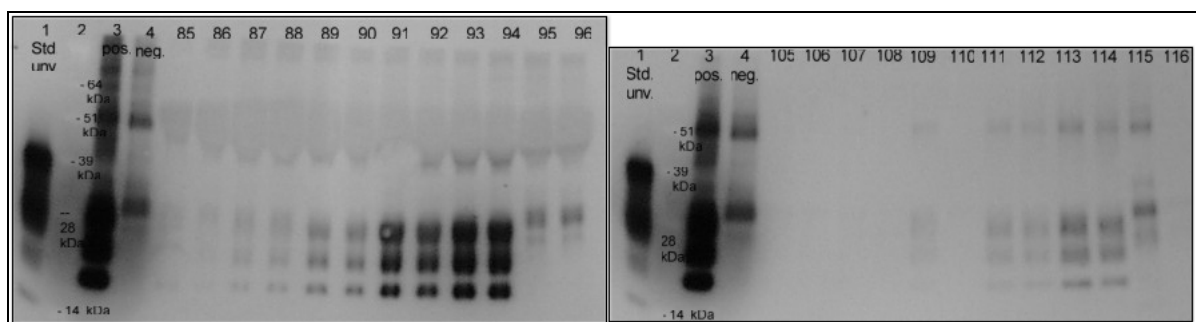


Abbildung 2: 020406: Vergleich des Nachweises von PrP<sup>SC</sup> aus einer Verdünnungsreihe in Wasser mit Ethanol-fällung (links) und ohne Ethanol-fällung (rechts). Die Konzentrationen an Hirnhomogenat der Proben 85 - 94 entsprechen den angewandten Konzentrationen in den Proben 105 - 114

Ohne Aufkonzentrierung von PrP<sup>SC</sup> durch eine Ethanol­fällung sind Konzentrationen unter 2500 µg/ml Hirn in Faulschlamm nicht nachweisbar. Die Ethanol­fällung stellt daher einen notwendigen Schritt zur Detektion von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm dar. In unbehandeltem Faulschlamm ist PrP<sup>SC</sup> im Vergleich zu Sterilisiertem deutlich schlechter nachweisbar. Eine vergleichbare Nachweisbarkeit ergibt sich nur bei einer 30 minütigen Behandlung mit Lauroylsarcosin unter starkem Schütteln (siehe B.2.4.2).

#### B.2.4.2. BSA ALS FÄLLUNGSMITTEL

Die Ethanol­fällung von BSA ist eine Mit­fällung. Die Ausbeute kann daher durch ein gleichzeitig präzipitierendes Agens bedeutend verbessert werden. Bei der Fällung von PrP<sup>SC</sup> aus der Faulschlamm­matrix ist dieser Effekt durch die schon vorhandenen Proteine zu erzielen. Bei der Präzipitation aus einer Verdünnungsreihe in Wasser ist dies nicht der Fall und daher wäre die Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Wasser (=Blindwert) bedeutend schlechter als aus Faulschlamm.

Die Zugabe von 1,0 % BSA (Bovine Serum Albumin, Fraktion V: kalte Ethanol­fällung) verbessert die Wiederfindung (in Wasser) bedeutend (siehe Tabelle 6 und Abbildung 3).

Tabelle 6: BSA als Fällungsmittel

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020318	BSA 0,1 % (w / v)	?	unverdautes BSA führt zu Schmierbanden
	BSA 1,0 % (w / v)	?	
020319	BSA 0,1 % (w / v)	? Verbesserung	unverdautes BSA führt zu Schmierbanden; Ausbeuteverbesserung hauptsächlich in Wasser erkennbar
	BSA 1,0 % (w / v)		
020403	BSA 0,2 % (w/v)	guter Nachweis von PrP <sup>SC</sup> in Wasser	37 µg/ml Hirn in Wasser kann nachgewiesen werden
020406	BSA 0,16 % (w/v)	verschmierte, zusammengezogene Banden	

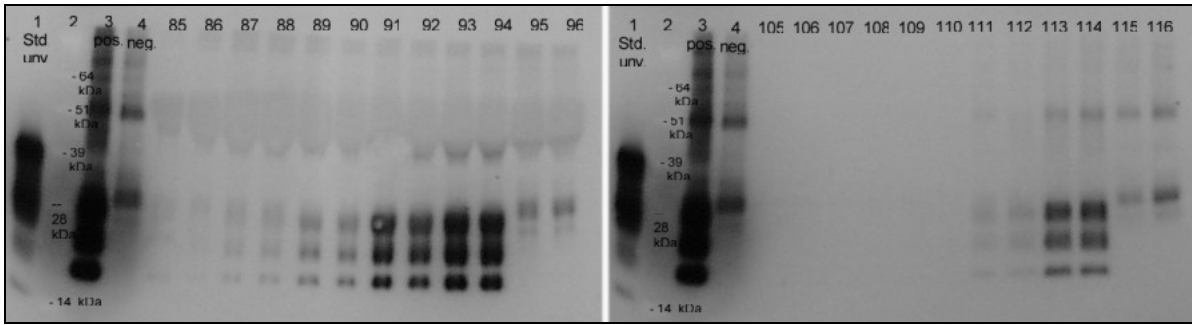


Abbildung 3: 020406: Vergleich des Nachweises von PrP<sup>SC</sup> in Wasser. Detergensbehandlung und nachfolgende Ethanolfällung mit BSA als Mitfällungsmittel (links, Proben 85 - 96) und ohne BSA (rechts, Proben 105 - 116). Die angewandten Hirnhomogenatmengen von Proben 85 - 96 entsprechen denen in Proben 105 - 116.

### B.2.5. VERGLEICH VERDAUPUFFERKOMBINATION AUS DEM PRIONICS CHECK WESTERN® KIT UND TRIS/HCL PH 7,4

Im kommerziell erhältlichen und in Österreich hauptsächlich angewandten BSE-Schnelltest Prionics Check Western® wird das Hirnhomogenat in einer Kombination von „Homogenisierungspuffer“ und „Verdaupuffer“ einem Enzymverdau mit Proteinase K unterzogen um das physiologische Prionprotein PrP<sup>C</sup> von PrP<sup>SC</sup> zu unterscheiden.

Der Einsatz dieser Kombination im Vergleich zu Tris/HCl Puffer pH 7,4. führt zu breiteren aber helleren Banden. Eine Verbesserung der Detektionsgrenze kann daher damit nicht erzielt werden (siehe Tabelle 7 und Abbildung 4).

Tabelle 7: Vergleich Verdaupuffer

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020307	Prionics Tris/HCl pH 7,4	breitere hellere Banden Referenz	keine Verbesserung

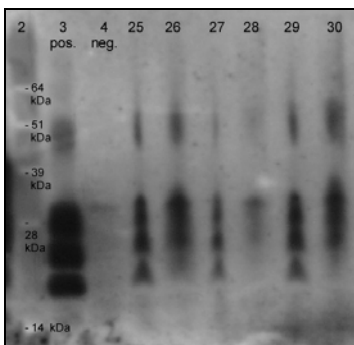


Abbildung 4: 020307: Vergleich Verdaupufferkombination aus dem Testkit Prionics Check Western® und Tris/HCl als Verdaupuffer.

Proben 25, 27, 29: 0,1M Tris/HCl, pH 7,4, 0,05% L.Sarcosin  
Proben 26, 28, 30: Verdaupufferkombination Prionics

### B.3. OPTIMIERUNG 3 (L3 SICHERHEITSLABOR AGES VET. MED. UNTERS. MÖDLING)

Die folgenden Optimierungsversuche wurden im L3 Sicherheitslabor durchgeführt. Wie auch bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Versuchen muss in den ersten Versuchen eine Adaptierung auf die neuen Arbeitsbedingungen vorgenommen werden.

Als PrP<sup>SC</sup> Quelle diente auch hier Hirnhomogenat von mit Scrapie infizierten Mäusen (22A/SV).

Die Arbeitsprotokolle auf die in diesem Kapitel verwiesen wird, sind im Anhang III zu finden.

#### B.3.1. ALTERUNGSEINFLÜSSE

##### B.3.1.1. SCHLAMMQUALITÄT

In den Vorversuchen am IAH-E (s. Kapitel A) wurde festgestellt, dass die Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm in vorher zusätzlich temperaturbehandeltem Faulschlamm höher ist als in  $\gamma$ -bestrahltem Faulschlamm.

In diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm mit steigender Verdünnung von Faulschlamm mit Wasser steigt. In gealtertem Faulschlamm ist die Wiederfindung auch höher als in frischem FS. Zwischen thermophilem und mesophilem Faulschlamm ist kein deutlicher Unterschied der Wiederfindung zu beobachten.

Tabelle 8 Einfluss der Schlammqualität auf die PrP<sup>SC</sup>-Wiederfindung

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020423	frischer Schlamm (meso) gealterter Schlamm (meso)	bessere WF	
020510	Verdünnung Schlamm mesophil/thermophil gealterter Schlamm	bessere WF nicht sign. nicht sign.	schlechter PrP <sup>SC</sup> Nachweis.
020523	gealterter Schlamm (meso) frischer Schlamm (meso) frischer Schlamm (themo)	nicht signifikant <i>Referenz</i> bessere WF	
020527	frischer Schlamm (meso) frischer Schlamm (themo) Wasser	Referenz bessere WF bessere WF	zusammengezogene Banden
020712	frischer Schlamm (meso) frischer Schlamm (themo)	gleiche WF Schmierbanden	
020717	frischer Schlamm (meso) frischer Schlamm (themo) gealterter Schlamm (meso) Wasser	zusammengezogene Banden unterschiedl. WF hohe WF	

### B.3.1.2. ALTERUNG DES HIRNHOMOGENATS

Um den Abbau von PrP<sup>SC</sup> durch Faulschlamm nicht durch Pufferbestandteile zu beeinflussen wurden die Maushirne (= PrP<sup>SC</sup>-Quelle) in destilliertem Wasser homogenisiert. Das Homogenat wurde bei -18°C gelagert. Mehrmaliges Auftauen und einfrieren könnten durch einen Einfluss auf den PrP<sup>SC</sup>-Titer haben und damit die festgestellten Schwankungen in der PrP<sup>SC</sup> Wiederfindung im Faulschlamm haben.

Das Experiment (Tabelle 9) hat keinen Einfluss eines mehrmalige Auftauens des Hirnhomogenats auf die Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> im Faulschlamm im Vergleich zu frisch vorbereitetem Hirnhomogenat gezeigt.

Tabelle 9: Alterung des Hirnhomogenats

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020523	frisch vorbereitetes Hirnhomogenat mehrmals aufgetautes Hirnhomogenat	nicht signifikant	

### B.3.2. LÖSUNG VON PRP<sup>SC</sup>

#### B.3.2.1. PROTEASEINHIBITOREN

Eine nochmalige Überprüfung des Einflusses des Proteaseinhibitor-Cocktails während der Lauroylsarcosinbehandlung (um einen sofortigen Abbau während des Detergenseinflusses zu minimieren) führte zu keiner eindeutigen Verbesserung des Assays. Teilweise wurde eine leichte Verbesserung der Auflösung beobachtet (Tabelle 10).

Es kann davon ausgegangen werden, dass während der Detergensbehandlung (Schritt 3, Kapitel B.2.2) zur Solubilisierung von PrP<sup>SC</sup> aus dem Faulschlamm kein Abbau stattfindet und daher eine schlechtere Wiederfindung nicht auf einen Abbau durch den Faulschlamm zurückzuführen ist.

Tabelle 10: Einfluss des Proteaseinhibitor-Cocktails während der Detergensbehandlung

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020415	Proteaseinhibitor-Cocktail	bessere Auflösung	
020423	Proteaseinhibitor-Cocktail	bessere Auflösung	Reduzierung der BSA-Schmierbanden
020425	Proteaseinhibitor-Cocktail	nicht sign.	
020502	Proteaseinhibitor-Cocktail	nicht sign.	
020717	Proteaseinhibitor-Cocktail	zusammengezogene Banden	

### B.3.2.2. AUFBRECHEN VON ZELLWÄNDEN MIT GLASKUGELN

Eine Verschlechterung der Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm könnte auch dadurch hervorgerufen werden, dass das Protein in die Zellen oder Zellwände inkorporiert wird. Die meisten Verfahren zur Zellmazeration scheitern in diesem Fall daran, dass man einerseits hohe Volumina benötigt, die Probe in Spezialgefäße aus Edelstahl einbringen muß (Zellmazeratoren auf Kugelmühlenprinzip) oder die Mazeration durch eine Ultraschallspitze bei offenem Gefäß stattfinden würde. Einen Hinweis auf die Möglichkeit ob durch Mazeration eine bessere Wiederfindung erzielt werden kann ist das Vortexen mit kleinen Glaskugeln.

In diesen Experimenten wurden die Proben vor dem Schütteln zur Detergensextraktion zusätzlich mit dem selben Volumen an Glaskugeln (0,1 mm) versetzt.

Durch den hohen Volumenverlust durch die Glaskugeln wurde letztendlich eine bedeutend schlechter Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> aus der Faulschlammatrix (bei gleichem Probenvolumen) erzielt. Auch ein zusätzliches Waschen des (Glaskugel-) Pellets konnte die Wiederfindung nicht verbessern (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Mazeration der Zellen durch Glaskugeln

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020425	0,1 g Glaskugeln / 500µl Probe 0,2 g Glaskugeln / 500µl Probe	nicht signifikant	stark zusammenge- zogene Banden
020429	250 µl (350 mg) Glaskug. / 500 µl 500 µl (750 mg) Glaskug. / 500 µl + Auswaschen des Pellets	schlechte WF	

### B.3.2.3. AUFBRECHEN VON ZELLWÄNDEN MIT PHOSPHOLIPASE D

Das Prionprotein PrP<sup>SC</sup> ist ein Membranprotein. Die Zerstörung oder Auflockerung der Phospholipidanteile einer Zellwand könnten zu einer besseren Freisetzung von PrP<sup>SC</sup> aus dem Hinhomogenat bzw. aus den Zellwänden der Faulschlamm biomasse führen. In den Versuchen (s. Tabelle 12) wurde mit Hirnhomogenat versetzter Faulschlamm gleichzeitig mit Lauroylsarcosin und Phospholipase D bei ca. 30°C unter starkem schütteln inkubiert. Da Lauroylsarcosin jedoch auch von Phospholipase D gespalten wird, konnte durch diese Behandlung keine Wiederfindungsverbesserung erzielt werden. Der Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma) enthält auch EDTA, welches die Phospholipase D inhibiert. Der Einsatz dieser Proteaseinhibitor-Cocktails konnte den Effekt der schlechteren Solubilisierung von PrP<sup>SC</sup> durch die Spaltung von Lauroylsarcosin aufheben.



Tabelle 12: Einfluss von Phospholipase D

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020507	Phospholipase D	schlechtere Solubilisierung von PrP <sup>SC</sup>	
	Phospholipase D + Inhibitor	keine Verbesserung der WF	

### B.3.3. VERDAU MIT PROTEINASE K

Die Unterscheidung zwischen physiologischem PrP<sup>C</sup> und pathologischem Prionprotein PrP<sup>SC</sup> wird wegen der relativen Proteaseresistenz von PrP<sup>SC</sup> durch einen Verdau mit Proteinase K (PK) durchgeführt (Schritt 9 in Kapitel B.2.2).

#### B.3.3.1. PROTEINASE K

Eine Reduktion der Wiederfindungsrate könnte durch einen Überverdau von PrP<sup>SC</sup> durch PK hervorgerufen werden. Die schlechte Auswertbarkeit einiger Versuche wird z.T. durch eine Überladung mit unverdaulichem BSA hervorgerufen. Es muss daher eine PK-Aktivität eingestellt werden, die PrP<sup>SC</sup> nicht, BSA jedoch fast vollständig verdaut.

Proteinase K wird kommerziell als Lyophilisatpulver oder in Lösung angeboten, die Aktivität der einzelnen Chargen kann bis zu 40% variieren. Die Einwaage im 1,0 Milligrammbereich ist sehr schwierig. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sehr unterschiedliche PK-Aktivitäten angewandt wurden.

Um das Problem der kleinen Einwaagen zu umgehen wurde als PK-Stammlösung auf die kommerziell als Lösung angebotene Variante umgestellt.

Die Konzentration von 50 µg/ml PK wurde am IAH-E empfohlen. Da eine Umstellung der Verdautemperatur von 37°C auf 48°C das Problem der BSA-Überladung lösen konnte (siehe Kapitel B.3.3.2), wurden keine weiteren Experimente mit unterschiedlichen Proteinase K-Konzentrationen durchgeführt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss der Proteinase K-Konzentration

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020502	50 µg/ml		kein PrP <sup>SC</sup> Nachweis
	100 µg/ml		
020515	50 µg/ml		kein PrP <sup>SC</sup> Nachweis
	100 µg/ml		

### B.3.3.2. VERDAUTEMPERATUR

Am IAH-E wurde als Verdautemperatur 37°C empfohlen. In der Arbeitsvorschrift des Prionics-Check Western® wurde die empfohlene Verdautemperatur auf 48°C hinaufgesetzt. Diesem Hinweis folgend, wurde in den hier vorliegenden Experimenten (Tabelle 15 und Abbildung 5) auch eine Verdautemperatur von 48°C gewählt.

Mit einer Verdautemperatur von 48°C konnte das Problem der Überladung mit BSA bei gleichbleibender PrP<sup>Sc</sup>-Wiederfindung gelöst werden. In den dem Protokoll 020617 nachfolgenden Experimenten wurde daher bei 48°C der PK-Verdau durchgeführt.

Tabelle 14: Einfluss der Verdautemperatur

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020610	37°C 48°C		kein PrP <sup>Sc</sup> Nachweis
020617	37°C 48°C	<i>Referenz</i> getrenntere Banden, vollständiger Verdau von BSA,	

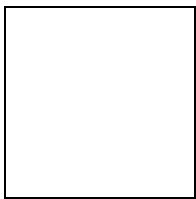


Abbildung 5: 020617: Vergleich der Verdautemperaturen 37°C (Proben 5 - 10) und 48°C (Proben 25 - 30). Die angewandten Hirnhomogenatkonzentrationen in beiden Verdünnungsreihen sind gleich.

### B.3.3.3. VERDAUPUFFER

Der Vergleich der Prionics-Verdaupufferkombination mit Tris/HCl brachte eine bessere Wiederfindung in Tris/HCl. Daher wurde in fast allen Experimenten 0,1M Tris/HCl als Verdaupuffer verwendet. Am IAH-E wurde eine Konzentration von 0,32% an Lauroylsarcosin im Verdaupuffer empfohlen.

Die zusammengezogenen Banden in vielen Versuchen wurde auf eine zu hohe Ionenstärke zurückgeführt. Dieser Effekt konnte durch eine geringere Pufferstärke nicht kompensiert werden. Die deutlichsten Signale wurden mit einem Verdaupuffer mit 0,1M Tris/HCl pH 7,4 und einer Lauroylsarcosinkonzentration von 0,32% erzielt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluss der Verdaupufferkonzentration

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020625	0,1M Tris/HCl + 0,05% L.Sarco 0,1M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco	deutlicheres Signal	
020701	0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco 0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco 0,01 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco	nicht signifikant	starkes Hintergrundrauschen
020702	0,1 M Tris/HCl + 0,05% L.Sarco 0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco	deutlicheres Signal	
020703	0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco 0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco	nicht signifikant	
020704	0,05 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco 0,1 M Tris/HCl + 0,32% L.Sarco	deutlicheres Signal	

#### B.3.3.4. PK-STOPP: PMSF

Proteinase K, die das physiologische Prionprotein PrP<sup>C</sup> vom pathologischen Prionprotein PrP<sup>SC</sup> durch letzterer relativer Proteasestabilität trennt, muss vor der Denaturierung mit SDS inhibiert werden. Sonst würde das unter dem Einfluss von SDS aufgerollte PrP<sup>SC</sup> auch innerhalb kürzester Zeit verdaut und damit nicht mehr nachweisbar werden. PK wurde in diesen Experimenten mit PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, Serinproteaseinhibitor) gestoppt.

PMSF Konzentrationen über 11,4 µmol/ml und unter 8 µmol/ml führen zu einer schlechteren Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup>. 8 µmol/ml wurden daher in den folgenden Experimenten als Standardkonzentration zum PK-Stopp angewandt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Verdaustopp PMSF

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020523	11,4 µmol/ml 23 µmol/ml	Referenz schlechtere WF	
020617	4 µmol/ml 8 µmol/ml	Überverdau (kein PK-Stopp) PK-Stopp	

#### B.3.4. ETHANOLFÄLLUNG

#### B.3.4.1. VERGLEICH GRADIENTENZENTRIFUGATION UND ETHANOLFÄLLUNG

Der letzte Aufreinigungsschritt vor der Gel-Elektrophorese in der OIE-Western-Blot Referenzanalysevorschrift für den PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis aus Hirnhomogenat ist eine Gradientenultrazentrifugation in einen „Sucrosepolster“ (20% Sucrose). In diesen Versuchen sollte überprüft werden ob mit der Methode der Ethanol-fällung (unter BSA-Zugabe als Mitfällungsmittel) die selbe PrP<sup>Sc</sup> Ausbeute erzielt werden kann als mit dieser erprobten Ultrazentrifugationsmethode, die einen bedeutend höheren zeitlichen bzw. apparativen Aufwand darstellt (Tabelle 17).

Die Gradienten-Ultrazentrifugation in einen Sucrosepolster (20%) führt keiner besseren PrP<sup>Sc</sup> Wiederfindung als die Ethanol-fällung. Es kommt bei der Gradientenzentrifugation jedoch zu einem besseren Reinigungseffekt der Prion-Fraktion, die Banden im Blot erscheinen daher sauberer getrennt.

Tabelle 17: Vergleich der Aufkonzentration von PrP<sup>Sc</sup> mittels Ethanol-fällung und Gradientenzentrifugation (Sucrosepolster, 20 %)

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020425	Ethanol-fällung Gradientenzentrifug. (Sucrose 20%)	<i>Referenz</i> schlechtere WF, getrennte Banden	
020429	Ethanol-fällung Gradientenzentrifug. (Sucrose 20%)	<i>Referenz</i> gleiche WF, getrennte Banden	

#### B.3.4.2. VERGLEICH ETHANOL-METHANOL ALS PRP<sup>Sc</sup> FÄLLUNGSREAGENS

Alternativ zu Ethanol wurde Methanol als Fällungsmittel zur Präzipitation von PrP<sup>Sc</sup> aus der Faulschlamm-matrix überprüft.

Sowohl Ethanol als auch Methanol geben sehr ähnliche Fällungsausbeuten. Die Banden aus der Methanol-fällung erscheinen jedoch etwas breiter. Eine signifikante Verbesserung konnte mit Methanol nicht erzielt werden (Tabelle 18).

Aufgrund der höheren Toxizität von Methanol wurde daher Ethanol weiterhin als Fällungsmittel beibehalten.

Tabelle 18: Vergleich Ethanol und Methanol als Fällungsmittel

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020709	Ethanol-fällung (72% u. 64%) Methanol-fällung (72% u. 64%)	<i>Referenz</i> etwas breitere Banden	starkes Hintergrund-rauschen

### B.3.4.3. BSA ALS MITFÄLLUNGSREAGENS

Die Ethanolpräzipitation von PrP<sup>SC</sup> aus der Faulschlammatrix wird durch ein gleichzeitig ausfallendes Agens verbessert. In Faulschlamm liegen genügend Proteine vor, die in kaltem Ethanol wie PrP<sup>SC</sup> nicht löslich sind und ausfallen. Die Fällungsausbeute von PrP<sup>SC</sup> aus einer wässrigen Hirnhomogenatsuspension ist im Vergleich zur Präzipitation aus Faulschlamm geringer. Der Blindwert (Matrix = Wasser) würde daher eine schlechtere Wiederfindungsrate aufweisen als die Probe (Matrix = Faulschlamm). Zur Verbesserung der Fällung wurde daher BSA (Bovine Serum Albumin, Fraktion V, kalte Alkoholfällung) zugesetzt (Tabelle 19). Schlecht verdautes BSA führt zu Schmierbanden. 0,2% BSA in der Probe können mit PK (50 µg/ml) bei 48°C innerhalb von 35 min. soweit enzymatisch abgebaut werden, dass einerseits PrP<sup>SC</sup> ohne größere Verluste eindeutig nachgewiesen werden können und andererseits keine BSA-Schmierbanden entstehen.

Tabelle 19: Einfluss von BSA als Mitfällungsmittel

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020415	Wasser + BSA	Schmierbanden	
020423	FS mesophil (+/- Inhibitor)		
	FS mesophil +BSA FS mesophil + Inhibitor +BSA	bessere Ausbeute Schmierbanden	
020425	FS mesophil (+/- Inhibitor)		
	FS mesophil +BSA FS mesophil + Inhibitor +BSA	bessere Ausbeute Schmierbanden	

### B.3.5. VERBESSERUNG DER AUFLÖSUNG

Nicht eindeutig zuordenbare Einflussfaktoren führen bei der Gelelektrophorese zu verschmierten, zusammengezogenen Banden, welche schlecht auswertbar sind (Abbildung 6).

Vermutlich wird dieser Effekt durch zu hohe Ionenstärke in der Probe hervorgerufen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche haben zum Ziel, PrP<sup>SC</sup> im Pellet anzureichern bzw. die störenden Einflüsse zu minimieren.



Abbildung 6: Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlammatrix. Die Proben 51 - 56 (thermophiler Schlamm) wurden mit dem selben Hirnhomogenat und den gleichen Konzentrationen

an PrP<sup>SC</sup> wie Proben 45 - 50 (mesophiler Schlamm) versetzt. Proben 45 - 50 können gut ausgewertet werden, bei 51 - 56 erscheinen die Banden jedoch zusammengezogen.

### B.3.5.1. FRAKTIONIERTER ETHANOLFÄLLUNG UND UNTERSCHIEDLICHE ETHANOLKONZENTRATIONEN

Die Ethanol-fällung stellt einen der Schlüsselschritte dar, welche Proteine bzw. Peptide auf das Gel aufgetragen werden. Durch Variation der Alkoholkonzentration sollte überprüft werden, ob damit eine selektivere Fällung von PrP<sup>SC</sup> und damit eine Verbesserung der Auflösung (Eliminierung der zusammengezogenen, unauswertbaren Banden) möglich ist.

Durch eine Reduktion der Alkoholmenge oder -Konzentration bei der Fällung konnten die zusammengezogenen Banden nicht reduziert werden.

Mit 48% Ethanol konnte PrP<sup>SC</sup> bereits teilweise ausgefällt werden. Eine vollständigere PrP<sup>SC</sup>-Fällung (die für eine gute Wiederfindungsrate notwendig ist) konnte jedoch erst ab einer Konzentration von größer 65% Ethanol erzielt werden.

Tabelle 20: Unterschiedliche Alkoholkonzentrationen zur Fällung von PrP<sup>SC</sup>.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020703	1. Fällung 50% Ethanol 2. Fällung 83% Ethanol	breite Banden kein PrP <sup>SC</sup>	starkes Hintergrundrauschen
020704	1. Fällung 48% Ethanol 2. Fällung 72% Ethanol	PrP <sup>SC</sup> in beiden Fraktionen nachweisbar; Hauptmenge in der 2. Fraktion (72% Ethanol)	
020705	54% Ethanol (650 µl 96%ig) 63% Ethanol (1000 µl 96%ig) 74% Ethanol (1500 µl 96%ig)	kein eindeutiger Unterschied	starkes Hintergrundrauschen
020708	51% Ethanol (550 µl 96%ig) 55% Ethanol (670 µl 96%ig) 60% Ethanol (830 µl 96%ig) 64% Ethanol (1000 µl 96%ig)	kein PrP <sup>SC</sup> geringe PrP <sup>SC</sup> Ausbeute  stärkstes Signal	starkes Hintergrundrauschen
020709	65% Ethanol (1000 µl 96%ig) 72% Ethanol (1500 µl 96%ig) 65% Methanol (1000 µl 96%ig) 72% Methanol (1500 µl 96%ig)	stärkeres Signal  stärkeres Signal	
020712	56% Ethanol (1500 µl 75%ig) 65% Ethanol (1500 µl 86%ig) 72% Ethanol (1500 µl 96%ig)	stärkstes Signal	stark zusammengezogene Schmierbanden
020716	56% Ethanol (1500 µl 75%ig) 65% Ethanol (1500 µl 86%ig) 72% Ethanol (1500 µl 96%ig)	stärkstes Signal  zusammengezogene Banden	

### B.3.5.2. VERDÜNNUNG DER FAULSCHLAMMMATRIX VOR DER LAUROYLSARCOSIN-BEHANDLUNG

Die Wiederfindung in Verdünnungen von Faulschlamm sind höher als jene in unverdünntem Faulschlamm (siehe Kapitel B.3.1.1 bzw. Arbeitsprotokoll 020510). Die Probenmenge bzw. die Möglichkeit der Verdünnung ist in diesen Versuchen durch die Gefäßgröße limitiert. Höhere Ausgangsvolumina erfordern höhere Alkoholmengen. Folglich müssten größere Zentrifugenröhrchen und entsprechend eine andere Zentrifuge (bzw. neuer Rotor) verwendet werden (siehe Kapitel B.2.2).

Eine Verdünnung der Faulschlammprobe führte nicht besser auswertbaren Banden. Durch die Limitierung der Gesamtprobe vor der Alkoholfällung auf 500 µl wurde letztlich dadurch die Detektionsgrenze erhöht (Tabelle 21).

Tabelle 21: Verdünnung der Probe vor der Lauroylsarcosinbehandlung

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020716	67%: 250 µl FS + 125 µl Wasser 58%: 250 µl FS + 180 µl Wasser 50%: 250 µl FS + 250 µl Wasser	sauber getrennte Banden	hohe Detektionsgrenze (geringere Probemenge)
020717	67%: 350 µl FS + 175 µl Wasser	zusammengezogene Banden	

### B.3.5.3. ETHANOLFÄLLUNG VOR ODER NACH DEM PK-VERDAU

Durch teilweise Umkehrung der Probenaufbereitung (siehe Kapitel B.2.2) sollte überprüft werden, ob eine Alkoholfällung der bereits PK-verdauten Probe zu einer selektiveren PrP<sup>SC</sup> Anreicherung führen würde. Der eingesetzte Faulschlamm hat einen pH-Wert von 7,2 - 7,4, daher ist ein PK-Verdau ohne Pufferzugabe möglich.

Durch Ethanol-fällung der bereits verdauten Faulschlammprobe konnte keine eindeutige Verbesserung erzielt werden. Durch das unverdaute BSA kommt es zu einer starken Überladung der Gele mit BSA.

Tabelle 22: Ethanol-fällung vor oder nach dem PK-Verdau

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020625	Verdau nach Fällung	BSA-Schmierbanden, z.T. saubere PrP <sup>SC</sup> Banden	
020702	Verdau nach Fällung Verdau vor Fällung	Schmierbanden, PrP <sup>SC</sup> schwer identifizierbar, breite Banden	
020703	Verdau nach Fällung Verdau vor Fällung	stärkeres Signal, deutl. Banden	fraktionierte Fällung

#### B.3.5.4. WASCHEN MIT ETHANOL

Eine weitere Möglichkeit aus dem Ethanolfällungspellet Störsubstanzen zu entfernen ist das Waschen des Pellets mit kaltem Ethanol (75%; Fällungsmedium).

Waschen des Pellets mit kaltem Ethanol führt nicht zur Entfernung der Substanzen, die die zusammengezogenen Banden hervorrufen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Waschen des Alkoholfällungspellets mit Ethanol.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020625	Waschen mit 75% Ethanol	stärkeres Signal	
020701	Waschen mit 75% Ethanol	nicht signifikant schmale Banden	
020702	Verdau vor und nach der Fällung: + Waschen mit 75% Ethanol	nicht signifikant schmale Banden etwas stärkeres Signal	

#### B.3.6. DIV. EINFLÜSSE UND OPTIMIERUNGEN

Die schlechte Auswertbarkeit der Western-Blots ist einerseits auf die z.T. zusammengezogenen Banden zurückzuführen, welche wahrscheinlich durch Einflüsse aus der Matrix hervorgerufen werden und andererseits auf sehr starkes Hintergrundrauschen, welches wahrscheinlich durch suboptimale Antikörperwirkung zustande kommt.

Im Folgenden werden einige Versuche angeführt, die Einflüsse auf die Detektionsgrenze bzw. die bessere Auswertbarkeit der Western-Blots untersuchen.

##### B.3.6.1. MANIPULATIONSTEMPERATUR

Die Raumtemperatur des Labors war stark von den jahreszeitlichen Schwankungen mitgeprägt. In der Zeit in der die meisten Versuche zu schlecht auswertbaren Ergebnissen führten, wurde eine Temperatur von bis zu 32°C in der Laminar Air-Flow Kammer gemessen. Ein Vergleich der Probenaufbereitung (Schritte 1 - 9, Kapitel B.2.2) unter ständigem Kühlen im Kühlakku (0°C) bzw. ohne Kühlung bei Raumtemperatur führte zu keinem signifikanten Unterschied der Ergebnisse (Tabelle 24).

Tabelle 24: Vergleich der Probenaufbereitung unter Kühlung und bei 32°C

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020701	Aufbereitung: Raumtemp. (32°C) Aufbereitung: Kühlakku (0°C)	nicht signifikant	starkes Hintergrundrauschen



### B.3.6.2. RESUSPENSIONSVOLUMEN

Das Resuspensionsvolumen mit dem das Ethanol-fällungspellet wieder aufgenommen wird, determiniert die Detektionsgrenze. Eine Reduktion des Resuspensionsvolumens unter 50µl führt zu einer Gelierung der Probe nach der Denaturierung mit Samplepuffer. Auch höhere Volumina (150µl) reduzieren den Effekt der zusammengezogenen Banden nicht (woraus geschlossen werden kann, daß dieser Effekt nicht auf eine Überladung der Gele zurückzuführen ist.). Siehe Tabelle 25.

Tabelle 25: Variation der Resuspensionspuffermenge um das Ethanol-fällungspellet wieder aufzunehmen.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020423	100µl Verdaupuffer 50 µl Verdaupuffer	Verbesserte Detektionsgrenze	
020705	100µl Verdaupuffer 150 µl Verdaupuffer	zusammengezogene Banden; schwächeres Signal	

### B.3.6.3. TBST ODER BLOCKINGPUFFER FÜR ANTIKÖRPER 1

Unterschiedliche Vorschriften für den Nachweis von PrP<sup>SC</sup> sehen die Inkubation entweder in Blocking-Puffer oder in TBST vor.

Ein Vergleich der beiden Inkubationsmedien führte zu ähnlichen Ergebnissen. Geringere PrP<sup>SC</sup> Mengen konnten mit TBST als Medium besser erkannt werden. Das starke Hintergrundrauschen konnte bei beiden Varianten festgestellt werden (Tabelle 26).

Tabelle 26 Unterschiedliche Puffer zur Antikörperinkubation.

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020709	1. Antikörper in TBST  1. Antikörper in Blockingpuffer	stärkere Banden, stärkeres Hintergrundrauschen	

### B.3.6.4. INKUBATIONSTEMPERATUR FÜR ANTIKÖRPER 1

Laut Prionics Check Western<sup>®</sup> Protokoll erfolgt die Inkubation des ersten Antikörpers eine Stunde bei Raumtemperatur (Verdünnung 10 µl Antikörper auf 50 ml Inkubationsmedium = 1:5000). Bei Reduktion der Antikörperkonzentration (1:20000 - 1:50000) und gleichzeitiger

längerer Inkubationsdauer (über Nacht) bei Raumtemperatur kommt es zu einem starken Hintergrundrauschen mit starker punktueller Anlagerung des Antikörpers über die ganze Membran verstreut bei gleichzeitiger schlechter Anlagerung auf PrP<sup>SC</sup>.

Bei der Inkubation bei 4°C über Nacht mit Antikörperkonzentrationen von 1:20000 - 1:50000 kommt es zu korrekter Anlagerung des Antikörpers auf PrP<sup>SC</sup> und sehr geringem Hintergrundrauschen (Tabelle 27 und Abbildung 7).

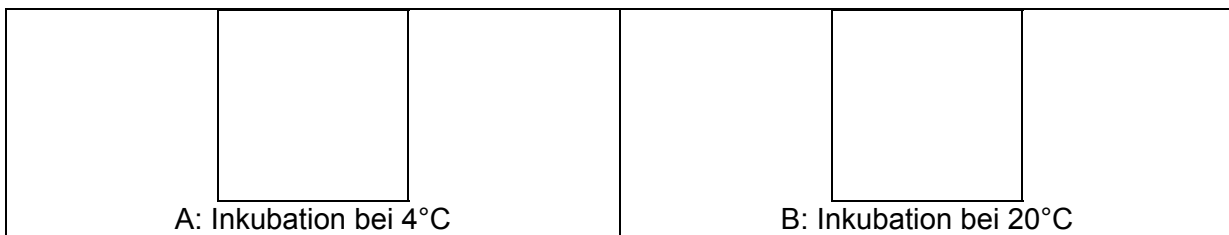


Abbildung 7: Vergleich der Inkubationstemperaturen für den ersten Antikörper 1:25000; über Nacht: 4°C (A) und 20°C (B)

Tabelle 27: Inkubationstemperatur für Antikörper 1

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020716	über Nacht, 23°C, TBST	starkes Hintergrundrauschen nur 1. PrP <sup>SC</sup> Bande erkennbar	
	über Nacht, 4°C, TBST	eindeutige PrP <sup>SC</sup> Identifikation	
020717	über Nacht, 23°C, TBST	starkes Hintergrundrauschen nur 1. PrP <sup>SC</sup> Bande erkennbar	
	über Nacht, 4°C, TBST	eindeutige PrP <sup>SC</sup> Identifikation	

### B.3.7. DETEKTIONSLIMITS

Ein Hauptpunkt in diesem Projekt stellt die Determinierung des Detektionslimits von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm mittels Wiederfindung dar. Als Detektionsmethode von PrP<sup>SC</sup> wurde ein an das Prionics Check Western<sup>®</sup> angelehnte Western Blot Verfahren entwickelt und angewandt. Dieses Verfahren liefert jedoch nur „semidigitale“ Antworten - Nachweis positiv oder negativ. Die Ergebnisse lassen sich daher schwer in Messreihen zusammenfassen und statistisch als Gerade auswerten. Hintereinander ausgeführte Nachweise können weiters nur bedingt miteinander verglichen werden, da sich die meisten Millieubedingungen nicht wiederholen lassen. In Tabelle 28 sind die wichtigsten nicht standardisierbaren Einflussfaktoren auf die Detektionsgrenze aufgelistet. Da die Anzahl der Versuche von Anfang an nicht absehbar war, wurden keine Hirnhomogenatpools (22A/SV, 301V/VM, BSE) hergestellt.

***Eine genauere Determinierung der Nachweisgrenze wäre nur für diese Versuchsanordnung mit gleichem Hirnhomogenat und Faulschlamm bzw. gleichen Chemikalien***

**gültig. Eine Extrapolation in andere Labors ist aus den Erfahrungen in diesem Projekt nicht möglich. Es wurde daher von einer genauen Überprüfung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze abgesehen.**

In Tabelle 29 ist eine Übersicht der einzelnen Wiederfindungsversuche mit den entsprechenden Konzentrationen angeführt.

Die Validierungsversuche (Kapitel A und B.5) und die Abbauversuche (Kapitel B.6) wurden mit Konzentrationen durchgeführt, bei denen von einer sicheren Detektion von PrP<sup>SC</sup> ausgegangen werden konnte. Das wirkliche Detektionslimit liegt wahrscheinlich um einen Faktor 2 - 5 unter den angewandten Konzentrationen, welche mit längerer Belichtungs- bzw. Entwicklungsdauer noch hätten nachgewiesen werden können.

Tabelle 28: Einflussfaktoren auf die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm mittels Western Blot.

Faktor	Einfluss	Reproduzierbarkeit / Ausweg?
Prionprotein PrP <sup>SC</sup>	Krankheitsstadium der Versuchstiere und der Gehalt an PrP <sup>SC</sup> je Hirn ist nicht bekannt - es kann nur die Homogenatmenge verglichen werden.	Homogenat aus unterschiedlichen PrP <sup>SC</sup> -Quellen führt zu unterschiedlichen Detektionsgrenzen Großer Homogenatpool aus vielen Hirnen
Faulschlamm	Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung	Unterschiedliche Provenienz und Stabilisierungsgrad des Faulschlammes beeinflusst die Wiederfindung
Proteinase K	Aktivitätsangaben der Hersteller von Proteinase K sind mit einer Unsicherheit von $\pm 40\%$ behaftet. Höhere Aktivität wird auch PrP <sup>SC</sup> stärker angreifen.	
Antikörper 1	Aktivität des Antikörpers hängt u.a. von Lagerung und Alter ab.	
Antikörper 2	Aktivität des Antikörpers hängt u.a. von Lagerung und Alter ab.	
Lichtblitzintensität	Die Umsatzrate des am 2. Antikörper konjugierten Enzyms hängt von der Temperatur während der Belichtung und dem Substrat (Alter) ab.	
Entwicklung des Röntgenfilms	Die Aktivität des Entwicklers (Schwärzung des Films und Hintergrundrauschen) hängt von dessen Alter und Temperatur ab.	

#### **B.3.7.1. DETEKTIONSLIMIT**

In Tabelle 29 sind jene geringsten Hirnhomogenatkonzentrationen einer Versuchsreihe aufgelistet, die während des Optimierungsverfahrens noch ein positives Signal lieferten. Da bei den jeweiligen Versuchen unterschiedliche Bedingungen herrschten, kann daraus keine Bestimmungsgrenze errechnet werden.

Hier ist auch anzumerken, dass die Ermittlung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze lediglich auf die jeweils herrschenden Parameter zutrifft (und daher auf andere Labors nicht umgelegt werden kann). Wie in Kapitel B.3.7 dargelegt, können weiters einige Parameter, die Einfluss auf die Bestimmungsgrenze haben, nicht standardisiert werden.

Tabelle 29: Geringste eindeutig nachgewiesene Hirnhomogenatmengen in Faulschlamm

Arbeitsprotokoll	PrP <sup>Sc</sup> Quelle	[ µg/ml ] Hirn in Faulschlamm	Faulschlamm
020418	22A/SV	300 150	mesophil thermophil
020423	22A/SV	75 75	mesophil (frisch) mesophil + BSA
020425	22A/SV	75 150	mesophil mesophil (Glaskugeln, Gradientenzentrifugation)
020429	22A/SV	70	mesophil
020507	22A/SV	71 71	mesophil + BSA Wasser + BSA
020523	22A/SV	150	mesophil
020527	22A/SV	150 150 71	mesophil thermophil Wasser
020617	22A/SV	150 1200	mesophil Schlamm Vollprobe (ohne Fällung)
020625	22A/SV	150 300	mesophil mesophil; Fällung nach Verdau
020702	22A/SV	300	mesophil
020703	22A/SV	300	mesophil
020704	22A/SV	150	mesophil
020705	22A/SV	150	mesophil
020712	22A/SV	300	mesophil
020716	22A/SV	300	mesophil
020717	22A/SV	300 600	mesophil thermophil

### B.3.7.2. SCHLAMPELLET

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der PrP<sup>Sc</sup>-Extraktion aus dem Faulschlamm wurde das Pellet der ersten Zentrifugation (Schritt 4 Kapitel B.2.2) in Verdauopuffer resuspendiert, einem PK-Verdau unterzogen, denaturiert und dann mittels Western Blot auf PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt

untersucht. Der Gehalt an PrP<sup>SC</sup> im Faulschlamm lag unter der Detektionsgrenze, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Detergens den Großteil des PrP<sup>SC</sup> von den Faulschlammteilchen ablöst und während der Zentrifugation im Überstand hält (Schritte 2-4, Kapitel B.2.2, Tabelle 30 und Abbildung 8)

Tabelle 30: Nachweis von PrP<sup>SC</sup> im Faulschlamm pellet nach der Detergensextraktion

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss	Bemerkung
020423	Verdau des Schlamm pellets	PrP <sup>SC</sup> nicht nachweisbar	
020617	Direkter Nachweis aus FS	hohe Bestimmungsgrenze (1200µg/ml HH in FS)	

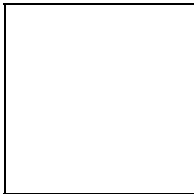


Abbildung 8: 020423

Vergleich der Wiederfindung von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm.

Proben 55 - 56: Wiederfindung im Überstand der Detergensextraktion

Proben 75 - 76: Faulschlamm pellet der Proben 55 und 56

#### B.4. VALIDIERUNG 1 + OPTIMIERUNG 4

Die für diesen Abschnitt relevanten Arbeitsprotokolle sind im Anhang IV zu finden.

Anschließend an die Optimierungsexperimente sollte in 4-facher Wiederholung überprüft werden, ob das Prionprotein PrP<sup>SC</sup> aus unterschiedlicher Quelle (22A/SV Scrapie in Maus, 301V BSE in Maus und BSE in Rind) aus unterschiedlicher Matrix nachvollziehbar nachgewiesen werden kann. Augenmerk wurde bei diesen Versuchen nicht auf die Determinierung der Nachweisgrenze, sondern auf den qualitativen Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm gelegt.

Der Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in thermophilem Faulschlamm führte wieder zu den im Kapitel B.3.5 beschriebenen zusammengezogenen Banden. Die Verwendung von 10-Taschen Gelen zur Elektrophorese anstatt der bisher verwendeten 17-Taschen-Gele führte zu einem eindeutigen Nachweis von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm. Die Wiederholung der Validierungsversuche und der Beweis des reproduzierbaren PrP<sup>SC</sup>-Nachweises in Faulschlamm ist im Kapitel B.5 beschrieben.

Hier wurde auch erstmals Hirnhomogenat 301V/VM BSE in Maus bzw. natürliches BSE verwendet. Die PrP<sup>SC</sup> Konzentration der einzelnen Hirne ist nicht bekannt. Die PrP<sup>SC</sup>-Konzentration im Hirnhomogenat ist von der Tierart, Krankheit (BSE oder Scrapie) bzw. vom Krankheitsstadium abhängig. Bei diesen Versuchen wurden Maushirne aus BSE- bzw. Scrapie infizierten Tieren verwendet, bei denen die meisten Tiere der Herde bereits klinische Symptome einer Prionenkrankheit zeigten.

Es musste daher schrittweise an die Detektionsgrenze von PrP<sup>SC</sup> aus 301V bzw. BSE herangetastet werden.

Tabelle 31: Optimierung 4: Vergleich 17-Taschen und 10-Taschen Gel zur Elektrophorese

Arbeitsprotokoll	Parameter	Einfluss
02 04 26	10-Taschen Gel 17-Taschen Gel	nur die schwerere PrP <sup>SC</sup> -Bande erkennbar z.T. zusammengezogene Banden
02 04 26	10-Taschen Gel 17-Taschen Gel: Unterschiedl. Auftragsmengen	nur die schwerere PrP <sup>SC</sup> -Bande erkennbar z.T. zusammengezogene Banden
02 07 30	10-Taschen Gel	schlechte PrP <sup>SC</sup> -Wiederfindung (ev. Antikörperproblem oder geringe PrP <sup>SC</sup> -Menge im Hirnhomogenat)

Tabelle 32: Übersicht der Versuche Validierung 1

Arbeitsprotokoll	Prionproteinquelle	Hirnhomogenat Konzentrationen	Matrix	Bemerkung
<b>02 07 18</b> 22A 1.1	22A/SV Scrapie in Maus	300 µg/ml 600 µg/ml 1200 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	z.T. zusammen- gezogene Banden
<b>02 07 22</b> 22A 1.2	22A/SV Scrapie in Maus	300 µg/ml 600 µg/ml 1200 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	z.T. zusammen- gezogene Banden
<b>02 07 23</b> 22A 1.3 301V 1.1	22A/SV Scrapie in Maus 301V/VM BSE in Maus	300 µg/ml 600 µg/ml 1200 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	z.T. zusammen- gezogene Banden 301V an der Detektionsgrenze
<b>02 07 24</b> 301V 1.2 BSE 1.1	301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	600 µg/ml 1200 µg/ml 2500 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	unter der Detektionsgrenze
<b>02 07 25</b> 301V 1.3 BSE 1.2 BSE 1.3	301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	1200 µg/ml 2500 µg/ml 5000 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	z.T. zusammen- gezogene Banden BSE an der Detektionsgrenze

## B.5. VALIDIERUNG 2

Die Validierungsprotokolle, auf die in diesem Kapitel verwiesen wird, sind in Anhang V aufgelistet.

Mit den Validierungsversuchen (siehe auch Kapitel B.4) soll bewiesen werden, dass das Prionprotein PrP<sup>SC</sup> in nachvollziehbarer Form aus unterschiedlicher Quelle (Hirnhomogenat aus 301V/VM BSE in Maus, 22A/SV Scrapie in Maus und BSE in Rind) sowohl in mesophilem wie in thermophilem Schlamm (jeweils auf Schlachtabfälle adaptiert und danach in den Abbauprobungen eingesetzt), in mesophilem Schlamm aus der Vergärung kommunalem Primärschlammes (=Mesophil II) und in Wasser mit ähnlicher Detektionsgrenze nachgewiesen werden kann.

Das Prionprotein konnte nachvollziehbar aus unterschiedlichen Quellen aus unterschiedlicher Matrix nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9)

Die Intensität des Signales von PrP<sup>SC</sup> aus der Matrix „Mesophil II“ war jedoch geringer als in den anderen Matrices. Grund dafür scheint der bedeutend höhere Feststoffanteil in dieser Schlammqualität zu sein. Die Adsorbierungsfläche ist höher je mehr Feststoffe (bei angenommener ähnlicher Korn- und Flockengröße) im Schlamm enthalten sind. Die Spülmittel-

extraktion gehorcht wie alle Extraktionsverfahren dem Nernst'schen Verteilungsgesetz und ist daher von der Adsorptionsoberfläche abhängig.

Eine generelle Nachweis- und Bestimmungsgrenze des angewandten Prionennachweises in Faulschlamm lässt sich nicht angeben. Die in den hier durchgeführten Versuchen angewandten Hirnkonzentrationen liegen knapp über der Bestimmungsgrenze.

Eine Ermittlung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze ist weiters nicht sinnvoll, da das Analysenergebnis nur auf die eingesetzte Hirnmenge bezogen werden kann. Bestimmt wird jedoch das enthaltene Prionprotein. Die PrP<sup>Sc</sup>-Konzentration in den eingesetzten Hirnen ist nicht bekannt.

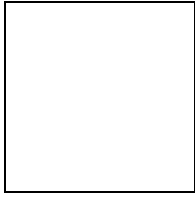
Der PrP<sup>Sc</sup>-Titer im Hirnhomogenat kann nur über einen Bio-Assay bestimmt werden, bei dem eine Hirnhomogenat-Verdünnungsreihe in eine Mauspopulation injiziert wird. Über den beobachteten Krankheitsverlauf kann dann auf die enthaltenen infektiösen Einheiten rückgeschlossen werden.

Weiters bemerkenswert erscheint (genauso wie in sämtlichen Optimierungsversuchen), dass das Molekulargewicht von PrP<sup>Sc</sup> aus Wasser geringer ist als jenes von PrP<sup>Sc</sup> aus einer Faulschlammatrix (siehe Abbildung 9), was sich in einer Bandenverschiebung von PrP<sup>Sc</sup> aus der Faulschlammatrix nach oben ergibt.

Tabelle 33: Übersicht der Versuche Validierung 1

Arbeitsprotokoll	Prionproteinquelle	Hirnhomogenat Konzentrationen	Matrix	Bemerkung
<b>02 08 02</b> 22A 2.1 301V 2.1 BSE 2.1	22A/SV Scrapie in Maus 301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	600 µg/ml 1200 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	<b>Eindeutiger Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>.</b> BSE an der Detektionsgrenze
<b>02 08 05</b> 22A 2.2 301V 2.2 BSE 2.3	22A/SV Scrapie in Maus 301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	600 µg/ml 1200 µg/ml 1200 µg/ml 2500 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	<b>Eindeutiger Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>.</b> 22A und 301V in Mesophil II an d. Detektionsgrenze
<b>02 08 06</b> 22A 2.3 301V 2.3 BSE 2.3	22A/SV Scrapie in Maus 301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	600 µg/ml 1200 µg/ml 1200 µg/ml 2500 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	<b>Eindeutiger Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>.</b> 22A und 301V in Mesophil II an d. Detektionsgrenze
<b>02 08 07</b> 22A 2.4 301V 2.4 BSE 2.4	22A/SV Scrapie in Maus 301V/VM BSE in Maus BSE in Rind	600 µg/ml 1200 µg/ml 600 µg/ml 1200 µg/ml	Mesophil Thermophil Mesophil II Wasser	<b>Eindeutiger Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>.</b> 22A und 301V in Mesophil II an d. Detektionsgrenze





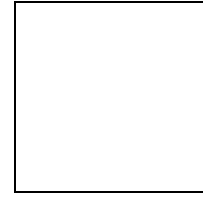
22A/SV Scrapie in Maus

3-6: Mesophiler Schlamm  
7-10: Themophiler Schlamm  
13-16: Schlamm Mesophil II  
17-20: Wasser



301V/VM BSE in Maus

23-26: Mesophiler Schlamm  
27-30: Themophiler Schlamm  
33-36: Schlamm Mesophil II  
37-40: Wasser



BSE in Rind

43-46: Mesophiler Schlamm  
47-50: Themophiler Schlamm  
53-56: Schlamm Mesophil II  
57-60: Wasser

Abbildung 9:02 08 05; Validierung 2: Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Faulschlamm

## B.6. ABBAUVERSUCHE

Arbeitsprotokolle und Auswertungen der Abbauversuche sind in Anhang VI angeführt.

Welche Folgen hat das Einbringen eines mit BSE infizierten Rindes (oder Teile davon) in eine anaerobe Fermentationsanlage (Biogasanlage) oder kann in weiterer Folge die Anaerobe Fermentation eine weitere Sicherheitsstufe zur Reduktion eines eventuellen BSE-Risikos in der Behandlung tierischer Nebenprodukte darstellen? Diese Frage stand am Anfang dieses Projektes. Nachdem in den Vorversuchen (siehe Kapitel B - B.5) bewiesen werden konnte, dass der Nachweis des mit BSE assoziierten Prionproteins in Faulschlamm tatsächlich möglich ist, wurden in Folge hier Inkubationsversuche durchgeführt.

Die Vorversuche zur Detektion von PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm wurden mit Maushirnhomogenat 22A/SV wegen des erwarteten hohen PrP<sup>SC</sup> Titors durchgeführt. Diese Modellschubstanz weist jedoch eine bedeutend geringere thermische Stabilität als BSE oder in Maus passiertes BSE (301V) auf. Das Hauptaugenmerk der Versuche war daher auf die Abbaukurve von in Maus passiertem BSE (301V) und BSE in Rind (BSE) gerichtet.

Eine technische Bedeutung hat dieses Verfahren nur wenn innerhalb von 10 Tagen (240 Stunden) ein Abbau zu verzeichnen wäre. Die Inkubationsversuche wurden daher nach einer Zeit von 260 bis 380 Stunden abgebrochen.

Tabelle 34: Übersicht über die Probenahmezeiten der Abbauversuche

<b>Abbau 1</b>	<b>meso/thermo</b>	<b>Abbau 2</b>	<b>meso</b>	<b>Abbau 3</b>	<b>thermo</b>	<b>Blank</b>	
<b>Ansatz: 1 - 4</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 5 - 13</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 14 - 22</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 23 - 28</b>	
<b>22A</b>		<b>22A/301V/BSE</b>		<b>22A/301V/BSE</b>		<b>301V</b>	
07.08.02 16:00	0	14.08.02 14:00	0	14.08.02 14:00	0	21.08.02 11:00	0
07.08.02 20:30	4,5	16.08.02 14:00	48,0	16.08.02 14:00	48,0	23.08.02 08:00	45,0
08.08.02 09:00	17,0	17.08.02 09:00	67,0	17.08.02 09:00	67,0	26.08.02 10:00	119,0
08.08.02 16:00	24,0	18.08.02 09:30	91,5	18.08.02 09:30	91,5	<b>30.08.02 12:00</b>	217,0
09.08.02 07:30	39,5	19.08.02 09:30	115,5	19.08.02 09:00	115,0		
14.08.02 14:00	166,0	22.08.02 09:30	187,5	20.08.02 13:00	143,0		
16.08.02 14:00	214,0	25.08.02 08:00	258,0	21.08.02 10:00	164,0		
17.08.02 09:00	233,0	27.08.02 08:30	306,5	22.08.02 09:30	187,5		
18.08.02 09:30	257,5	<b>30.08.02 12:00</b>	382,0	23.08.02 08:00	210,0		
<b>19.08.02 09:00</b>	281,0			24.08.02 08:00	234,0		
				26.08.02 10:00	284,0		
				27.08.02 08:30	306,5		
				<b>29.08.02 10:00</b>	356,0		
<b>Abbau 4</b>	<b>thermo</b>	<b>Abbau 5</b>	<b>thermo</b>	<b>Abbau 6</b>	<b>thermo</b>	<b>Abbau 7</b>	<b>thermo</b>
<b>Ansatz: 29 - 43</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 44 - 58</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 59 - 70</b>	<b>[h]</b>	<b>Ansatz: 71 - 82</b>	<b>[h]</b>
<b>22A/301V/BSE</b>		<b>22A/301V/BSE</b>		<b>301V</b>		<b>BSE</b>	
16.09.02 12:00	0,0	01.10.02 20:00	0,0	15.10.02 18:30	0,0	15.10.02 18:30	0,0
18.09.02 08:00	44,0	03.10.02 14:30	42,5	17.10.02 12:00	41,5	17.10.02 12:00	41,5
20.09.02 08:00	92,0	05.10.02 08:00	84,0	19.10.02 11:30	89,0	19.10.02 11:30	89,0
23.09.02 08:00	164,0	07.10.02 07:45	131,7	22.10.02 08:00	157,5	22.10.02 08:00	157,5
25.09.02 07:30	211,5	09.10.02 08:30	180,5	25.10.02 07:30	229,0	25.10.02 07:30	229,0
<b>27.09.02 08:00</b>	260,0	<b>11.10.02 08:00</b>	228,0	<b>28.10.02 08:30</b>	302,0	<b>28.10.02 08:30</b>	302,0

In einem 50 ml Glasröhrchen mit Teflonverschluss wurde unter CO<sub>2</sub>-Begasung Hirnhomogenat mit Faulschlamm unter mesophilen (35°C) und thermophilen Bedingungen (55°C) inkubiert (siehe Tabelle 35 und Tabelle 36). Die eingesetzte Hirnhomogenatkonzentration lag etwa beim 30-50 fachen Wert des ungefähren Detektionslimits des Hirnhomogenats.

Eine Analyse mittels Western-Blot stellt einen qualitativen Nachweis dar. Wenn man den unterschiedlichen Intensitäten des Signals entsprechende Zahlenwerte zuweist, kann daraus eine qualitative Abbaukurve ermittelt werden (Abbildung 13).

Die Abbaukurve wurde dadurch ermittelt, dass den Analyseergebnissen folgende Zahlenwerte zugewiesen wurde:

- Eindeutiger PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis: theoretische Wert der Hirnauftragsmenge der Ausgangsprobe auf das Gel (Zahlenwert je nach Auftragsvolumen: 120-500).
- Ergebnisse an der Detektionsgrenze: Zahlenwert der theoretischen Hirnauftragsmenge auf das Gel in den Kalibrationskurven in denen noch ein Signal ausgewertet werden konnte (Zahlenwert 9).
- Kein Signal: Zahlenwert 1 (um eine logarithmische Skalierung zu ermöglichen).
- 

Tabelle 35: Übersicht über die Probenahmezeiten der Abbaubersuche

<b>Abbau 1</b> meso/thermo	<b>Abbau 2</b> meso	<b>Abbau 3</b> thermo	<b>Blank</b>
<b>Ansatz: 1 - 4</b> [h]	<b>Ansatz: 5 - 13</b> [h]	<b>Ansatz: 14 - 22</b> [h]	<b>Ansatz: 23 - 28</b> [h]
<b>22A</b>	<b>22A/301V/BSE</b>	<b>22A/301V/BSE</b>	<b>301V</b>
07.08.02 16:00 0	14.08.02 14:00 0	14.08.02 14:00 0	21.08.02 11:00 0
07.08.02 20:30 4,5	16.08.02 14:00 48,0	16.08.02 14:00 48,0	23.08.02 08:00 45,0
08.08.02 09:00 17,0	17.08.02 09:00 67,0	17.08.02 09:00 67,0	26.08.02 10:00 119,0
08.08.02 16:00 24,0	18.08.02 09:30 91,5	18.08.02 09:30 91,5	<b>30.08.02 12:00</b> 217,0
09.08.02 07:30 39,5	19.08.02 09:30 115,5	19.08.02 09:00 115,0	
14.08.02 14:00 166,0	22.08.02 09:30 187,5	20.08.02 13:00 143,0	
16.08.02 14:00 214,0	25.08.02 08:00 258,0	21.08.02 10:00 164,0	
17.08.02 09:00 233,0	27.08.02 08:30 306,5	22.08.02 09:30 187,5	
18.08.02 09:30 257,5	<b>30.08.02 12:00</b> 382,0	23.08.02 08:00 210,0	
<b>19.08.02 09:00</b> 281,0		24.08.02 08:00 234,0	
		26.08.02 10:00 284,0	
		27.08.02 08:30 306,5	
		<b>29.08.02 10:00</b> 356,0	
<b>Abbau 4</b> thermo	<b>Abbau 5</b> thermo	<b>Abbau 6</b> thermo	<b>Abbau 7</b> thermo
<b>Ansatz: 29 - 43</b> [h]	<b>Ansatz: 44 - 58</b> [h]	<b>Ansatz: 59 - 70</b> [h]	<b>Ansatz: 71 - 82</b> [h]
<b>22A/301V/BSE</b>	<b>22A/301V/BSE</b>	<b>301V</b>	<b>BSE</b>
16.09.02 12:00 0,0	01.10.02 20:00 0,0	15.10.02 18:30 0,0	15.10.02 18:30 0,0
18.09.02 08:00 44,0	03.10.02 14:30 42,5	17.10.02 12:00 41,5	17.10.02 12:00 41,5
20.09.02 08:00 92,0	05.10.02 08:00 84,0	19.10.02 11:30 89,0	19.10.02 11:30 89,0
23.09.02 08:00 164,0	07.10.02 07:45 131,7	22.10.02 08:00 157,5	22.10.02 08:00 157,5
25.09.02 07:30 211,5	09.10.02 08:30 180,5	25.10.02 07:30 229,0	25.10.02 07:30 229,0
<b>27.09.02 08:00</b> 260,0	<b>11.10.02 08:00</b> 228,0	<b>28.10.02 08:30</b> 302,0	<b>28.10.02 08:30</b> 302,0

Tabelle 36: Übersicht über die Ansätze des Abbauersuches

Ansatz	Proben Nr.	Datum	Stunden	Temperatur:	Matrix		PrPsc	Ansatz Matrix [ ml ]	Ansatz Prpsc [ µl ]
Abbau 1	1 - 2	07.08.-19.08.02	281	mesophil	AD-M meso	Abbau	22A/SV	6,8	750
	3 - 4	07.08.-19.08.03		thermophil	AD-M thermo	Abbau	22A/SV	6,8	750
Abbau 2	5 - 7	14.08.-30.08.02	382	mesophil	AD-M meso	Abbau	22A/SV	14,0	700
	8 - 10	14.08.-30.08.02		mesophil	AD-M meso	Abbau	301V/VM	14,0	700
	11 - 13	14.08.-30.08.02		mesophil	AD-M meso	Abbau	BSE	14,0	700
Abbau 3	14 - 16	14.08.-29.08.02	356	thermophil	AD-M thermo	Abbau	22A/SV	14,0	700
	17 - 19	14.08.-29.08.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	14,0	700
	20 - 22	14.08.-29.08.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	BSE	14,0	700
	23 - 25	21.08.-30.08.02	217	thermophil	Wasser	Blindwert	301V/VM	14,0	700
	26 - 28	21.08.-30.08.02		thermophil	AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	14,0	700
Abbau 4	29 - 31	16.09.-27.09.02	260	thermophil	Wasser	Blindwert	301V/VM	10,0	500
	32 - 34	16.09.-27.09.02		thermophil	AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	10,0	500
	35 - 37	16.09.-27.09.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	10,0	500
	38 - 40	16.09.-27.09.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	22A/SV	10,0	500
	41 - 43	16.09.-27.09.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	BSE	10,0	500
Abbau 5	44 - 46	01.10.-11.10.02	228	thermophil	Wasser	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	47 - 49	01.10.-11.10.02		thermophil	AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	50 - 52	01.10.-11.10.02		thermophil	AD-M thermo, Azid	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	53 - 55	01.10.-11.10.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	15,0	750
	56 - 58	01.10.-11.10.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	BSE	15,0	750
Abbau 6	59 - 61	15.10.-28.10.02	302	thermophil	Wasser	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	62 - 64	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo, Azid	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	65 - 67	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	301V/VM	5,0	250
	68 - 70	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	15,0	750
Abbau 7	71 - 73	15.10.-28.10.02	302	thermophil	Wasser	Blindwert	BSE	5,0	250
	74 - 76	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo, Azid	Blindwert	BSE	5,0	250
	77 - 79	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo, sterilisiert	Blindwert	BSE	5,0	250
	80 - 82	15.10.-28.10.02		thermophil	AD-M thermo	Abbau	BSE	15,0	750

Eine Zusammenfassung der Abbaukurven (nach PrP<sup>Sc</sup>-Quelle geordnet) sind in Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 zu sehen ( Proben mit eindeutigem PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis wurden mit dem Zahlenwert der Hirnauftragsmenge der jeweiligen Probe auf das Gel belegt. Resultate an der Nachweisgrenze wurden mit dem Zahlenwert der Detektionsgrenze von 8,9 µg und negative Ergebnisse mit dem Zahlenwert 1 belegt.).

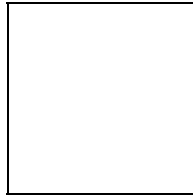


Abbildung 10: Qualitative Abbaukurve von Scrapie unter anaeroben Bedingungen

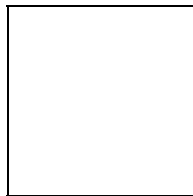


Abbildung 11: Abbau von 301V BSE in Maus unter anaeroben Bedingungen

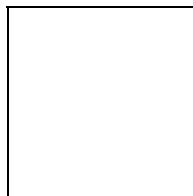


Abbildung 12: Abbau von BSE in Rind unter anaeroben Bedingungen

Tabelle 37: Übersicht der erreichten Reduktionsfaktoren

Ansatz	Temp.	Matrix		PrPsc	Red.-faktor	Red. F. 10 <sup>x</sup>	Erreicht in [ h ]
Abbau 1 (281 h)	35°C	AD-M meso	Abbau	22A/SV	27,3	1,4	n.i.V.
	55°C	AD-M thermo	Abbau	22A/SV	27,3	1,4	n.i.V.
Abbau 2 (382 h)	35°C	AD-M meso	Abbau	22A/SV	13,1	1,1	n.i.V.
	<b>35°C</b>	<b>AD-M meso</b>	<b>Abbau</b>	<b>301V/VM</b>	<b>13,1</b>	<b>1,1</b>	<b>382</b>
	35°C	AD-M meso	Abbau	BSE	13,1	1,1	n.i.V.
Abbau 3 (356 h)	55°C	AD-M thermo	Abbau	22A/SV	13,1	1,1	n.i.V.
	55°C	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	13,1	1,1	n.i.V.
	55°C	AD-M thermo	Abbau	BSE	13,1	1,1	n.i.V.
(217h)	55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	13,1	1,1	n.i.V.
	55°C	AD-M thermo, ster.	Blindwert	301V/VM	13,1	1,1	217
Abbau 4 (260h)	55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	15,1	1,2	n.i.V.
	55°C	AD-M thermo, ster.	Blindwert	301V/VM	44,9	1,7	164
	55°C	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	15,1	1,2	n.i.V.
	<b>55°C</b>	<b>AD-M thermo</b>	<b>Abbau</b>	<b>22A/SV</b>	<b>44,9</b>	<b>1,7</b>	<b>164</b>

	<b>55°C</b>	<b>AD-M thermo</b>	<b>Abbau</b>	<b>BSE</b>	<b>15,1</b>	<b>1,2</b>	<b>164</b>
Abbau 5 (228h)	55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	n.a.		n.a.
	55°C	AD-M thermo, ster.	Blindwert	301V/VM	n.a.		n.a.
	55°C	AD-M thermo, Azid	Blindwert	301V/VM	n.a.		n.a.
	55°C	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	n.a.		n.a.
	<b>55°C</b>	<b>AD-M thermo</b>	<b>Abbau</b>	<b>BSE</b>	<b>15,1</b>	<b>1,2</b>	<b>228</b>
Abbau 6 (302h)	55°C	Wasser	Blindwert	301V/VM	29,8	1,5	302
	55°C	AD-M thermo, Azid	Blindwert	301V/VM	29,8	1,5	89
	55°C	AD-M thermo, ster.	Blindwert	301V/VM	29,8	1,5	41,5
	55°C	AD-M thermo	Abbau	301V/VM	29,8	1,5	302
Abbau 7 (302h)	55°C	Wasser	Blindwert	BSE	29,8	1,5	302
	55°C	AD-M thermo, Azid	Blindwert	BSE	29,8	1,5	157
	55°C	AD-M thermo, ster.	Blindwert	BSE	29,8	1,5	41,5
	55°C	AD-M thermo	Abbau	BSE	29,8	1,5	229

n.iV...nicht im Versuchszeitraum

n.A. ... nicht auswertbar

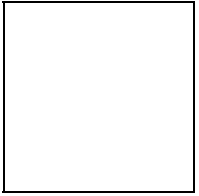


Abbildung 13: Abbaukurve von 301V und BSE unter thermophilen Bedingungen.

Eine Inkubation von PrP<sup>SC</sup> unter mesophilen Bedingungen (35°C) führt im Zeitraum von 380 Stunden (~16 Tage) zu keiner Reduktion. Eine Inkubation von PrP<sup>SC</sup> unter thermophilen Bedingungen (55°C) führt in der angestrebten Versuchsdauer zu einer Reduktion von PrP<sup>SC</sup> um eine Zehnerpotenz. Die Wiederholungen der Abbauxperimente wurden daher nur unter thermophilen Bedingungen durchgeführt.

Wie an den Abbaukurven und Tabelle 37 abzulesen ist, konnte der Abbau von PrP<sup>SC</sup> unter anaeroben Bedingungen in der vorgegebenen Zeit nur um den Faktor 10<sup>1,1</sup> - 10<sup>1,5</sup> erzielt werden.

Bemerkenswert erscheint hier, dass PrP<sup>SC</sup> während einer Inkubation mit sterilisiertem oder mit Natriumazid (1% w/v) inaktiviertem Faulschlamm in bedeutend kürzerer Zeit nicht mehr nachweisbar ist als während der Inkubation mit aktivem Faulschlamm. Die Reduktionskurve von PrP<sup>SC</sup> in wässriger Suspension unter gleichen Temperaturbedingungen ist mit jener der Inkubation mit aktivem Faulschlamm sehr ähnlich (siehe Abbildung 13). Der Unterschied zwischen den beiden Abbaukurvengruppen (Inkubation in Wasser und aktivem Faulschlamm versus Inkubation in sterilisiertem oder inhibiertem Faulschlamm) ist augenscheinlich und signifikant (siehe Abbildung 13).

PrP<sup>SC</sup> ist in Vertebraten ein Membranprotein. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass in sterilisiertem und inhibiertem Faulschlamm sehr viel mehr an geborstenen bzw. autolytierten Zellen der Biomasse vorhanden sind. Eine verstärkte An- bzw. Einlagerung in diese Fragmente, führt zu diesen beobachteten Wiederfindungsergebnissen.

Diese Experimente lassen sehr bedingt den Schluss zu, dass die anaerobe Verwertung nicht als eine zusätzliche Reduktionsstufe nach einer Sterilisierung von BSE infiziertem Material zulässig ist. Zu Beachten ist jedoch, dass diese Versuche nur in sehr kleinem Maßstab durchgeführt wurden. Ein Abbau in einem größeren Maßstab kann völlig konträre Ergebnisse liefern. Es besteht daher noch weiterer Forschungsbedarf. Insbesondere in der Entwicklung von Expositionsmodellen, mit denen ein solcher Abbau mit geringerem Hirnhomogenateinsatz in einem größeren Maßstab durchgeführt werden kann.

In diesen Experimenten wurde keine Optimierung des Abbaus von PrP<sup>SC</sup> unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Eine Optimierung der Abbaubedingungen oder eine Vorbehandlung des Hirnhomogenats muss in nachfolgenden Experimenten noch überprüft werden.

Weiters wurde mit diesen Experimenten nur das Prionprotein beobachtet. Es gibt in der wissenschaftlichen Gemeinschaft Zweifel daran, ob die Infektiosität unbedingt immer gleichzeitig mit dem Prionprotein auftritt (wenngleich dies meistens der Fall ist). Eine Verlaufskurve der Infektiosität während der Inkubation unter anaeroben Bedingungen würde ein unumstößlicheres Ergebnis liefern.



## **B.7. HÄMOSAN**

Im Projektantrag ist die Verwendung sowohl des Prionics-Check Wester wie auch des Prionenanalyseverfahrens von Hämosan (HS-Assay) vorgesehen, dessen Entwicklung zur Marktreife während der Projektlaufzeit vorgesehen war. Der HS-Assay ist derzeit jedoch noch nicht marktreif und wird weiterentwickelt.

Die Nachweisbarkeit des Prionoproteins in Faulschlamm mit Alternativmethoden (BioRad Platelia<sup>®</sup> und HS-Assay) wurde von der Fa. Hämosan durchgeführt (Siehe Anhang V.5). Wie mit dem weiterentwickelten Nachweisverfahren auf Western-Blot Basis ist PrP<sup>SC</sup> in Faulschlamm wiederfindbar. Dies gibt den Hinweis, dass die selbst erzielten Ergebnisse keine Falsch-positiven Ergebnisse darstellen.

## **C. LITERATUR**

Eine über 200 Einträge umfassende Literaturdatenbank wurde während des Projekts am IFA-Tulln angelegt. Die wichtigsten Stellen und weiterführenden Übersichtswerke sind im Folgenden angeführt.

Advances in Protein Chemistry, Volume 57, Prion Proteins

Ed. B. Caughey

Academic Press, 2001, ISBN 0-12-034257-X

Contributions to Microbiology, Vol. 7, 2001:

Prions A Challenge for Science, Medicine and Public Health System,

Eds.: H.F. Rabenau, J. Cinatl, H.W. Doerr, 2001, Karger ISBN 3-8055-7124-0

Prionen und Prionenkrankheiten

Hg: B. Hörnlimann, D. Riesner, H. Kretzschmar

De Gruyter, 2001, ISBN: 3-11-016361-6

Methods in Enzymology, Volume 309, Amyloid, Prions, and other Protein Aggregates

Ed.: R. Wetzel

Academic Press, 1999, ISBN:0-12-182210-9

Prion Disases - Diagnosis and Pathogenesis

Eds.: M.H. Groschup and H.A. Kretzschmar

Springer, 2000, ISBN: 3-211-83530-X

European Commission, Directorate-General XXIV, Consumer Policy and Consumer Health

Protection, Directorate B - Scientific Health Opinions, Unit B3, management of scientific committees II: The evaluation of test for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in bovines, 8 July 1999

Entscheidung der Kommission der EU, Brüssel, 1996: 96/446/EG

- Taylor, D.M., et. al., 1995: Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures; *Veterinary Record*, 137, 605-610
- Gale, P. and Stanfield, G., 2001: Towards a quantitative risk assessment for BSE in sewage sludge;  
*J. Appl. Microbiol.*, 91, 563-569
- Asmussen, S. and Baum, A., 2001: BSE und Entsorgung. Besteht eine Gefährdung durch die Abwasser und Schlammverwertung?; *KA-Wasserwirtsch., Abw., Abf.*, 48/Nr.6
- Manual of standards for diagnostic tests and vaccines (1996)  
[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a\\_00057.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00057.htm)
- Gideon Shaked, Gilgi Fridlander, Zeev Meiner, Albert Taraboulos, Ruth Gabizon, (1999)  
Protease-resistant and Detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity  
*The Journal of Biological Chemistry* (1999), 274(25), pp. 17981-17986
- Rudolf K. Meyer, Bruno Oesch, Rosmarie Fatzer, Andreas Zurbriggen, Marc Vandeveld  
Detection of Bovine Spongiform Encephalopathie-Specific PrP<sup>Sc</sup> by treatment with heat and Guanidine Thiocyanate  
*Journal of Virology* (1999), 73 (11), pp. 9386-9392

## **D. ADRESSEN**

### **Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh (IAH-E)**

Dr. Robert Somerville robert.somerville@bbsrc.ac.uk	Ogston Building West Mains Road Edinburgh EH9 3JF
Dr. Joanne Rodger	
Karen Fernie, MSc.	

### **Hämosan Life Science Services**

Mag. Herwig Reichl herwig.reichl@haemosan.com	Vienna Biocenter Dr.Bohrgasse 7b 1030 Wien Tel: 01/7966399-0
Dr. Roland Palkovits	
Mag. Heinz Winkler	

### **AGES für vet. med. Untersuchungen Mödling**

HR Prof. Dr. Walter Schuller	Robert Koch Gasse 17 2340 Mödling Tel.: 02236/46640-0
Dr. Hermann Schildorfer hermann.schildorfer@vmmoe.ages.at	

### **Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie Tulln, Abteilung Umweltbiotechnologie (IFA-Tulln)**

Prof. Dr. Rudolf Braun braun@ifa-tulln.ac.at	3430 Tulln Tel: 02272/66280-502
DI Roland Kirchmayr kirchmayr@ifa-tulln.ac.at	
Konrad Lorenz Straße 20	

## E. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD-M	.....Faulschlamm (Anaerobic Digestion Matrix)
AEBSF	.....4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
BM	.....Biomasse = Faulschlamm
BSA	.....Bovine Serum Albumin
EDTA	.....Ethylendiamintetraessigsäure
FS	.....Faulschlamm
GuSCN	.... Guanidinthiocyanat
HH	.....Hirnhomogenat
IAH-E	.....Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh
OIE	.....Office international d'Epizooties, Paris
PAGE	.....Polyacrylamid Gelelektrophorese
PK	.....Proteinase K
PMSF	.....Phenylmethanesulfonyl fluoride; Benzylsulfonyl fluoride; Phenylmethylsulfonyl fluoride
PrP <sup>C</sup>	.....Prionprotein physiologische Form
PrP <sup>SC</sup>	.....Prionprotein Scrapie-Form (pathologische Form)
rpm	.....Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SDS	.....Natriumlaurylsulfat, Sodiumdodecylsulfat
TBST	.....Tris buffered Saline, Tween 20
Temp.	.....Temperatur
WF	.....Wiederfindung
z.T.	.....zum Teil