

Abbau von Prion-Protein durch die bovine Gastrointestinalflora Degradation of prion protein by the bovine gastrointestinal microflora

C. SCHERBEL und M. GAREIS

Zusammenfassung

Ziel der Studie war es, die Stabilität von Prion-Proteinen PrP^{Sc} im Gastrointestinaltrakt von Rindern zu untersuchen, um Aussagen zur Verbreitung und Ausscheidung von TSE-Erregern treffen zu können. In der Regel werden Proteine aus Futtermitteln im polygastrischen Verdauungssystem der Wiederkäuer nahezu vollständig verdaut. Um zu überprüfen, ob dies auch auf die Struktur des Prion-Proteins zutrifft, wurde die komplexe Mikroflora des bovinen Gastrointestinaltraktes auf die Fähigkeit des PrP^{Sc}-Abbaus getestet. Dabei konnte Scrapie (263K)-assoziiertes PrP^{Sc} nach einer Inkubation von bis zu 40 Stunden sowohl mit bovinem Pansen- als auch mit Coloninhalt im Western Blot immunochemisch nicht mehr nachgewiesen werden, während BSE-assoziiertes PrP^{Sc} unter identischen Bedingungen nicht abgebaut werden konnte. Um Aussagen über eine Inaktivierung von PrP^{Sc} durch die bovine Gastrointestinalflora treffen zu können, wurden Tierversuche durchgeführt. Obwohl PrP^{Sc} im Western Blot immunochemisch nicht detektierbar war, konnte im Tierversuch dennoch eine signifikante Prioninfektiosität nachgewiesen werden.

Folglich kann eine potentielle Kontamination der Umwelt durch das Ausscheiden von infektiösem Material via Faeces nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigen diese Daten den Bedarf an alternativen Nachweismethoden bezüglich der Diagnose von TSE-Erkrankungen und hinterlassen Diskussionsbedarf zur tatsächlichen Erregeratur.

Summary

The influence of a complex microflora residing in the gastrointestinal tract of cattle on prion protein plays a crucial role with respect to early TSE pathogenesis and the potential infectivity of faeces resulting in environmental contamination. However, it is unknown whether infectious prion proteins, considered to be very stable, are inactivated by microbial processes in the gastrointestinal tract of animals. In this study, rumen and colon contents from healthy cattle, taken immediately after slaughter, were used to assess the ability of these microbial consortia to inactivate PrP^{Sc}. Biochemical analyses indicate the ability of complex ruminal and colonic microbiota of cattle to decrease scrapie associated prion protein up to immunochemically undetectable levels in Western blot. In contrast, incubation with BSE associated prion protein (PrP^{Sc}) did not result in degradation. This implicates a greater stability of BSE associated prion protein (PrP^{Sc}) towards microbial degradation processes in the gastrointestinal tract. *In vivo* hamster bioassays were performed with degraded samples of scrapie brain homogenates in order to prove the concomitance of the loss of anti-prion antibody 3F4 immunoreactivity and the inactivation of PrP^{Sc}. The results demonstrated significant prion infectivity after degradation of infected hamster brain through the gastrointestinal microflora of cattle. Thus, infectivity is still present, even in the absence of Western blot signals.

Conclusively, these data raise the risk that the environment might be contaminated through cattle shedding infective material via faeces. Moreover, the possibility of present infectious molecules or structures other than PrP^{Sc} must be considered.

Schlüsselwörter

Scrapie – BSE – Prion – Pansen – Colon – Abbau – Inaktivierung – bovin – Gastrointestinaltrakt

Key Words

scrapie – BSE – prion – rumen – colon – degradation – infectivity – bovine – gastrointestinal microflora

Einleitung

Als Prionerkrankungen oder Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) bezeichnet man eine Gruppe von Krankheiten, die bei Menschen und Tieren auftreten und durch die Zerstörung des Hirngewebes gekennzeichnet sind. Dazu gehören u. a. die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) des Menschen, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) der Rinder und die Traberkrankheit (Scrapie) der Schafe und Ziegen. Es handelt sich dabei um übertragbare (transmissible), infektiöse Erkrankungen des Zentralnervensystems, die nach einer Inkubationszeit über mehrere Monate bzw. Jahre immer tödlich verlaufen. Der Begriff „spongiforme Enzephalopathie“ beruht auf den histopathologischen Veränderungen im Gehirn, die durch schwammartige Vakuolisierungen des Gewebes charakterisiert sind. Gemäß der Prion-Hypothese, die Stanley Prusiner in den 80er Jahren postulierte, gilt das pathologische Prion-Protein als TSE-Erreger. Es handelt sich dabei um einen proteinartigen, nukleinsäurefreien, infektiösen Partikel (PRUSINER, 1982). Die definitive Diagnose der Prionerkrankungen kann bislang erst postmortem anhand der histopathologischen Veränderungen oder dem biochemischen Nachweis des pathologischen Prion-Proteins im Gehirn gestellt werden.

Auffallendes Merkmal dieser Krankheiten ist die Ansammlung von körpereigenen Proteinen im Zentralnervensystem betroffener Organismen, den sog. Prion-Proteinen (PrP), welche durch das Prion-Proteingene (PRNP) kodiert sind. Alle bislang bei Säugetieren untersuchten Prion-Proteingene haben eine ähnliche Struktur und kodieren für ein ca. 250 Aminosäuren (AS) langes Protein. So zeigte sich beispielsweise eine 85%ige Übereinstimmung der AS-Sequenz des PrP von Mensch, Maus, Schaf und Rind. Das PrP kann in zwei unterschiedlichen Formen auftreten: einer zellulären, physiologischen Form (PrP^{C}) und einer mit der Krankheit assoziierten, pathologischen Form (PrP^{Sc}).

PrP^{C} ist ein monomeres, membrangebundenes Glykoprotein, das vorwiegend auf

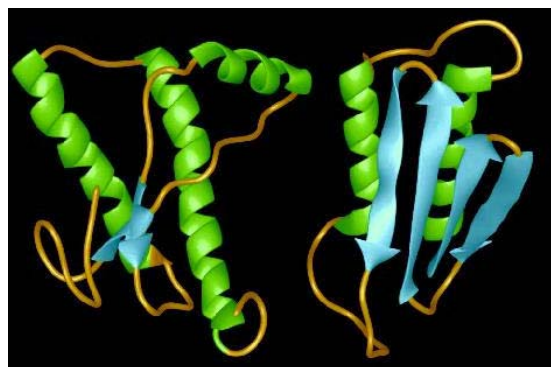


Abb. 1: Dreidimensionale Strukturen von PrP^{C} und PrP^{Sc} (α -Helices in grün; β -Faltblätter in blau)

der Oberfläche von Neuronen lokalisiert ist und jedoch auch in einer Vielzahl anderer Zellen exprimiert wird. PrP^{Sc} hingegen bildet große Aggregate in Form von amyloiden Strukturen, die aus einzelnen Proteinketten bestehen. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Formen in ihrer dreidimensionalen Struktur (Abb. 1). PrP^{C} besteht vorwiegend aus α -Helices, während bei PrP^{Sc} der Anteil an β -Faltblätter erhöht ist. Nach der Infektion mit Prionen findet die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} statt, was auf eine Veränderung der Faltung des Moleküls beruht, und durch PrP^{Sc} katalysiert wird. Weitere Unterschiede zeigen sich auch in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Formen. Aufgrund der starken Tendenz zur Aggregation zeigt PrP^{Sc} eine hohe Stabilität gegenüber konventionellen Inaktivierungsverfahren, wie Hitze, extremen pH-Werten, UV-Strahlung, Desinfektionsmitteln und Proteasen. Biochemisch können die beiden PrP-Formen mit einer Proteinase K (PK)-Verdau unterschieden werden. PrP^{C} wird dabei vollständig abgebaut, während von PrP^{Sc} nur die ersten 60-80 AS verdaut werden. Das verbleibende Proteinfragment mit einem Molekulargewicht von 27-30 kDa ist resistent und infektiös. Es dient als biochemischer Marker zum Nachweis von TSE-Erkrankungen.

Ziel des Forschungsprojekts war es, die Stabilität von PrP^{Sc} im Gastrointestinaltrakt von Rindern zu untersuchen, um Aussagen zur Verbreitung und Ausscheidung von TSE-Erregern treffen zu können. Bislang ist nicht bekannt, ob infektiöse Prion-

Proteine während der Verdauung durch mikrobielle Prozesse abgebaut und inaktiviert werden. In der Regel werden Proteine aus Futtermitteln im polygastrischen Verdauungssystem der Wiederkäuer nahezu vollständig verdaut. Während bis zu 90 % der Proteine im Pansen vorwiegend durch Bakterien fermentativ abgebaut werden, erfolgt ein weiterer Protein-Abbau durch proteolytische Bakterien der Mikroflora im Colon. Um zu überprüfen, ob dies auch auf die Struktur des Prion-Proteins zutrifft, wurde die komplexe Mikroflora des bovinen Gastrointestinaltraktes auf die Fähigkeit des PrP^{Sc}-Abbaus getestet.

Material und Methoden

Für die Inkubationsstudien wurden Gastrointestinalinhalte von frisch geschlachteten Mastbullen verwendet. Hierfür wurden bovine Panseninhalte und ein Stück des *Colon ascendens* im Schlachthof steril entnommen und im Labor homogenisiert. Des Weiteren wurden Hirnhomogenate von Scrapie (Stamm 263K) infizierten Hamstern und BSE infizierten Rindern hergestellt. Für die PrP^{Sc}-Degradationsassays wurden die bovinen Gastrointestinalinhalte zusammen mit infiziertem Hirnmaterial unter anaeroben und aeroben Bedingungen bis zu 40 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Positiv- und Negativkontrollen analog behandelt. Die immunochemische Detektion von PrP^{Sc} erfolgte nach PK-Verdau, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot mit verschiedenen Antikörpern, die an unterschiedlichen Epitopen des Prion-Proteins binden (SCHALLER *et al.*, 1999). In einer Infektionsstudie wurden ausgewählte Inkubate im Hamster-Bioassay in Zusammenarbeit mit dem Friedrich-Löffler-Institut in Riems auf Prion-Infektiosität überprüft. Es wurden jeweils 30 µl der Probe Syrischen Goldhamstern intracerebral inokuliert. Nach dem Einsetzen der klinischen Symptome wurde PrP^{Sc} im Gehirn der Tiere immunochemisch zur Bestätigung nachgewiesen. Vor der Inokulation wurden die Proben vorbehandelt, um bakterielle Entzündungen, die das Überleben der Tiere negativ beeinflussen, zu vermeiden. Um die Bakterienzahl in

den Proben zu reduzieren ohne dabei das PrP^{Sc}-Signal im Western Blot zu beeinträchtigen, wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt. Die Intestinalinhalte wurden mit PrP^{Sc}-haltigem Hirnmaterial versetzt und behandelt. Dabei stellte sich der mechanische Zellaufschluss als die am besten geeignete Methode dar: die Bakterienzellen wurden dabei durch sehr stark beschleunigte Keramik-, Glas- und Silikatpartikel zerrieben. Dafür wurden 300 µl des Ansatzes in Ribolyser Tubes Lysing Matrix E pipettiert und für 45 sec Speed 5.5 im Hybaid RiboLyserTM platziert. Die Keramik- und Silikatpartikel wurden durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 2 min entfernt. Der PrP^{Sc}-haltige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Ergebnisse und Diskussion

Kontrollexperimente der Degradationsassays

Verschiedene Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um den Einfluss der komplexen Gastrointestinalmatrix auf die Detektion von PrP^{Sc} untersuchen (Abb. 2). Dabei zeigten die Negativkontrollen mit dem Zusatz von normalem Hirnhomogenat bzw. Puffer im Western Blot kein Signal (Abb. 2, A-C). Bei den Positivkontrollen mit infiziertem Hirnhomogenat und inaktiviertem Gastrointestinalhomogenat bzw. Puffer blieb das PrP^{Sc}-Signal nach 20-stündiger Inkubation stabil (Abb. 2, D und E). Folglich hat die komplexe Mikroflora des Gastrointestinaltraktes keinen Einfluss auf die Detektion von PrP^{Sc}.

Degradationsassay mit Scrapie (263K) assoziiertem Prion-Protein

In den mikrobiell aktiven Ansätzen mit dem Zusatz von Scrapie (263K) infizierten Hamsterhirnhomogenat war PrP^{Sc} nach einer anaeroben Inkubation von 20 Stunden sowohl mit Pansen- als auch mit Coloninhalt im Western Blot nicht mehr nachweisbar (Abb. 3). Insgesamt wurden jeweils 21 Degradationsassays durchgeführt. Die Wiederholbarkeit dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 dargestellt (SCHERBEL *et al.*, 2006).

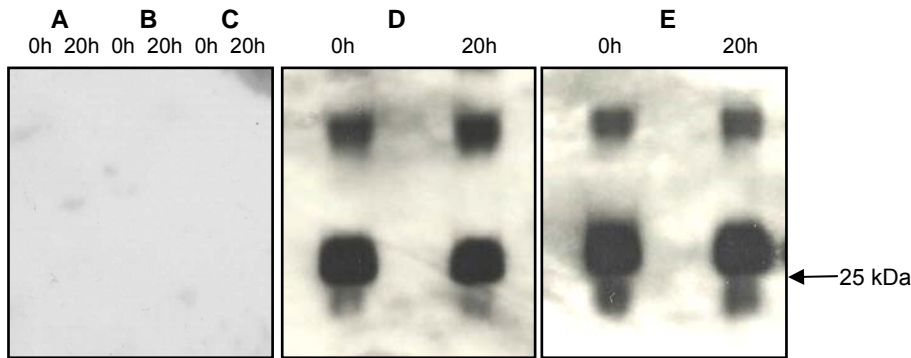


Abb. 2: Biochemische Analyse der Kontrolleexperimente. Negativkontrollen: A, aktive Mikroflora + normales Hamsterhirnhomogenat; B, aktive Mikroflora + Puffer; C, inaktive Mikroflora + normales Hamsterhirnhomogenat. Positivkontrollen: D, inaktive Mikroflora + Scrapie infiziertes Hamsterhirnhomogenat; E, Puffer + Scrapie infiziertes Hamsterhirnhomogenat

Tab. 1: Bestimmung des PrP^{Sc}-Abbaus in den anaeroben Degradationsassays

Anzahl der anaeroben Degradationsassays	PrP ^{Sc} -Abbau				
	vollständig ¹	fast vollständig ²	deutlich ³	schwach ⁴	kein ⁵
Pansen (n = 21)	9	4	5	2	1
Colon (n = 21)	11	4	4	1	1

¹kein PrP^{Sc}-Signal; ²sehr schwaches PrP^{Sc}-Signal; ³schwaches PrP^{Sc}-Signal; ⁴deutliches PrP^{Sc}-Signal; ⁵unverändertes PrP^{Sc}-Signal im Immunoblot detektierbar

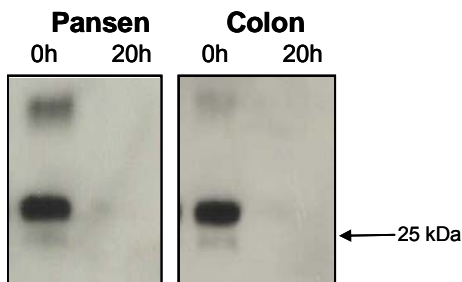


Abb. 3: Biochemische Analyse der mikrobiell aktiven Ansätze

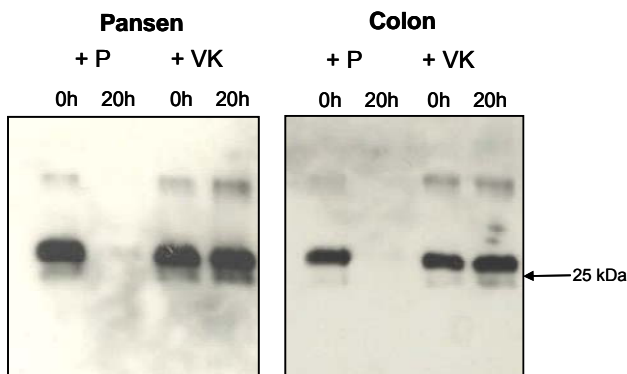


Abb. 4: Biochemische Analyse der selektiven Degradationsassays mit dem Zusatz von Antibiotika (P: Polymyxin-B-Sulfat; VK: Vancomycin-Kanamycin-Supplement)

Um die PrP^{Sc} abbauenden Mikroorganismen zu charakterisieren, wurden selektive Degradationsassays mit dem Zusatz von Antibiotika durchgeführt. Dabei wurde Polymyxin-B-Sulfat [P] verwendet, was gegen die gramnegativen Mikroorganismen wirkt. Zum anderen wurde Vancomycin-Kanamycin-Supplement [VK] eingesetzt zur Hemmung der grampositiven Mikroorganismen. PrP^{Sc} ist unter Zusatz von Polymyxin-B-Sulfat nach 20-stündiger Inkubation sowohl mit Pansen- als auch mit Colinhalt immunochemisch nicht mehr detektierbar (Abb. 4). In Gegenwart von Vancomycin-Kanamycin-Supplement hingegen bleibt das PrP^{Sc}-Signal nach 20 Stunden Inkubation stabil (Abb. 4). Der Abbau von PrP^{Sc} erfolgt daher durch die grampositiven Mikroorganismen des bovinen Pansens und Colons. Des Weiteren wurde die immunochemische Detektion von PrP^{Sc} mit mehreren Antikörpern durchgeführt. Die verwendeten Antikörper binden jeweils an unterschiedlichen spezifischen Epitopen des PK-resistenten Prion-Protein-Fragments (Abb. 5). Nach 20-stündiger Inkubation mit Panseninhalt ist PrP^{Sc} mit den Antikörpern 3F4, 14D11 (Abb. 6) und 6H4 immunochemisch im

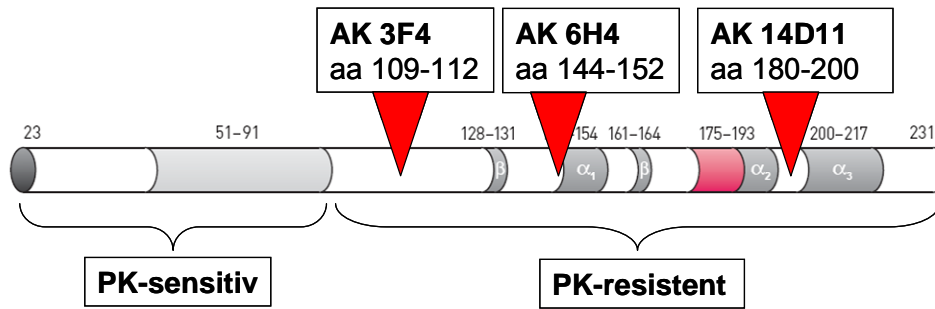


Abb. 5: Darstellung der Aminosäuresequenz des PrP-Proteins mit den spezifischen Antikörperbindestellen

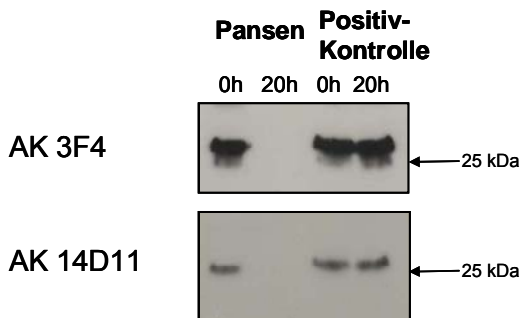


Abb. 6: Biochemische Analyse der mikrobiell aktiven Ansätze mittels unterschiedlicher Antikörper (AK)

lebenszeit der Hamster im Vergleich zur Positivkontrolle nachgewiesen (Tab. 2). Somit sind die Proben infektiös, obwohl PrP^{Sc} im Western Blot immunochemisch nicht detektierbar war. Folglich korrelieren die Resultate der biochemischen Analyse nicht mit denen des Bioassays.

Dies wäre durch eine fehlende Sensitivität der immunochemischen Nachweismethode erklärbar. So könnten gewisse Mengen an PrP^{Sc} unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots bzw. eine nicht detektierbare Subfraktion von PrP^{Sc} die Infektiosität verursachen. Darüber hinaus könnten aber auch andere infektiöse Moleküle oder mögliche virale Strukturen unabhängig von PrP^{Sc} vorhanden sein, welche vor kurzem in Scrapie und CJD infizierten Zellkulturen nachgewiesen wurden (MANUELIDIS *et al.*, 2007).

Western Blot nicht mehr nachweisbar. Folglich wird PrP^{Sc} durch die bovine Gastrointestinalflora vollständig degradiert.

Infektionsstudie mit Scrapie (263K) assoziiertem Prion-Protein

In etlichen Publikationen wird eine Korrelation zwischen der Menge an PrP^{Sc} und der Prion-Infektiosität beschrieben (BAIER *et al.*, 2004; CAUGHEY *et al.*, 1997; MCKINLEY *et al.*, 1983). Um zu überprüfen, ob PrP^{Sc} durch die komplexe Gastrointestinalflora von Rindern nicht nur abgebaut, sondern auch inaktiviert wird, wurden Infektionsstudien durchgeführt. Dabei wurden die degradierten Proben im Hamster-Tierversuch auf Prion-Infektiosität untersucht. Die Ansätze wurden vor der intracerebralen Inokulation zur Reduzierung der Bakterienkeimzahl auf $\leq 10^2$ KBE/ml im Hybrid RiboLyserTM behandelt, um die Bakterienzellen mechanisch zu zerstören. Dabei wurde im Tierversuch keine signifikante Verlängerung der Über-

Degradationsassay mit BSE assoziiertem Prion-Protein

Analoge Degradationsstudien wurden zudem mit BSE infizierten Hirnhomogenaten durchgeführt. Dabei blieb das PrP^{Sc}-Signal (BSE) im Western Blot nach bis zu 40-stündiger Inkubation von Pansen- und Coloninhalt in unterschiedlichen Puffern stabil (Abb. 7a und b). Eine anaerobe Langzeitinkubation sowohl mit Pansen- als auch mit Coloninhalt über 6 Tage führte jedoch im Vergleich zur Positivkontrolle zu einer PrP^{Sc}-Signalreduktion (BSE) im Western Blot (Abb. 7c). BSE-Prionen besitzen folglich eine erhöhte Stabilität gegenüber den mikrobiellen Verdauungsprozessen im Rind.

Tab. 2: Mittlere Überlebenszeiten der Hamster nach intracerebraler Inokulation

Probenbezeichnung	Material	Inkubationsbedingungen (40 h)	Scrapie-Hamsterhirnhomogenat	Normales Hamsterhirnhomogenat	Zahl der infizierten versus der inokulierten Hamster	Mittlere Überlebenszeit [Tage]	Standardabweichung vom Mittelwert [Tage]
A (Negativkontrolle)	aktive Mikroflora (Pansen)	anaerob	-	+	0/8	> 201,0	-
B (Positivkontrolle)	inaktive Mikroflora (Pansen)	anaerob	+	-	8/8	89,6	0,72
C	aktive Mikroflora (Pansen)	anaerob	+	-	8/8	86,7	0,88
D	aktive Mikroflora (Colon)	anaerob	+	-	8/8	88,3	1,17
E	aktive Mikroflora (Colon)	aerob	+	-	7/8	96,6	4,91

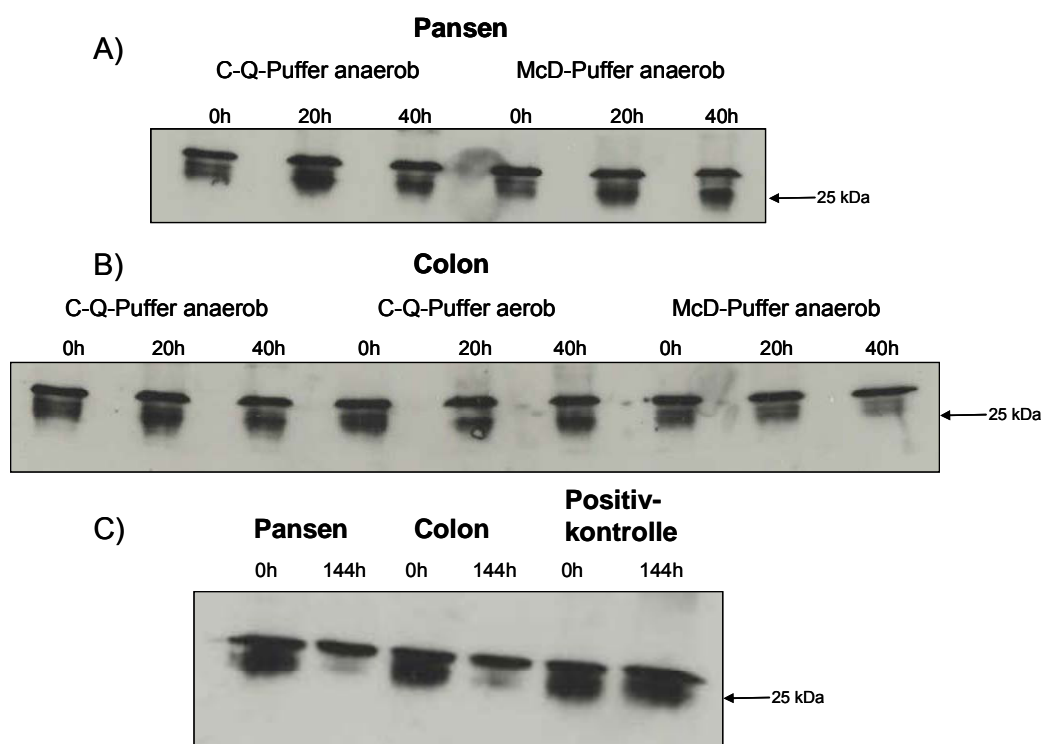


Abb. 7: Biochemische Analyse der mikrobiell aktiven Ansätze mit dem Zusatz von BSE infiziertem Hirnhomogenat

Schlussfolgerung

Letztendlich kann aufgrund der Resultate eine Kontamination der Umwelt durch das Ausscheiden von infektiösem Material via Faeces und eine potentielle Kontamination der Umwelt nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren zeigen diese Daten den Bedarf an alternativen Nachweismethoden bezüglich der Diagnose von TSE-Erkrankungen und hinterlassen Diskussionsbedarf zur tatsächlichen Erregernatur.

Literatur

Baier, M., Schwarz, A. and Mielke, M. (2004) Activity of an alkaline 'cleaner' in the inactivation of the scrapie agent. *J. Hosp. Infect.* 57, 80-84.

Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A. and Lansbury, P.T. Jr. (1997) Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* 71, 4107-4110.

Manuelidis, L., Yu, Z.X., Banquero, N. and Mullins, B. (2007) Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1965-1970.

McKinley, M.P., Bolton, D.C. and Prusiner, S.B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.

Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveld, M., Heim, D., Oesch, B. and Moser, M. (1999) Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl)* 98, 437-443.

Scherbel, C., Pichner, R., Groschup, M.H., Mueller-Hellwig, S., Scherer, S., Dietrich, R., Maertlbauer, E. and Gareis, M. (2006) Degradation of scrapie associated prion protein (PrPSc) by the gastrointestinal microbiota of cattle. *Vet. Res.* 37, 695-703.

