# Aus dem Institut für Neuropathologie (Prof. Dr. med. Wolfgang Brück) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Die Bedeutung sensibler und autonomer Ganglien in der Pathogenese der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung unter besonderer Berücksichtigung des PrPsc-Typs

#### INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Anna Hofmann

aus

Hannover

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer
Ko-Referent/in:	
Drittreferent/in:	
Datum der mündlichen Prüfung:	

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung sensibler und autonomer Ganglien in der Pathogenese der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung unter besonderer Berücksichtigung des PrPsc-Typs" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Inhaltsverzeichnis

# Inhaltsverzeichnis

AbbildungsverzeichnisIV		
Abkü	rzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Prionerkrankungen	1
1.1.1	Historische Einführung	1
1.1.2	Die verschiedenen Erregerhypothesen	2
1.1.3	Eigenschaften und Replikationsmechanismen von Prionen	3
1.1.4	Das Prinzip der Erregerstämme	4
1.1.5	Das physiologische Prion-Protein	5
1.1.6	Pathologie, Klinik und Diagnostik humaner Prionkrankheiten	6
1.2	Die Bedeutung des peripheren Nervensystems für die Pathogenese	8
1.2.1	Das vegetative Nervensystem	8
1.2.2	Die Rolle sensibler Ganglien in verschiedenen Tiermodellen	9
1.2.3	Das Primaten-Modell	10
1.2.4	Erkenntnisse zu peripheren Nerven und Sinnesorganen	
1.2.5	Befunde beim Menschen	12
1.3	Die Beteiligung nicht-neuronaler peripherer Organsysteme	13
1.3.1	Das lymphoretikuläre System	13
1.3.2	Die Muskulatur und weitere periphere Gewebe	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte und Instrumente	18
2.1.2	Verbrauchsmaterial	19
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Lösungen und Puffer	21
2.1.5	Antikörper	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Aufbereitung des Gewebes	24
2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
2.2.3	Paraffin-embedded tissue blot	25
2.2.4	Immunhistochemie	26
2.2.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	28
2.3	Wissenschaftliche Software	30
2.4	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Das Ganglion trigeminale	33

Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	34
3.1.2	Vergleichende Darstellung in paraffin-embedded tissue blot und Immunhistochemie	35
3.2	Das Ganglion nodosum	38
3.2.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	39
3.2.2	Vergleichende Darstellung in paraffin-embedded tissue blot und Immunhistochemie	40
3.3	Der zervikale Grenzstrang	43
3.3.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	44
3.4	Das Ganglion stellatum	44
3.4.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	44
3.5	Der thorakale Grenzstrang	44
3.5.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	45
3.5.2	Vergleichende Darstellung in paraffin-embedded tissue blot und Immunhistochemie	
3.6	Das Ganglion coeliacum	49
3.6.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	
3.6.2	Vergleichende Darstellung in paraffin-embedded tissue blot und Immunhistochemie	51
3.7	Der Plexus pelvinus	54
3.7.1	Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten	54
3.7.2	Vergleichende Darstellung in paraffin-embedded tissue blot und Immunhistochemie	54
3.8	Patientenfälle mit mehreren immunopositiven Ganglien	56
3.9	Exemplarische Darstellung unter alternativen Antikörpern	56
3.10	Weiterführende Untersuchungen mit dem Western Blot	60
3.11	Die genetischen Fälle	61
3.12	Nicht-ganglionäre Ablagerungsmuster	62
4	Diskussion	63
4.1	Einordnung der humanen Ganglienbefunde	63
4.2	Morphologische Charakterisierung der ganglionären Pathologie	65
4.3	Überlegungen zu immunonegativen Ganglien	66
4.4	Erklärungsansätze für das unspezifische Ablagerungsmuster	68
4.5	Weitere ganglienunabhängige Pathologien	69
4.6	Theorien zur Ausbreitungsrichtung im Vergleich mit Tierstudien	71
4.7	Der Zusammenhang zwischen Erregerstamm und Ausbreitungsrichtung	73
4.8	Patientenfälle mit Prionpathologie in mehreren Ganglien – mögliche Schlussfolgerungen zur Ausbreitungsrichtung	75
4.9	Zur Aussagekraft der statistischen Analyse	
4.10	Mögliche Relevanz für andere neurodegenerative Erkrankungen	

Inhaltsverzeichnis	II

5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80

Abbildungsverzeichnis IV

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Positivkontrolle Kleinhirn	32
Abbildung 2: Positivkontrolle Retina	33
Abbildung 3: Organcharakteristika des Ganglion trigeminale	33
Abbildung 4: Verteilung des Ganglion trigeminale auf positive und negative Fälle	34
Abbildung 5: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des  *Ganglion trigeminale	35
Abbildung 6: Positive Immunreaktion des <i>Ganglion trigeminale</i> eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10	36
Abbildung 7: Positive Immunreaktion des <i>Ganglion trigeminale</i> eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10	37
Abbildung 8: Negative Immunreaktion des <i>Ganglion trigeminale</i> eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10	38
Abbildung 9: Organcharakteristika des Ganglion nodosum	38
Abbildung 10: Verteilung des Ganglion nodosum auf positive und negative Fälle	39
Abbildung 11: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des Ganglion nodosum	40
Abbildung 12: Positive Immunreaktion des <i>Ganglion nodosum</i> eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10	41
Abbildung 13: Positive Immunreaktion des <i>Ganglion nodosum</i> eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10	42
Abbildung 14: Negative Immunreaktion des <i>Ganglion nodosum</i> eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10	43
Abbildung 15: Organcharakteristika des Ganglion cervicale superius	43
Abbildung 16: Organcharakteristika des Ganglion stellatum	44
Abbildung 17: Organcharakteristika von Ganglien des thorakalen Grenzstrangs	45
Abbildung 18: Verteilung der thorakalen Grenzstrangganglien auf positive und negative Fälle	45
Abbildung 19: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs	46
Abbildung 20: Positive Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions auf Höhe Th3/4 bei einem CJD-Fall im PET-Blot unter 12F10	47
Abbildung 21: Positive Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions auf Höhe Th3/4 bei einem CJD-Fall in der Immunhistochemie unter 12F10	
Abbildung 22: Negative Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions bei einem Kontrollfall im PET-Blot unter 12F10	
Abbildung 23: Organcharakteristika des Ganglion coeliacum	
Abbildung 24: Verteilung des Ganglion coeliacum auf positive und negative Fälle	
Abbildung 25: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des  **Ganglion coeliacum**	
Abbildung 26: Positive Immunreaktion des <i>Ganglion coeliacum</i> eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10	52
Abbildung 27: Negative Immunreaktion des <i>Ganglion coeliacum</i> eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10	53
Abbildung 28: Negative Immunreaktion des <i>Ganglion coeliacum</i> eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10	
Abbildung 29: Verteilung der Ganglien des Plexus pelvinus auf positive und negative Fälle	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Positive Immunreaktion eines Ganglions des <i>Plexus pelvinus</i> bei einem CJD-Fall im PET-Blot unter 12F10	55
Abbildung 31: Negative Immunreaktion eines Ganglions des <i>Plexus pelvinus</i> bei einem CJD-Fall in der Immunhistochemie unter 12F10	
Abbildung 32: Negative Immunreaktion eines Ganglions des <i>Plexus pelvinus</i> bei einem Kontrollfall im PET-Blot unter 12F10	56
Abbildung 33: Vergleichende Darstellung eines <i>Ganglion trigeminale</i> im PET-Blot unter 12F10 bzw. 3F4	57
Abbildung 34: Vergleichende Darstellung eines <i>Ganglion trigeminale</i> im PET-Blot unter 12F10, ICSM-18 bzw. 3F4	57
Abbildung 35: Vergleichende Darstellung eines <i>Ganglion nodosum</i> im PET-Blot unter 12F10 bzw. ICSM-18	58
Abbildung 36: Vergleichende Darstellung eines <i>Ganglion coeliacum</i> im PET-Blot unter 12F10 bzw. 3F4	58
Abbildung 37: Vergleichende Darstellung eines thorakalen Grenzstrangganglions im PET-Blot unter 12F10 bzw. ICSM-18	59
Abbildung 38: Darstellung ausgewählter Ganglien im Western Blot unter 3F4 (I)	60
Abbildung 39: Darstellung ausgewählter Ganglien im Western Blot unter 3F4 (II)	61

Abkürzungsverzeichnis VI

### Abkürzungsverzeichnis

AD Alzheimer-Demenz
AEC Aminoethylcarbazol

ANS autonomes Nervensystem

BSE bovine spongiforme Enzephalopathie

CJD Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

CMGC zöliakal-mesenterialer Ganglienkomplex

CWD chronic wasting disease
DMFA Dimethylformamid

DY drowsy

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
ENS enterisches Nervensystem

fCJD familiäre CJD

FDZ follikuläre dendritische Zellen

FFI fatal familial insomnia

GALT gut-associated lymphoid tissue
GdnSCN Guanidiniumisothiocyanat

Ggl. Ganglion

GSS Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

HE Hämatoxylin-Eosin

 $H_2O_d$  einfach destilliertes Wasser  $H_2O_{dd}$  zweifach destilliertes Wasser

HY hyper

iCJD iatrogene CJD

IHC Immunhistochemie

inf. inferius

LRS lymphoretikuläres System

M Methionin
M. Morbus
med. mediale
N. Nervus
Nn. Nervi

NALT nasal mucosa-associated lymphoid tissue

Ncl. Nucleus

PET-Blot paraffin-embedded tissue blot

PK Proteinase K

Pl. Plexus

PNS peripheres Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis VII

Prion proteinaceous infectious particle

PRNP humanes PrP-Gen
Prnp veterinäres PrP-Gen

PrP Prion-Protein
PrP 27-30 27-30 kDa PrP
PrPc cellular PrP

PrPres PK-resistentes PrP

PrPsc Scrapie-PrP

PrPTSE pathologisches PrP bei TSE

sCJD sporadische CJD

SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

sup. superius

TBM tingible body macrophages

TME transmissible mink encephalopathy

TSE transmissible spongiforme Enzephalopathien

V Valin

vCJD neue Variante CJD

ZNS zentrales Nervensystem

#### 1 Einleitung

#### 1.1 Prionerkrankungen

#### 1.1.1 Historische Einführung

Prionerkrankungen sind neurodegenerative Leiden des Menschen und des Tiers, die i. d. R. nach einer jahrelangen Inkubationszeit und einigen Monaten Krankheitsdauer obligat letal verlaufen. Beim Menschen treten sie typischerweise im mittleren bis höheren Lebensalter auf (Mumenthaler und Mattle 2008). Nach dem derzeitigen medizinischen Stand sind keine Therapiemöglichkeiten bekannt (Knight 2000). Die Erkrankungshäufigkeit liegt bei etwa einem Fall auf eine Million Einwohner pro Jahr weltweit (Delasnerie-Laupretre et al. 1995; Will et al. 1998). Die für die gesamte Nomenklatur in diesem Bereich maßgebende Prionkrankheit ist die Scrapie oder Traberkrankheit der Schafe und Ziegen, deren Vorkommen bereits seit 1732 bekannt ist (McGowan 1922). Neuropathologische Auffälligkeiten von an Scrapie erkrankten Schafen wurden zum ersten Mal im Jahr 1898 gefunden (Besnoit und Morel 1898; Cassirer 1898). Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden weitere veterinäre Prionkrankheiten bekannt. Große gesellschaftspolitische Bedeutung brachte die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) mit sich, die 1986 erstmals in Großbritannien diagnostiziert wurde (Wells et al. 1987) und deren Aufkommen auf die Verwendung kontaminierten Tierfutters zurückgeführt wird (Wilesmith et al. 1988; Wilesmith et al. 1991). Ferner sind die feline spongiforme Enzephalopathie der Katzen (Wyatt et al. 1990), die transmissible Enzephalopathie (transmissible mink encepahlopathy, TME) der Nerze (Hartsough und Burger 1965) sowie die "chronisch zehrende Krankheit" (chronic wasting disease, CWD) der Hirsche (Williams und Young 1980) zu nennen. Von der heute als Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) bekannten Prionerkrankung des Menschen berichteten in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals die beiden deutschen Neurologen Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob unabhängig voneinander (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Heute wird bei der CJD eine sporadische (sCJD) von der familiären (fCJD) sowie von akquirierten Formen unterschieden. Letztere entstehen im Fall der iatrogenen CJD (iCJD) durch medizinische Unfälle in Form von kontaminierten neurochirurgischen Instrumenten (Bernoulli et al. 1977; Gibbs et al. 1994), Hornhauttransplantaten (Manuelidis et al. 1977; Lang et al. 1998), Dura *mater*-Transplantaten (Lang et al. 1998; Brown et al. 2000) oder Hypophysenhormonpräparaten (Brown et al. 2000). Die neue Variante der CJD (vCJD) hingegen entwickelte sich in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts in Großbritannien aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Übertragung der BSE auf den Menschen infolge einer Nahrungsmittelexposition (Will et al. 1996; Bruce et al. 1997). Mit über 80 % aller

Krankheitsfälle ist die sporadische Form weitaus die häufigste (Will et al. 1998). Weitere humane Prionkrankheiten sind das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann et al. 1936) und die letale familiäre Insomnie (fatal familial insomnia, FFI) (Lugaresi et al. 1986), die beide genetischer Natur sind. Aus medizinhistorischer Sicht von besonderer Bedeutung ist Kuru (Gajdusek und Zigas 1957). Hierbei handelt es sich um eine Epidemie, die im 20. Jahrhundert in dem auf Papua Neuguinea lebenden, urtümlichen Volksstamm der Fore aufgetreten ist und deren Entstehung bald mit dem Praktizieren eines rituellen Endokannibalismus in Zusammenhang gebracht wurde (Mathews et al. 1968). Klatzo et al. (1959) beschrieb zusammen mit Gajdusek und Zigas die pathologischen Charakteristika in den Gehirnen von an Kuru Verstorbenen u. a. im Sinne von Vakuolen und Plaque-ähnlichen Strukturen. Noch in demselben Jahr erkannte Hadlow (1959) die neuropathologischen Gemeinsamkeiten von Scrapie und Kuru. Scrapie wurde bereits erstmals im späten 18. Jahrhundert als ansteckend beschrieben (Leopoldt 1759). Der experimentelle Nachweis für diese Übertragbarkeit gelang jedoch erst Ende der 30er Jahre des vergangenen Jahrhunderts (Cuillé und Chelle 1938). Gajdusek et al. (1966) gelang schließlich auch die experimentelle Übertragung von Kuru auf Schimpansen. Dies war der erste Beleg für die Übertragbarkeit einer humanen Prionkrankheit. Kurz darauf wiederholten Gibbs et al. (1968) diesen Versuchsaufbau bei der CJD und bewiesen so auch Übertragbarkeit. Eben diese definierende Eigenschaft der Krankheitsbilder prägte den Begriff "transmissible spongiforme Enzephalopathien" (TSE), womit auch auf das durch Vakuolenbildung schwammartige Erscheinungsbild als eines der mikroskopischen Hauptmerkmale des Gehirngewebes von Betroffenen hingewiesen wird (Masters und Richardson 1978). Der Terminus "Prionkrankheiten" hingegen benennt den dieser Transmissibilität zugrundeliegenden Erreger, über dessen Natur jedoch zunächst noch nichts bekannt war.

#### 1.1.2 Die verschiedenen Erregerhypothesen

In den 50er Jahren vermutete man hinter diesen neurologischen Erkrankungen sog. slow virus infections, also einen viralen Erreger mit besonders langer Inkubationszeit. Der Begriff war durch Sigurdsson (1954) eingeführt worden, welcher insbesondere Scrapie dieser Gruppe von Erkrankungen zugeordnet hatte. Diese und verwandte Vorstellungen (Dickinson und Outram 1988) wurden bis zuletzt von einigen wenigen Wissenschaftlern vertreten (Diringer et al. 1994; Manuelidis 1994). In Anlehnung an die von Klatzo et al. (1959) dargestellten Plaques und deren Ähnlichkeit zu amyloiden Aggregaten wurde der Begriff der "infektiösen Amyloidose" (Brown et al. 1991; Gajdusek 1996) entwickelt, welcher die TSE als übertragbare Proteinaggregationskrankheiten von den nicht infektiösen dieser Art, wie beispielsweise dem Morbus (M.) Alzheimer, unterscheiden sollte. Mit dem Ausdruck der "Virus-induzierten Amyloidose" (Diringer et al. 1988) fand dieses Konzept eine gedankliche Verbindung mit der Virus-Hypothese. Den im Verlauf beschriebenen, für Viren untypischen Eigenschaften des infektiösen Agens von TSE trägt der Begriff des

"unkonventionellen Virus" (Diringer et al. 1994) Rechnung. So zeigten Alper et al. (1967), dass der Scrapieerreger durch Behandlung mit UV-Strahlung nicht inaktiviert werden konnte – ein Nukleinsäure üblicherweise schädigendes Verfahren. Auch gegenüber ionisierender Strahlung besteht eine außergewöhnlich hohe Resistenz (Gibbs et al. 1978). Es sind mithilfe verschiedener Methoden auch zahlreiche direkte Versuche zum Nachweis einer Scrapie-spezifischen Nukleinsäure unternommen worden, die jedoch allesamt keinen richtungsweisenden Befund ergaben (German et al. 1985; Duguid et al. 1988; Oesch et al. 1988; Akowitz et al. 1990; Duguid und Dinauer 1990; Murdoch et al. 1990). Entsprechend wurden außerdem Experimente durchgeführt, um das Vorhandensein einer solchen Nukleinsäure auszuschließen. Auch dies gelang nicht definitiv, sondern ihre mögliche Existenz wurde nur mit großen Einschränkungen versehen. Als stärkstes Gegenargument ergab sich die unplausibel geringe Größe der potentiellen Nukleinsäure (Meyer et al. 1991; Kellings et al. 1992). Weiterhin sprach für die außergewöhnliche Natur des Erregers seine ausgeprägte Thermostabilität (Taylor et al. 1998; Taylor 1999) sowie die Resistenz gegenüber herkömmlichen Verfahren zur chemischen Desinfektion (Brown et al. 1982). Insbesondere schien das Scrapie-Agens ausdrücklich nukleinsäureschädigenden Substanzen zu widerstehen, wohingegen es durch proteinmodifizierende Behandlung inaktiviert wurde (Diener et al. 1982). Diese Ergebnisse aus der Gruppe um den amerikanischen Neurologen und Biochemiker Stanley Prusiner berücksichtigt inzwischen die sog. protein-only-Hypothese, wonach der Erreger eine Nukleinsäure-freie, ausschließliche Proteinnatur innehat. Dieser erhielt daher in Abgrenzung zu bisher bekannten krankheitserregenden Mikroorganismen den Namen "Prion" als Akronym für proteinaceous infectious particle (Prusiner 1982). Die Fachwelt stand der Prionhypothese von Prusiner zunächst skeptisch gegenüber, da ein Erreger ohne eine wie auch immer geartete eigene Erbsubstanz für viele noch nicht vorstellbar war. Im Jahr 1997 wurde Prusiner schließlich für seine Arbeit mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

#### 1.1.3 Eigenschaften und Replikationsmechanismen von Prionen

Auch das im Rahmen der Prionhypothese konkret verantwortliche Protein konnte in der Gruppe von Prusiner identifiziert werden (Bolton et al. 1982). Wie sich später herausstellte, handelte es sich bei diesem Prion-Protein (PrP) um eine pathogene Variante des physiologischerweise vorkommenden, auch als PrP<sup>c</sup> (für *cellular*) bezeichneten, Proteins (s. 1.1.5). Die pathogene Form wird analog PrP<sup>sc</sup> (für Scrapie) genannt. Der entscheidende Unterschied der gesunden und der pathogenen Form liegt, bei gleicher zugrunde liegender Aminosäuresequenz (Basler et al. 1986), in ihrer Konformation. Das PrP<sup>c</sup> zeigt als Sekundärstrukturelement überwiegend Alpha-Helices, wohingegen das PrP<sup>sc</sup> vorwiegend aus Beta-Faltblatt-Strukturen besteht (Pan et al. 1993). Mit diesem Überwiegen der Beta-*sheets* in der räumlichen Struktur gehen weitere bedeutende Eigenschaften des PrP<sup>sc</sup> einher: Es zeigt eine Tendenz zur Aggregatbildung (Prusiner et al. 1983) sowie eine relative Resistenz gegenüber dem Enzym-Verdau durch Proteinase K (PK). Während das

physiologische PrP durch PK-Verdau vollständig abgebaut werden kann, bleibt im Fall des fehlgefalteten PrP ein resistentes Fragment bestehen (PrPres). Diesen nach limitierter PK-Proteolyse von PrPsc entstehenden, noch immer die Krankheit übertragenden entsprechend Proteinabschnitt PrP 27-30, nennt man dem verbleibenden Molekulargewicht, welches in Abhängigkeit von der Glykosylierung zwischen 27 und 30 kDa liegt (Bolton et al. 1982; McKinley et al. 1983; Meyer et al. 1986). Mehrere Moluküle PrP 27-30 lagern sich zu unlöslichen Amyloid-ähnlichen Strukturen zusammen, auch als Prion-rods oder Scrapie-assoziierte Fibrillen bezeichnet (Merz et al. 1981; McKinley et al. 1986).

Die weitere Aufklärung der Erregernatur führte durch die vielschichtige Wirkung, die von Prionen ausgehen kann, zum Verständnis der unterschiedlichen Erscheinungsformen Gruppe von Krankheiten: Der erste und entscheidende Schritt im Erkrankungsprozess ist die Umfaltung von PrPc in PrPc – sei es bedingt durch einen noch nicht näher verstandenen spontanen Prozess (sporadische Formen), durch die Induktion von inokuliertem PrPsc (akquirierte Formen) oder durch eine Mutation des physiologischen PrP, welche eine Umfaltung begünstigt (genetische Formen) (Tagliavini et al. 1994). In jedem Fall stellte sich die Frage nach einem Replikationsmechanismus des pathogenen Agens. Hierfür wurden im Wesentlichen zwei theoretische Modelle entwickelt: Das Heterodimer-Modell nach Prusiner (1991) postuliert die Bildung eines Heterodimers, bestehend aus PrPc und PrPsc, worauf - vergleichbar einer enzymatischen Reaktion - die Umwandlung von PrPc in PrPsc und damit eine exponentielle Produktion von PrPsc folgt. Eine alternative Vorstellung beschreibt das Modell der linearen Kristallisation bzw. seeding-Modell (Jarrett und Lansbury 1993). Dieses orientiert sich an den Prinzipien von geschwindigkeitsbestimmender Nukleation und anschließender Polymerisation im Rahmen der Amyloid-Formation, vergleichbar dem Prozess bei M. Alzheimer (Come et al. 1993; Caughey et al. 1995).

#### 1.1.4 Das Prinzip der Erregerstämme

Bei der Passage von Scrapie in Ziegen ließen sich klinisch erstmals zwei Syndrome voneinander abgrenzen (Pattison und Millson 1961). Hierfür kann die Existenz verschiedener Erregerstämme verantwortlich gemacht werden, welche also konstant mit nur geringer Abweichung in der Lage sind, ihre charakteristischen Eigenschaften zu übertragen. Ihre Entstehung ließ sich auch durch Passage der TME im Hamster beobachten. Sie wurden hier als hyper (HY) und drowsy (DY) bezeichnet und unterschieden sich in Klinik, Inkubationszeit, neuropathologischem Läsionsprofil, relativer Resistenz gegenüber PK-Verdau sowie ihrem Wirtsspektrum (Bessen und Marsh 1992a; Bessen und Marsh 1992b). Auch im Rahmen der Passage von Scrapie in Mäusen wurden solche stammspezifischen Unterschiede bezüglich histopathologischer Parameter offenkundig (Fraser und Dickinson 1973). Nach üblichem Verständnis erforderten diese Zusammenhänge das Vorhandensein einer mutationsfähigen Nukleinsäure (Bruce und

Dickinson 1987). Die auf der *protein-only*-Hypothese fußende Erklärung für dieses Phänomen besteht abermals in dem Vorhandensein mehrerer Proteinkonformationen, in diesem Fall des PrPsc, welche letzteres zu einer nicht-genetischen Replikation befähigen (Bessen et al. 1995; Telling et al. 1996; Safar et al. 1998). Die Vorstellung ist, dass sich der individuelle Phänotyp immer aus einem Wechselspiel zwischen Stamm-kodierenden Erregereigenschaften und dem genetischen Hintergrund des Empfängers ergibt (Bruce et al. 1991). Diese komplexe Interaktion und wechselseitige Beeinflussung kann bis zur Entstehung neuer Stämme beim Wechsel der Wirtstierspezies reichen (Kimberlin et al. 1987).

Auch bei humanen Prionkrankheiten sind verschiedene Erregerstämme entdeckt worden. Parchi et al. (1996) beschrieb für die sCJD zwei Typen (1 und 2) des PrPsc, die sich bei gelelektrophoretischer Auftrennung nach PK-Verdau in dem Gewicht ihres deglykosylierten Fragments unterscheiden. Bei Typ 1 beträgt dieses 20,5 kDa, bei Typ 2 18,7 kDa. Später konnte mittels Protein-Sequenzierung gezeigt werden, dass dieser Gewichtsunterschied durch verschiedene N-terminale Spaltstellen beim PK-Verdau erklärt werden kann. Diese findet sich bei Typ 1 an Position 82 und bei Typ 2 an Position 97 (Parchi et al. 2000). Durch Kombination dieser Einteilung in Typ 1 und 2 mit dem sogenannten Codon-129-Polymorphismus konnte die sCJD systematisch klassifiziert werden: An Aminosäureposition 129 des PrP findet sich entweder Methionin (M) oder Valin (V). Es existieren entsprechend die sechs Varianten MM1, MM2, MV1, MV2, VV1 VV2, die mit den vielfältigen klinischen und neuropathologischen Erscheinungsformen der Erkrankung in maßgeblichem Zusammenhang stehen (Parchi et al. 1999). Eine Homozygotie bezüglich dieser beiden Allele, und zwar insbesondere eine Methionin-Homozygotie, prädisponiert für die Entwicklung einer sCJD im Allgemeinen (Palmer et al. 1991; Laplanche et al. 1994; Salvatore et al. 1994; Windl et al. 1996). Von der vCJD waren lange Zeit sogar nur Träger der MM-Homozygotie betroffen (Zeidler et al. 1997a). Erst kürzlich wurde nun auch ein heterozygoter Fall bekannt (Mok et al. 2017). Ähnliches gilt für die iCJD (Brown et al. 1994; Deslys et al. 1994), wobei hier eine Valin-Homozygotie die größere Rolle zu spielen scheint (Collinge et al. 1991). Der Einfluss des Codon-129-Polymorphismus reicht so weit, dass er, vor dem Hintergrund einer Asn178-Mutation desselben Allels, darüber entscheidet, ob sich phänotypisch im Fall von Valin eine fCJD bzw. im Fall von Methionin die FFI entwickelt (Goldfarb et al. 1992).

#### 1.1.5 Das physiologische Prion-Protein

Das dem PrP zugrunde liegende Gen ist im Genom des Wirtes kodiert und wird auch unter physiologischen Bedingungen in vielen Organen exprimiert (Oesch et al. 1985). Die höchsten Konzentrationen finden sich hierbei in Neuronen (Kretzschmar et al. 1986) und Gliazellen (Moser et al. 1995), aber auch ein Vorkommen u. a. in Herz, Skelettmuskel, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Milz, Gonaden (Bendheim et al. 1992) sowie Lymphozyten (Cashman et al. 1990) und Monozyten (Dodelet und Cashman 1998) ist beschrieben. Beim

Menschen als PRNP (Prnp beim Tier) bezeichnet, ist dieses Gen hier auf dem Chromosom 20 lokalisiert (Sparkes et al. 1986). Das PRNP-Gen unterteilt sich in zwei Exons und ein dazwischen liegendes Intron, wobei sich die gesamte Protein-kodierende Sequenz (sog. open reading frame) auf dem Exon 2 befindet (Puckett et al. 1991). An dem Protein finden sich verschiedene posttranslationale Modifikationen. Über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker ist es an der Zelloberfläche positioniert (Stahl et al. 1987). Ferner existieren zwei potentielle Asparagin-gebundene Glykosylierungsstellen an Position 181 und 197 (Endo et al. 1989). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des PrP erfolgte in den 90er Jahren mithilfe der Kernresonanz-Spektroskopie. Das gesamte Protein unterteilt sich in eine gefaltete C-terminale Domäne mit drei Alpha-Helices und einem Beta-sheet sowie das nur geringfügig strukturierte, hoch flexible N-terminale Segment (Riek et al. 1996; Riek et al. 1997).

Trotz seiner herausragenden Bedeutung für die Pathophysiologie von TSE ist nur wenig über die physiologische Funktion des PrP bekannt. Sowohl seine ubiquitäre Expression im gesunden Organismus als auch das hohe Maß seiner evolutionären Konservierung im Vergleich verschiedener Spezies (Schätzl et al. 1995) lassen jedoch eine solche vermuten. PrP-knock-out-Mäuse zeigen allerdings phänotypisch keinerlei Auffälligkeiten (Büeler et al. 1992; Manson et al. 1994). Eine biologische Bedeutung von PrP<sup>e</sup> wird diskutiert für den synaptosomalen Kupfermetabolismus (Brown et al. 1997b; Pauly und Harris 1998; Herms und Kretzschmar 2001), die Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Brown et al. 1997a) sowie die Neuroprotektion unter hypoxischen Bedingungen (McLennan et al. 2004; Weise et al. 2004). Ferner konnte für dieses Protein die Möglichkeit eines axonalen Transports in antero- und retrograder Richtung sowie im peripheren (PNS) und zentralen Nervensystem (ZNS) gezeigt werden (Borchelt et al. 1994; Moya et al. 2004).

#### 1.1.6 Pathologie, Klinik und Diagnostik humaner Prionkrankheiten

Als Creutzfeldt (1920) und Jakob (1921) zu Beginn der 20er Jahre des letzten Jahrhunderts erstmals über die heute nach ihnen benannte Erkrankung berichteten, war es ihnen trotz vieler Gemeinsamkeiten mit bereits beschriebenen Krankheitsbildern nicht möglich, dieselbe definitiv einzuordnen. Als naheliegende klinische Differenzialdiagnose nannten beide Autoren die Multiple Sklerose aufgrund sich überschneidender Symptome wie Spastik, positiver Babinski-Reflex, fehlende Bauchhautreflexe, Ataxie, Doppelbilder, Intentionstremor und skandierende Sprache. Creutzfeldt (1920) konnte bei seiner Patientin ferner über einen "Patellar- und Fußklonus" (S. 2) berichten. Ausführlich dokumentierte er auch den psychiatrischen Befund der jungen Frau, wodurch u. a. das Vorliegen einer demenziellen Entwicklung deutlich wird: "Die Prüfung der intellektuellen Leistungen ergibt eine Beschränkung auf die einfachsten Dinge." (S. 3) Die Patientin ist "zeitlich und örtlich nicht orientiert" (S. 2). Jakob (1921) erkannte in seiner Veröffentlichung die große Ähnlichkeit seiner Beobachtungen mit jenen, die von Creutzfeldt ein Jahr zuvor publiziert worden waren, und gruppierte das bislang unbekannte Krankheitsbild zwischen den

"spastischen Systemerkrankungen" (S. 145) und den "striär lokalisierten Krankheitsprozessen" (S. 145) ein. Er brachte damit zum Ausdruck, dass "die im Vordergrunde stehende Erkrankung des Pyramidensystems" (S. 145) von extrapyramidaler Symptomatik begleitet werden kann. Im Zuge dessen prägte er auch den Begriff "spastische Pseudosklerose" (S. 145).

Aufbauend auf einer Klassifikation von Masters et al. (1979) gelten heute folgende Diagnosekriterien: Das Vorliegen der Erkrankung ist wahrscheinlich, wenn - bei Bestehen einer progressiven Demenz von weniger als zwei Jahren Dauer - der Patient wenigstens zwei der folgenden vier klinischen Phänomene präsentiert: 1. Myklonien, 2. Visuelle und/oder zerebelläre Symptome, 3. Pyramidale und/oder extrapyramidale Zeichen, 4. Akinetischen Mutismus und außerdem typische EEG-Veränderungen im Sinne sog. periodic sharp and slow wave complexes und/oder der Nachweis des neuronalen Destruktionsmarkers 14-3-3-Protein im Liquor vorliegen (Zerr et al. 2000). <u>Definitiv</u> kann die Diagnose der CJD bzw. einer Prionkrankheit nur neuropathologisch gesichert werden, zumeist postmortal im Rahmen einer Obduktion. Den methodischen Standard stellt in diesem Zusammenhang die Immunhistochemie (IHC) mit anti-PrP-Antikörpern zur Sichtbarmachung fehlgefalteten Proteinaggregate in der Lichtmikroskopie dar (Kretzschmar et al. 1996). Letztere sind das einzig bekannte Krankheitsspezifikum und können sich je nach Subtyp der Erkrankung in ganz unterschiedlicher Form und Lokalisation präsentieren (Kretzschmar 2001). Auch Creutzfeldt und Jakob hatten Autopsien an ihren Patienten durchgeführt, und auf diese Weise den Versuch unternommen, die Krankheit zusätzlich neuropathologisch zu charakterisieren. Dabei erkannten sie bereits zwei ganz wesentliche, wenn auch recht unspezifische histologische Kennzeichen dieser Gruppe von Erkrankungen: den ausgeprägten Nervenzellverlust, gefolgt von einer reaktiven Gliose. Creutzfeldt (1920) beschrieb den Befund an einer Stelle als einen "herdförmigen Untergang des Nervengewebes der Großhirnrinde mit Neuronophagie und reparatorischer Gliawucherung" (S. aufgrund 17). Jakob (1921) schlug des histologischen Erscheinungsbildes eine weitere Bezeichnung für das neue Krankheitsbild vor: "Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden" (S. 145). Zur Erklärung heißt es: "So ist der Auffassung des Prozesses als eines rein degenerativen im Gegensatz zu den entzündlichen Rechnung getragen und die Diffusität der Veränderungen mit dem verstreuten Auftreten der charakteristischen herdförmigen Ausfälle betont." (S. 145)

Die beschriebenen Diagnosekriterien von Zerr et al. (2000) beziehen sich streng genommen nur auf die sCJD als weitaus häufigsten Subtypen der Erkrankung. Klinisch unterscheidet sich insbesondere die vCJD hiervon deutlich (Zeidler et al. 1997b; Zeidler et al. 1997c): Die Patienten sind mit einem mittleren Alter von 29 Jahren bei Erkrankungsbeginn sehr jung und die Klinik ist initial überwiegend psychiatrischer Natur. Neurologische Ausfälle und eine Demenz entwickeln sich erst später im Krankheitsverlauf. Das Terminalstadium humaner Prionkrankheiten ähnelt dem anderer neurodegenerativer

Erkrankungen. Die Patienten versterben oftmals sekundär an Kachexie, Dekubitalulzera und Pneumonien (Gajdusek und Zigas 1957).

# 1.2 Die Bedeutung des peripheren Nervensystems für die Pathogenese

PrP-knock-out-Mäuse sind nach Erregerinokulation resistent gegen die Entwicklung einer TSE (Büeler et al. 1993). Transplantiert man in das Gehirn solcher Mäuse PrPkompetentes, neuronales Gewebe, so finden sich nach intrazerebraler Inokulation von Scrapie-Prionen nur in dem Transplantat, nicht aber in dem umliegenden Gehirngewebe des Empfängers die krankheitstypischen, neuropathologischen Veränderungen. Das PrPsc tritt z.T. auch aus dem Transplantat in das benachbarte, PrP-defiziente Gehirngewebe über und lagert sich dort ab, wodurch letzteres jedoch offenkundig keinen Schaden nimmt (Brandner et al. 1996a). Das gleiche Experiment, diesmal jedoch gefolgt von einer intraokulären Infektion, zeichnet sich durch das Fehlen von Erkrankungscharakteristika – sowohl im Empfängergehirn als auch im Transplantat – aus. Für die Ausbreitung von Prionen in das ZNS ist also PrP-exprimierendes Gewebe notwendig (Brandner et al. 1996b). Die Gruppe um Brandner führte diesen Versuchsaufbau fort (Blättler et al. 1997): Prnp<sup>0/0</sup>-Mäuse mit einem PrP-exprimierenden Neurograft, die erwartungsgemäß nach intraperitonealer oder intravenöser Inokulation von Scrapie-Erregern keine entsprechenden histopathologischen Veränderungen im Transplantat gezeigt hatten, erhielten zusätzlich eine Knochenmarkstransplantation mit PrP-kompetenten Zellen. Hierauf fanden sich zwar hohe Infektiositätstiter in der Milz dieser Tiere, eine Scrapie-Pathologie im Neurograft konnte jedoch nach peripherer Übertragung noch immer nicht hervorgerufen werden. Somit wurde postuliert, dass der Erregertransfer vom lymphoretikulären System (LRS) bis hin zum ZNS eines weiteren, dazwischengeschalteten Gewebes bedarf, welches ebenfalls PrP exprimiert.

#### 1.2.1 Das vegetative Nervensystem

Mehrere tierexperimentelle Studien zur räumlich-zeitlichen Erregerausbreitung lassen sich dahingehend interpretieren, dass es sich bei diesem Gewebe um das PNS, und zwar insbesondere um dessen autonome Anteile, handelt. Dabei existieren im Wesentlichen zwei Hypothesen zu einer möglichen anatomischen Route des infektiösen Agens, die rückenmarksabhängige bzw. -unabhängige. Einerseits gelang in auf verschiedenem Weg peripher mit Scrapie infizierten Nagern der Erregernachweis im thorakalen Rückenmark als erster ZNS-Station. Von hier aus erfolgte die weitere Verbreitung des Erregers nach rostral in das Zervikalmark und Gehirn sowie nach kaudal in das lumbale Rückenmark (Kimberlin und Walker 1980; Beekes et al. 1996). Aus diesem Grund wurde das sympathische Nervensystem, welches über die Nervi (Nn.) splanchnici eine anatomische Verbindung zwischen dem Thorakalmark und den viszeralen Organen als Orten der primären

Erregerreplikation darstellt, als entscheidend postuliert. Bezüglich letzterer ist insbesondere erneut die Milz zu nennen, die fast ausschließlich durch adrenerge Fasern innerviert wird (Kimberlin und Walker 1980). Die Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die Pathogenese von Prionkrankheiten wird ferner durch die Tatsache veranschaulicht, dass eine Sympathektomie nach intraperitonealer Inokulation von Prionen zu einer Verzögerung oder sogar Verhinderung von Scrapie führen kann. Hingegen kommt es bei transgenen Mäusen mit einer sympathischen Hyperinnervation lymphatischer Organe zu einer Verkürzung der Inkubationszeit (Glatzel et al. 2001). Andererseits existieren auch Hinweise auf eine alternative Infektionsroute unabhängig vom Rückenmark (Beekes et al. 1996). So zeigte sich bei oral mit Scrapie inokulierten Hamstern als erste im Gehirn betroffene Region der parasympathische Nucleus (Ncl.) dorsalis nervi vagi in der Medulla oblongata. Die ersten spinalen Ablagerungen fanden sich zwar auch hier throrakal, allerdings erst zeitgleich mit einer Akkumulation im Gehirn. Ebenso fand, wie bereits beschrieben, vom Thorakalmark ausgehend eine Ausbreitung des Erregers in kaudaler und kranialer Richtung statt, ein Nachweis im zervikalen Mark gelang aber erst, nachdem das infektiöse Agens bereits in der Medulla oblongata detektiert worden war. Ein rostraler Aufstieg der Infektion von spinal nach zerebral wurde demnach als Erklärung für die frühe Beteiligung der Medulla oblongata ausgeschlossen. Hingegen wurde entsprechend der Nervus (N.) vagus als ausschlaggebende Leitstruktur der fehlgefalteten Proteine aus den enterischen Gebieten bis in das ZNS hin postuliert (Beekes et al. 1998). Ähnliche Hinweise für eine solche direkte Route in das Gehirn ergaben auch die Untersuchungen an intraperitoneal infizierten Hamstern. Von der Medulla oblongata ausgehend wurde hier ferner eine rostrale Ausbreitung der Infektion bis in die kortikalen Areale beschrieben (Baldauf et al. 1997).

#### 1.2.2 Die Rolle sensibler Ganglien in verschiedenen Tiermodellen

In einer weiteren tierexperimentellen Studie an oral mit Scrapie infizierten Hamstern konnten diese beiden beschriebenen Möglichkeiten eines zentripetalen Ausbreitungswegs aus den enterischen Gebieten in das ZNS parallel dargestellt werden: die rückenmarksabhängige über den Sympathikus sowie die rückenmarksunabhängige über den Parasympathikus als primäre Infektionsrouten. Darüber hinaus konnte in dieser Untersuchung auch eine Beteiligung des sensiblen Systems gezeigt werden, verstanden im Sinne einer sekundären zentrifugalen Ausbreitung aus dem ZNS entlang sensorischer Afferenzen in ZNS-nahe sensible Ganglien, in welchen sich die fehlgefalteten Proteinaggregate in dieser Analyse zuletzt zeigten. Ausgehend von den intramuralen Ganglien des *Plexus (Pl.) submucosus* und *myentericus* im Gastrointestinaltrakt als Ort der Erregeraufnahme leiten die Autoren also folgendes Modell ab: Einerseits kommt es über die efferenten Fasern des *N. splanchnicus* zu einem Erregertransport in das thorakale Rückenmark und von hier aus neben einer weiteren Ausbreitung innerhalb des ZNS auch zu einem retrograden Transport in die Spinalganglien. Andererseits gelangen die Prionen über efferente Fasern des *N. vagus* in den *Ncl. dorsalis nervi vagi* in der *Medulla oblongata*. Von

hier aus findet neben einer weiteren Ausbreitung in benachbarte Hirnstammareale ebenfalls ein retrograder Transport in das *Ggl. nodosum* statt (McBride et al. 2001). Weitere Untersuchungen an demselben Tiermodell konnten immunhistochemische Einschlüsse von pathologischem PrP in den entsprechenden Stationen des PNS detektieren: bereits früh im Krankheitsverlauf in den Ganglien des Auerbach- und Meissner-*Plexus* als den beiden Hauptkomponenten des enterischen Nervensystems (ENS) (Beekes und McBride 2000), im Spinalganglion und *Ggl. nodosum* sowie im zöliakal-mesenterialen Ganglienkomplex (CMGC) des Sympathikus (McBride und Beekes 1999).

Ein dem oralen Hamstermodell grundsätzlich ähnliches Pathogenesekonzept zur zentralen Neuroinvasion wird auch für Nutztiere wie Rinder und Schafe angenommen (van Keulen et al. 2008). Bei der experimentellen BSE wurde eine Beteiligung des PNS im Sinne von Infektiosität in zervikalen und thorakalen Spinalganglien sowie im Trigeminusganglion gezeigt (Wells et al. 1998). Ebenfalls im Rahmen einer experimentellen BSE-Studie wurde eine immunhistochemische Positivität des Trigeminusganglions als beginnende zentrifugale Ausbreitung des Erregers interpretiert (Kaatz et al. 2012). Mittels intraperitonealer Scrapie-Inokulation von Schafen und Hamstern sowie anschließender PrPsc-Immunhistochemie konnten prominente Proteinablagerungen im Trigeminal-, Spinal-, Zöliakal-, thorakalen Grenzstrangganglion und *Ggl. nodosum* nachgewiesen werden (Groschup et al. 1999).

Ebenfalls für ein sekundär zentrifugales Ausbreitungsmuster in nicht-autonome neuronale Strukturen sprechen die Versuchsergebnisse einer Scrapie-Studie mit Mäusen. Die Autoren vertreten die auf die zentripetale, rückenmarksabhängige Ausbreitung des Erregers folgende zentrifugale Ausdehnung vom Thorakal- und Lumbalmark aus in die entsprechenden Spinalganglien (Kimberlin et al. 1983b).

#### 1.2.3 Das Primaten-Modell

McBride und Beekes (1999) hatten bereits am oralen Hamstermodell als Erklärung für die Beteiligung sensorischer Ganglien auch einen direkten anterograden Transport entlang afferenter Fasern der Nn. splanchnici bzw. des N. vagus im Sinne einer alternativen neuroanatomischen Route diskutiert. In diesem Sinne argumentierten auch Holznagel et al. (2015) im Rahmen ihrer Analyse eines experimentellen vCJD-Modells an nicht-humanen Primaten. Hierbei wurden verschiedene Gewebe von oral mit BSE inokulierten Makaken u. der paraffin-embedded tissue blot (PET-Blot)-Methode im Krankheitsverlauf auf PrPres-Ablagerungen hin untersucht. Das Ergebnis war ein Modellvorschlag zur Neuroinvasion von Prionen, welcher sich grundlegend von den bereits für Nager und Wiederkäuer beschriebenen unterschiedet (s. 1.2.1 und 1.2.2). Primäres Ereignis nach Aufnahme des Erregers in den Darm ist auch hier die Prionreplikation im LRS im Sinne des gut-associated lymphoid tissue (GALT) sowie der Peyer-Plaques, gefolgt von einer Infektion des ENS. Die zentripetale Route der Prionen führt nun aber auf anterogradem Weg entlang sensibler Afferenzen in das spinale Hinterhorn als erste befallene ZNS-Station, v. a. im Bereich der lumbalen Rückenmarkssegmente; bereits

zuvor finden sich auch Akkumulationen in den entsprechenden Spinalganglien. Erst im weiteren Verlauf kommt es durch sekundär-zentrifugale Ausbreitung des Erregers über das spinale Vorderhorn entlang präganglionärer Fasern auch zu einer Beteiligung para- und prävertebraler sympathischer Ganglien sowie hierüber schließlich auch des außerhalb des Darms gelegenen LRS, insbesondere der Milz und auch Tonsillen. Als mögliche Ursache für diese sehr verschiedenen Neuroinvasionsstrategien von Prionen bei Mäusen, Hamstern, Schafen und Rindern einerseits sowie Affen andererseits nennen die Autoren speziesspezifische Unterschiede in der anatomischen und funktionellen Innervation des Darms.

#### 1.2.4 Erkenntnisse zu peripheren Nerven und Sinnesorganen

In einer Untersuchung an Scrapie-infizierten Schafen gelang der Nachweis von Infektiosität in zahlreichen peripheren Nerven, mit den höchsten Titern in *N. ischiadicus* und *N. axillaris* sowie geringeren auch in *N. ulnaris*, *N. medianus*, *N. tibialis* und *N. fibularis*. Die periphere Erregerkonzentration schien also rückenmarksnah relativ gesehen noch höher zu sein, was im Sinne eines zentrifugalen Ausbreitungsmusters interpretiert werden kann (Groschup et al. 1996). Umgekehrt konnte im Mausversuch eine Infektion des ZNS durch Inokulation des Scrapieerregers in den *N. ischiadicus* demonstriert werden. Im Verlauf der Erkrankung konnte hierbei eine vergleichbare Infektiosität im ursprünglich injizierten sowie dazu kontralateralen Nerven festgestellt werden, abermals hinweisend auf eine sekundärzentrifugale Ausbreitung aus dem ZNS (Kimberlin et al. 1983a).

Bei experimentell intrazerebral mit Scrapie infizierten Hamstern finden sich hohe Infektiositätstiter in *N. opticus* und Retina, ebenfalls in Übereinstimmung mit einem zentrifugalen Ausbreitungsmuster (Buyukmihci et al. 1980). Durch konjunktivale Erregerinokulation wiederum ist im Mausversuch eine Übertragung von Scrapie möglich (Scott et al. 1993).

DeJoia et al. (2006) konnten im Rahmen der intrazerebralen Infektion von Hamstern mit TME eine zentrifugale Ausbreitungstendenz des Erregers in die nasale und orale chemosensorische Mukosa beschreiben und diskutierten insbesondere die mögliche Bedeutung dieses Befundes für die horizontale Transmission von Prionen, wie sie bei Scrapie oder **CWD** beobachtet werden kann. Die hierbei durchgeführte immunhistochemische Untersuchung des Zungengewebes ergab Ablagerungen von PrPsc nicht nur in Nervenfasern, sondern auch in den Geschmackspapillen, welche speziellviszerosensibel durch die Chorda tympani und allgemein-somatosensibel durch den N. lingualis innerviert werden. Von den Autoren wurde daher eine Verbreitung des infektiösen Agens vom Hirnstamm aus entlang der entsprechenden Hirnnerven N. facialis und N. trigeminus sowie eine anschließende transsynaptische Übertragung auf die peripheren Sinneszellen angenommen.

Als interessantes neuroanatomisches Detail, welches wiederum die Verbindung zum ANS herstellt, ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass durch den Nel. tractus solitarii in der

Medulla oblongata, in welchem die gustatorischen Afferenzen terminieren, über Interneurone eine Verbindung zum Nel. dorsalis nervi vagi besteht. Bei einer Ausbreitung der Prionen über das parasympathische System (s. 1.2.1) ist der Nel. tractus solitarii nach dem Nel. dorsalis nervi vagi als zweite ZNS-Station befallen. In einem zweiten Schritt kann über diese Verbindung außerdem die erwähnte sekundär-zentrifugale Ausdehnung der Infektion in das sensible Ggl. nodosum (s. 1.2.2) stattfinden (Beekes et al. 1998; McBride et al. 2001).

pathogenetische Beteiligung Eine grundsätzliche des Trigeminusganglions Prionkrankheiten konnte bereits in unterschiedlichen Tierversuchen belegt werden (s. 1.2.2). Ingrosso et al. (1999) gelang es, am Scrapie-Modell des Hamsters auch die Relevanz der trigeminalen Route sowohl in zentrifugaler als auch in zentripetaler Richtung darzustellen. Eine Infektiosität des Trigeminusganglions und dentaler Gewebe nach primärer ZNS-Beteiligung sprach für eine Ausbreitung des Erregers aus den sensiblen Kerngebieten des Hirnstamms entlang trigeminaler Nervenfasern. Umgekehrt gelang nach Erregerinokulation in die Pulpa eine Fortleitung der Infektion in das ipsilaterale Trigeminusganglion sowie die Auslösung der klinischen Erkrankung. Die Tatsache, dass im Mausversuch über eine Verletzung der Mundschleimhaut trigeminales als Versorgungsgebiet eine Steigerung der oralen Übertragbarkeit erreicht werden kann (Carp 1982), zeigt einmal mehr die mögliche Relevanz dieser Route ebenfalls in zentripetaler Richtung.

#### 1.2.5 Befunde beim Menschen

Bei der vCJD ist es immunhistochemisch gelungen, eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems nachzuweisen. PrPsc-Akkumulationen fanden sich hierbei im Ganglion (Ggl.) coeliacum, stellatum und mesentericum superius (sup.). Entsprechende Ablagerungen fehlten allerdings bei Patienten mit sCJD oder iCJD (Haïk et al. 2003). Auch in einer immunhistochemischen Untersuchung von spinalen und enterischen Ganglien sowie Hinterwurzel überwiegend CJD, Vorderund bei aber auch genetischen Prionerkrankungen in Form je eines GSS- sowie FFI-Patienten, zeigten sich insbesondere im Vergleich zum Tierversuch die pathologischen Proteinablagerungen nur sehr diskret in adaxonaler Lokalisation im Fall der Hinterwurzel bei einem CJD- und dem GSS-Fall bzw. nicht vorhanden in den Spinal- und enterischen Ganglien (Hainfellner und Budka 1999). In einer weiteren Untersuchung zur Beteiligung des PNS bei verschiedenen Subformen humaner Prionkrankheiten konnte jedoch neben teilweise neueren Erkenntnissen zum autonomen (s. 4.1) insbesondere auch eine herausragende Bedeutung des sensiblen Systems beschrieben werden. So zeigten sich bei allen vier untersuchten Typen sCJD, vCJD, iCJD und GSS positive immunhistochemische Färbeergebnisse im Ggl. Gasseri bzw. Spinalganglion. Entsprechend fand sich auch im ZNS insbesondere ein Befall von Strukturen, die an sensorischen Signalwegen beteiligt sind, wie Nol. cuneatus und gracilis (Lee et al. 2005). Einen Hinweis für die pathogenetische Beteiligung des Ggl. trigeminale im Fall der CJD konnten auch andere Wissenschaftler mit u. a. immunhistochemischer Methodik

erbringen (Guiroy et al. 1989).

In einer *post mortem*-Untersuchung bei sCJD-Patienten gelang der Nachweis von PrPse mittels IHC nicht nur in den zentralen Bahnen des olfaktorischen Signalwegs, sondern auch in dessen peripheren Anteilen im Sinne von olfaktorischen Zilien des Neuroepithels (Zanusso et al. 2003). Wenig später gelang dieser Nachweis mittels Biopsie in einem Fall auch *in vivo* 45 Tage nach Ausbruch der Erkrankung. Bezüglich einer Erklärung für diesen Befund diskutierten die Autoren neben einer zentrifugalen Ausbreitung auch die Möglichkeit, dass das fehlgefaltete PrP bedingt durch eine somatische Mutation seines Gens im Rahmen der Neurogenese einen lokalen Ursprung im olfaktorischen Epithel haben könnte (Tabaton et al. 2004). Auch klinische Befunde stimmen mit einem Befall des olfaktorischen und gustatorischen Systems überein: Bei einem Patienten mit vCJD zählten Hyposmie und Hypogeusie zu den initialen Symptomen (Reuber et al. 2001).

#### 1.3 Die Beteiligung nicht-neuronaler peripherer Organsysteme

#### 1.3.1 Das lymphoretikuläre System

Bereits anhand der eingangs erwähnten Versuche von Blättler et al. (1997) sowie den nachfolgenden Erläuterungen zum PNS wurde die Bedeutung des LRS als primäres Ziel der Prionen nach peripherer Infektion deutlich. Auch einige weitere Untersuchungen weisen in diese Richtung; oft bezieht man sich hierbei auf die intraperitoneale Infektionsroute. Innerhalb des LRS hat man insbesondere der Milz große Bedeutung beigemessen (s. 1.2.1): Im Mausversuch führt die Splenektomie vor experimenteller Infektion auf intraperitonealem, nicht aber intrazerebralem Weg zu einer Verlängerung der Inkubationszeit (Fraser und Dickinson 1970). Tatsächlich gilt die Bedeutung der Milz in diesem Maße aber eher für den intraperitonealen Infektionsweg; bei intragastrischer, vergleichbar einer oralen Inokulation scheint eine primäre Invasion der Darmwand entscheidender zu sein (Kimberlin und Walker 1989). Nach van Keulen et al. (2008) wird im Anschluss an den Mukosa-Übertritt eine Akkumulation und Replikation des Erregers im GALT, wie Peyer-Plaques, aber auch Tonsillen, angenommen, von wo aus die Infektion des ENS möglich ist.

Mit dem Wissen um die entscheidende Rolle des LRS sind auch Versuche unternommen worden, die konkrete Zellpopulation zu identifizieren, welche hier für Prion-Akkumulation und -Replikation verantwortlich sein könnte. Dabei waren Maus-Experimente mit verschiedenen Immundefekten hilfreich. So lassen sich beispielsweise Mäuse mit einer sog. severe combined immunodeficiency, einer Defizienz von B- und T-Zellen, nur intrazerebral, nicht aber intraperitoneal infizieren. Dabei zeigen sie nach einem intraperitonealen Inokulationsversuch weder Akkumulationen von PrPsc noch infektiöse Titer in der Milz (Kitamoto et al. 1991; O'Rourke et al. 1994). Als mögliche Kandidaten haben sich so schließlich die B-Lymphozyten (Klein et al. 1997) bzw. die funktionell von diesen abhängigen follikulären dendritischen Zellen (FDZ) herauskristallisiert (Kitamoto et al.

1991).

Bei der CJD des Menschen gelang zunächst kein Nachweis von Prionen im LRS (Kitamoto et al. 1989). Eine Ausnahme stellte bald die vCJD dar, für die mittels IHC und Western Blot eine pathogenetische Beteiligung von Tonsillengewebe, Milz und Lymphknoten gezeigt werden konnte (Hill et al. 1997; Hill et al. 1999). Ferner demonstrierte man bei einem Patienten mit vCJD eine Prion-Immunreaktivität in der Appendix bereits acht Monate vor Beginn der klinischen Symptomatik (Hilton et al. 1998). Aus dem Vereinigten Königreich stammt ferner eine Untersuchung archivierter Appendix-Proben im Hinblick auf das Vorhandensein von pathologischem PrP. Diese lieferte Hinweise darauf, dass sich in der Bevölkerung eine nicht unerhebliche Zahl an Personen mit vCJD-Carrier-Status befindet, welche die Erkrankung also möglicherweise noch inkubieren (Gill et al. 2013). Ebenfalls im Einklang mit dem angenommenen enteralen Übertragungsweg gelang der u. a. immunhistochemische Nachweis von PrPsc bei dieser CJD-Form auch im terminalen Ileum (Joiner et al. 2005). Schließlich haben sich bei der vCJD sehr wahrscheinlich bereits wenigstens vier Fälle einer bluttransfusionsassoziierten Übertragung ereignet (Seed et al. 2018). Auch bei der sCJD ist inzwischen das Vorhandensein von PrPsc in der Milz postuliert worden (Glatzel et al. 2003).

Bereits zuvor gelang bei an Scrapie erkrankten Schafen der immunhistochemische Nachweis von PrPsc ebenfalls in Milz, Lymphknoten und Tonsillen (van Keulen et al. 1996). Bei Scrapie scheint ferner eine relevante hämatogene Streuung stattzufinden, während bei der BSE eine ausschließliche Beteiligung des GALT-Systems bekannt ist (van Keulen et al. 2008). Auch bei der CWD gibt es nach oraler Inokulation Hinweise auf eine frühe Akkumulation des Erregers im lymphatischen System des Gastrointestinaltrakts (Sigurdson et al. 1999).

Nach transnasaler Infektion von Hamstern mit TME bzw. Scrapie scheint es nicht zu einer direkten zentripetalen Ausbreitung des Inokulums entlang olfaktorischer neuronaler Bahnen in das ZNS hin zu kommen (s. 1.2.4 und 1.2.5). Vielmehr läuft eine primäre Erregerreplikation im nasal mucosa-associated lymphoid tissue (NALT) sowie nachfolgend in den kranialen Lymphknoten ab. Erst hiernach gelingt über alternative neuronale, a.e. trigeminale und vagale Routen die Neuroinvasion (Kincaid und Bartz 2007; Sbriccoli et al. 2009).

Dass jedoch auch eine unmittelbare Infektion von peripherem Nervengewebe sowie darauffolgend des ZNS ohne die Notwendigkeit einer extraneuralen Replikation grundsätzlich möglich ist, wurde bereits erwähnt (Kimberlin et al. 1983a). Durch die Verwendung eines DY TME-Stammes, welcher nicht zur Replikation im LRS befähigt ist, waren Bartz et al. (2005) in der Lage, Invasionsrouten zu untersuchen, die von einer Prion-Replikation im LRS unabhängig sind. Entsprechend konnten mit diesem Erreger am Hamstermodell nach u. a. intraperitonealer und oraler Inokulation weder PrPsc-Ablagerungen im LRS noch eine klinische Symptomatik hervorgerufen werden. Nach Erregerinokulation in die Zunge jedoch kam es auch ohne vorherige Infektion des LRS zu

einer Auslösung der Erkrankung. Die Lokalisation der initialen Agens-Depositionen im Hirnstamm war hierbei vereinbar mit einer axonalen Erregerausbreitung entlang der lingualen Hirnnerven, in dem Sinne, dass der Nel. nervi hypoglossi sowie der Nel. tractus solitarii betroffen waren. Hier war es also einerseits gelungen, die Bedeutung dieser Route analog zu DeJoia et al. (2006) in zentripetaler Richtung darzustellen (s. 1.2.4), andererseits resultierte, dass nach Inokulation von dicht innervierten peripheren Geweben, wie in diesem Beispiel der Zunge, auch eine LRS-unabhängige Neuroinvasion etabliert werden kann. Hinweise darauf, dass das Immunsystem zwar ein bedeutendes, nicht aber das einzig mögliche primäre Zielorgan von Prionen bei der Ausbreitung in das ZNS hin darstellt, ergaben sich bereits früher. Auch die Versuchsergebnisse von Lasmézas et al. (1996) nach peripherer Übertragung sind vereinbar mit einem direkten Übergang der Infektion auf das viszerale Nervensystem unter Umgehung des LRS.

#### 1.3.2 Die Muskulatur und weitere periphere Gewebe

Bei der Untersuchung von DeJoia et al. (2006) (s. 1.2.4) fand sich PrPsc auch in Skelettmuskelzellen, was nach dem Konzept der Autoren auf eine Infektion von Motoneuronen des N. hypoglossus hindeutete. Auch Thomzig et al. (2003) konnten am oralen Scrapie-Modell des Hamsters mittels Western Blot PrPsc-Akkumulationen der Skelettmuskulatur in zahlreichen Körperregionen, u. a. der Zunge, nachweisen. Auch bezüglich einer atypischen Form der BSE beim Rind gelang der Nachweis von Infektiosität sowie immunhistochemisch pathologischen Proteinablagerungen in der Skelettmuskulatur (Suardi et al. 2012). Glatzel et al. (2003) postulierten das Vorhandensein von PrPsc sogar im Skelettmuskelgewebe von Patienten mit sCJD. Herzog et al. (2005) nutzten das bereits genannte Makaken-Modell, um die periphere Pathogenese verschiedener, insbesondere humaner TSE nachzustellen. Zu diesem Zweck erfolgte eine Infektion der Primaten mit dem Agens der BSE, vCJD, iCJD oder sCJD. Verschiedene extraneurale Gewebe wurden mithilfe der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Technik auf das Vorhandensein pathologischen PrPs hin untersucht. Ein gerade im Vergleich zur sCJD und iCJD ausgedehnter Lymphotropismus zeigte sich hierbei im BSE- bzw. vCJD-Versuch. Geringere Mengen an fehlgefaltetem PrP fanden sich u. a. auch in der Muskulatur bei allen drei untersuchten humanen Prionkrankheiten. Für die Involvierung dieses Organs machten die Autoren eine sekundär-zentrifugale Ausbreitung des Agens entlang peripherer Nerven verantwortlich, sich die entsprechenden muskulären Proteinaggregate immunhistochemisch in enger Nachbarschaft zu ebenfalls befallenen Nervenstrukturen zeigten.

Die nun abschließend folgende Aufzählung erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, es soll lediglich die Erkenntnis vermittelt werden, dass über die besprochenen Organsysteme hinaus inzwischen zahlreiche weitere nicht-neuronale Gewebe bekannt sind, in welchen relevante Mengen an Infektiosität vorhanden sein können. Bei Scrapie ist eine Ansteckung durch orale Inokulation von Fetus-assoziiertem Gewebe beschrieben (Pattison

et al. 1972; Pattison et al. 1974). Sogar in der Milch von Schafen, welche sich noch in der Inkubationszeit von Scrapie befanden, gelang der Nachweis nicht unerheblicher Infektiositätstiter (Lacroux et al. 2008). Bei Scrapie-infizierten Mäusen schließlich konnte eine prionassoziierte Infektiosität im Fettgewebe nachgewiesen werden (Race et al. 2008).

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das offenkundige Zielorgan der von Prionen verursachten Erkrankungen ist das ZNS. Dennoch gibt es inzwischen zahlreiche Belege dafür, dass sowohl das PNS als auch einige nicht-neuronale, periphere Organsysteme eine Rolle in der Pathogenese dieser Gruppe von Krankheiten spielen. Ein Hinweis auf diese Tatsache ist nicht zuletzt die Möglichkeit einer peripheren Übertragbarkeit, welche für mehrere TSE bekannt ist, etwa auf oralem Weg im Fall der Kuru, BSE und vCJD oder aber parenteral bei der iCJD (s. 1.1.1).

Die meisten Erkenntnisse zum aktuellen Zeitpunkt wurden aus dem Tierversuch, insbesondere dem oralen Hamster-Modell, gewonnen; danach stellt nach peripherer Erregeraufnahme primär das autonome Nervensystem (ANS) die entsprechende Leitstruktur für die Infektionsausbreitung in das Gehirn dar (s. 1.2.2). Bislang existieren nur wenige Untersuchungen zur Ganglienbeteiligung beim Menschen. Am sichersten ist die Kenntnislage im Hinblick auf eine immunhistochemische Positivität des Trigeminusganglions bei der CJD (s. 1.2.5), a.e. erklärbar im Rahmen einer zentrifugalen Ausbreitung der fehlgefalteten Proteine.

Die Pathologie der sCJD wird grundsätzlich entscheidend beeinflusst von dem Zusammenspiel aus Erregerstamm (PrPsc-Typ 1 bzw. 2) und der genetischen Prädisposition des Patienten (Codon-129-Polymorphismus für Methionin bzw. Valin) (s. 1.1.4). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der postmortalen Untersuchung verschiedener Stationen des PNS bei Patienten mit neuropathologisch gesicherter Diagnose einer humanen Prionerkrankung (überwiegend sCJD) mit der Frage nach Art und Ausmaß einer pathogenetischen Beteiligung dieses Organs. Aufgrund der dargestellten Kenntnislage in der Literatur erfuhren hierbei sensible und autonome Ganglien eine besondere Berücksichtigung. Methodisch wurde überwiegend der PET-Blot verwendet, das derzeit sensitivste Verfahren zum Nachweis von PrPsc im Gewebe (s. 2.2.3). Die organbezogene Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des PrPsc-Typs sowie des Codon-129-Polymorphismus.

Wir erwarteten, dass sich die bekannte Positivität des *Ggl. trigeminale* im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung in vielen Fällen würde bestätigen lassen. Ferner nahmen wir aufgrund der dargestellten Kenntnisse aus den Tierversuchen an, dass auch den autonomen Ganglien im humanen Kontext eine bedeutendere als bislang bekannte Rolle zukommen könnte, deren Demonstration uns mittels der hochsensitiven Methode des PET-Blots gelingen würde. Grundsätzlich vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen dem Umfang dieser PNS-Beteiligung sowie den sechs verschiedenen sCJD-Varianten, die theoretisch zugrunde liegen können. Sofern sich ein relevanter Ganglienbefall zeigen

würde, wollten wir uns schließlich analog zu den Tiermodellen mit der Frage beschäftigen, ob die Erregerausbreitung beim Menschen zentrifugal und/oder zentripetal stattgefunden haben könnte.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Kühlschrank 4 °C	Bosch
Tiefkühler -20 °C	Liebherr
Mikrowelle	Panasonic
Kälteplatte	Medite
Wärmeplatte	Medax
Wärmekammer	Thermo
Wasserbad 100 °C	Schütt
Mikrotom	Leica
Einbettapparatur	Shandon
Ausgießapparatur	Medite
diverse Wagen	Sartorius
Vortexer	neoLab Migge
Zentrifuge	Eppendorf
Magnetrührer	Heidolph
pH-Meter	Sartorius
Schüttler	Heidolph
Auflichtmikroskop	Olympus
Durchlichtmikroskop	Olympus
Kamera	Olympus
Hellendahl-Küvetten (Glas/Kunststoff)	Geyer
Gläserne Küvetten	Schott
Gläserne Schaukeln	Schott
Zylinder	Duran

Erlenmeyer-Kolben	Fisher
Kunststoff-Boxen	Gilson
Kunststoff-Klammern	Gilson
Trichter	Fackelmann
Pipettierhilfe (mechanisch)	Eppendorf
Pipettierhilfe (elektronisch)	Hirschmann
Pinsel	Pelikan
Skalpell	Dallhausen
Power-Station	Biometra
Laufkammer	BioRad
Kunststoff-Kamm	BioRad
Blotter	Hoefer SemiPhor

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Unbeschichtete Glasobjektträger	Thermo
Deckgläschen (24x36 mm, 24x48 mm)	Thermo
Einbettkassetten	Kabe
Plastik-Cups	Sarstedt
Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt
Cellulose-Tupfer	Fuhrmann
Papierfilter (verschiedene Größen)	Amersham biosciences
Nitrocellulose-Membran	Biorad
Cellulose-Schichten	Whatman
Entwicklungsfolie	Sarstedt
Film	Amersham biosciences

#### 2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
PBS	Applichem
NaCl	Merck
Natrium-Nitrit	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
CaCl <sub>2</sub>	Fluka
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich
HCl	Applichem
Citrat	Merck
Ameisensäure	neoLab Migge
Essigsäure	Roth
NaOH	Merck
Tris(-Base)	Roth
$H_2O_2$	Applichem
Xylol	Merck
Ethanol	Applichem
Methanol	Applichem
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Chemie Vertrieb Hannover
Aquatex	Merck
Depex	Serva
Mayers Hämalaun	Merck
Eosin G	Merck
Neufuchsin	Sigma-Aldrich
Aminoethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich
NBT	Sigma-Aldrich
BCIP	Boeringer-Mannheim
As-Bi-Phosphat	Sigma-Aldrich
Levamisol	Erva

Dimothylformanid (DMEA)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMFA)	
EDTA	Fluka
Guanidiniumisothiocyanat (GdnSCN)	Amresco
Tween 20	Roth
I-Block	Applied biosystems
Brij 35	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
DOC Detergens	Sigma-Aldrich
SDS	Roth
TEMED	BioRad
APS	Merck
Acrylamid	Roth
Glycin	Roth
Bromphenolblau	Roth
Formalin	Merck
Paraplast Plus (Paraffin, Einbettmedium)	McCormick scientific
Streptavidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich
PK	Sigma-Aldrich
Entwicklungsreagenzien	Super Signal Femto West
Entwicklungsbad	Tetenal
Fixierbad	Tetenal
Marker	BioRad

#### 2.1.4 Lösungen und Puffer

PBS: 9,6 g Fertigpulver auf 1 l zweifach destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>)

**TBS** (10x, pH 7,6 oder 8,8): 60,5 g Tris-Base, 85 g NaCl auf 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**PBST:** PBS mit 0,1 % Tween 20

**TBST:** 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Tris-HCl: 1 M Tris-Base in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, pH-Wert-Einstellung mit 30 % HCl

**Isoxylol:** Xylol:Isopropanol 1:1

**HCl-Alkohol für HE:** 350 ml Isopropanol, 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 5 ml 30 % HCl

**HCl-Alkohol für IHC:** 150 ml Isopropanol, 2 ml 30 % HCl, Auffüllen auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**0,2%iges Casein:** 2 g I-Block, 1 ml Tween 20 auf 1 l PBS

**PK-Verdaupuffer für PET-Blot:** 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM NaCl, 0,1 % Brij 35, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**PK-Verdaupuffer für IHC (Angaben für eine Küvette):** 49 ml TBS pH 7,6, 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>

PK-Ansatz für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot: 2,25 ml 4xPBS + 250 µl MgCl<sub>2</sub> + 5 µl PK-Stocklösung (50 mg/ml)

**Probenpuffer (4x):** 50 mM Tris, 12 % SDS, 30 % Glycerin, eine "Prise" Bromphenolblau; pH-Wert auf 6,8 einstellen; direkt vor Gebrauch 5 % Mercaptoethanol hinzufügen

Laufpuffer (10x): für 1 1 30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS; mit HCl auf pH 8,4 einstellen

**Transferpuffer:** 20 % Methanol, 2 mM EDTA, 40 mM Tris, 0,05 % SDS; mit Essigsäure auf pH 7,6 einstellen

Sammelgel (5%ig) (Angaben für zwei Gele):  $278 \mu l$  30 % Acrylamid,  $417 \mu l$  Sammelgelpuffer,  $944 \mu l$  H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>,  $33.3 \mu l$  10 % SDS,  $3.33 \mu l$  TEMED,  $8.33 \mu l$  10 % APS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris pH 6,8

Trenngel (15%ig) (Angaben für zwei Gele): 5 ml 30 % Acrylamid, 2,5 ml Trenngelpuffer, 2,4 ml  $H_2O_{dd}$ , 10  $\mu$ l TEMED, 100  $\mu$ l 10 % SDS, 50  $\mu$ l 10 % APS

**Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris pH 8,8

Eosin (Gebrauchslösung): 1 % Eosin G in 70 % Isopropanol, etwas Essigsäure zusetzen

Färbelösung für PET-Blot (Angaben für eine Box): 90 μl NBT, 66 μl BCIP auf 20 ml NTM

**NTM:** 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> in einfach destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)

**NBT (Stocklösung):** 75 mg auf 1 ml 70 % DMFA

BCIP (Stocklösung): 50 mg auf 1 ml 100 % DMFA

Färbelösung für IHC mit Neufuchsin (Angaben für eine Küvette):

I: 10 mg Natrium-Nitrit, 250 μl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 100 μl Neufuchsin

II: 14 mg As-Bi-Phosphat, 300 µl DMFA

III: 50 ml TBS, 25 mg Levamisol

Neufuchsin (Stocklösung): 5 g auf 100 ml 2 M HCl

#### Färbelösung für IHC mit AEC (Angaben für eine Küvette):

Lösung A: 5,75 ml Essigsäure auf 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Lösung B: 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat auf 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

AEC-Stammlösung: 1 g AEC auf 250 ml DMFA

#### 2.1.5 Antikörper

#### 2.1.5.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-PrP 12F10	Maus, monoklonal	1:5.000 (PET-Blot), 1:500 (IHC)	Deutsches Primatenzentrum Göttingen, Prof. Dr. Bodemer
anti-PrP 3F4	Maus, monoklonal	1:2.000 (PET-Blot), 1:3.000 (Western Blot)	Robert Koch-Institut Berlin, PD Dr. Beekes
anti-PrP ICSM-18	Maus, monoklonal	1:5.000 - 1:10.000 (PET-Blot), 1:500 - 1:1.000 (IHC)	D-Gen

#### 2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
goat-anti-mouse, AP-gekoppelt	Ziege	1:1.000 (PET-Blot), 1:500 - 1:1.000 (IHC)	Dako
sheep-anti-mouse, biotinyliert	Schaf	1:200 (IHC mit AEC)	Amersham biosciences
goat-anti-mouse, HRP-gekoppelt	Ziege	1:1.000 (Western Blot)	Dako

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Aufbereitung des Gewebes

Nach Entnahme der Organe im Rahmen der Sektion erfolgte deren Fixierung in 4%igem Formalin für drei bis vier Wochen. Anschließend wurde das Gewebe zugeschnitten und in Einbettkassetten verpackt. Es folgte – bis auf wenige Ausnahmen – eine einstündige Dekontamination des Materials in Ameisensäure. Schließlich wurde das Gewebe für zwei Tage in Formalin nachfixiert. Hiernach konnte es nach folgendem Protokoll in Paraffin eingebettet werden: 50 %vol Isopropanol für fünf Stunden, 70 %vol Isopropanol für fünf Stunden, dreimal 90 %vol Isopropanol für je fünf Stunden, dreimal 100 %vol Isopropanol für je fünf Stunden, zweimal Xylol für je drei Stunden und zweimal Einbettmedium für je fünf Stunden. Es folgte das endgültige Ausgießen in Paraffinblöcke, welche nach dem Abkühlen auf der Kälteplatte bei -15 °C am Mikrotom geschnitten werden konnten. Die ideale Schnittdicke betrug für alle hier beschriebenen Protokolle 1-3 µm. Die fertigen Schnitte wurden zunächst vorsichtig mit einem Pinsel auf eine kalte Wasseroberfläche aufgebracht, um sie zu strecken. Von hier wurden sie mithilfe eines unbeschichteten Glasobjektträgers, auf dem sich ggf. eine zuvor befeuchtete Nitrocellulose-Membran befand, abgehoben und in warmes Wasser getaucht, um sie auf diese Weise zu fixieren. Überschüssiges Wasser wurde vorsichtig abgeklopft und mit Filterpapier abgezogen. Die Glasträger wurden an der Luft und die Membranen auf der Wärmeplatte bei 47 °C wenige Stunden aufgestellt. Der eigentliche Trocknungsprozess erfolgte dann über 24 (Glasträger) bzw. 48 (Membranen) Stunden in der Wärmekammer bei 60 °C.

#### 2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient im Allgemeinen der anatomischen Übersicht. Die basophilen Zellkerne färben sich blau und azidophile Strukturen wie das Zytoplasma rot an.

Vor der eigentlichen Färbung erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte nach folgendem Protokoll: Dreimal Xylol für je vier Minuten, Isoxylol für eine Minute, zweimal 100 %vol Isopropanol für je zwei Minuten, 90 %vol, 70 %vol und 50 %vol Isopropanol für je zwei Minuten sowie anschließendes Spülen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> für ca. zwei Minuten. Es schloss sich eine achtminütige Inkubation in Mayers Hämalaun-Lösung und anschließendes Spülen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> an. Nach dem Differenzieren in 1%igem HCl-Alkohol für wenige Sekunden folgte für zehn Minuten das Bläuen unter laufendem Leitungswasser. Im Anschluss an die fünfminütige Einwirkzeit in Eosin sowie erneutes Spülen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> erfolgte die Entwässerung des Gewebes in der aufsteigenden Alkoholreihe nach diesem Protokoll: 50 %vol, 70 %vol und 90 %vol Isopropanol für jeweils wenige Sekunden, zweimal 100 %vol Isopropanol für je

eine Minute, Isoxylol für zwei Minuten und zweimal Xylol für je zwei Minuten. Zum Eindeckeln wurde schließlich das überschüssige Xylol vorsichtig mit Cellulose-Tupfern vom Objektträger entfernt. Der lipophile Klebstoff Depex wurde auf ein Deckgläschen aufgetragen, und dieses luftblasenfrei auf den Glasträger aufgelegt und angedrückt. Es folgte das Trocknen der Schnitte über Nacht unter dem Abzug.

#### 2.2.3 Paraffin-embedded tissue blot

Der PET-Blot ist eine relativ neu entwickelte Methode zum Nachweis von PrPse im Gewebe und kombiniert dabei verschiedene Aspekte herkömmlicher Techniken aus der Diagnostik von Prionkrankheiten (Schulz-Schaeffer et al. 2000). Die Proteindetektion erfolgt wie bei der klassischen IHC nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei werden die Gewebeschnitte allerdings nicht auf gläserne Objektträger, sondern eine Nitrocellulose-Membran aufgezogen. Ähnlich wie beim Histoblot erfolgt auch hier ein Vorverdau dieser Membranen mit PK, um selektiv die pathologische, d. h. PK-resistente Isoform eines Proteins nachweisen zu können. Ein großer Nachteil des Histoblots ist die Tatsache, dass ausschließlich unfixiertes Material verwendet werden kann. Dieses Problem wird im PET-Blot durch seine Anwendbarkeit bei Formalin-fixiertem sowie Paraffineingebettetem Gewebe überwunden. Der alle bisherigen Verfahren zum Nachweis von fehlgefaltetem PrP übertreffenden Sensitivität des PET-Blots steht seine gerade im Vergleich zur IHC lediglich zufriedenstellende anatomische Strukturbeurteilung gegenüber. Zelluläre Details sind hier in den meisten Fällen nicht zu erkennen. Umso bedeutender ist hier der stete Vergleich mit der HE-Übersichtsfärbung.

Bei jedem Durchlauf wurde eine Positivkontrolle als interner Standard mitgeführt. Zu Beginn erfolgte die schrittweise Rehydrierung der Schnitte nach folgendem Schema: Dreimal Xylol für je zehn Minuten, Isoxylol für fünf Minuten, zweimal 100 %vol Isopropanol für je fünf Minuten, 90 %vol, 70 %vol, 50 %vol und 25 %vol Isopropanol für je fünf Minuten sowie abschließend Spülen in PBST für fünf Minuten. Anschließend wurden die Membranen zunächst grob mit Papiertüchern abgetrocknet, per Hand vorsichtig glatt gezogen sowie über Nacht zwischen Cellulose-Streifen lichtgeschützt und unter einem beschwerenden Gewicht trocken gepresst. Unmittelbar vor Weiterverarbeitung erfolgte das Zuschneiden und Verpacken der Membranen in luftdichte Boxen. Hierin lagen diese mit der Gewebeseite nach oben auf einem Cellulose-Tuch, das in Verdaupuffer mit einer PK-Konzentration von 250 µg/ml getränkt war. Pro Box wurden hierfür ca. 15 ml benötigt. Nach wiederholtem Schwenken der Boxen erfolgte schließlich der Enzym-Verdau über Nacht bei 60 °C in der Wärmekammer. Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte nach drei fünfminütigen Waschgängen mit TBST für 15 Minuten in 4 M GdnSCN denaturiert. Diese und alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt. Nach weiteren dreimal fünf Minuten Waschen in TBST wurden die Membranen nun mit Klammern in den Boxen fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe für 45 Minuten in 0,2% igem Casein mit 20 ml pro Box geblockt (nicht bei Verwendung von

ICSM-18). Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach fünf zehnminütigen Waschgängen mit TBST konnte der APgekoppelte Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgegeben werden. Für die Inkubation mit dem ersten und zweiten Antikörper wurde je ein Volumen von 10 ml pro Box verwendet. Es folgten wiederum fünfmal zehn Minuten Waschen in TBST sowie zwei fünfminütige Spülgänge in NTM mit 20 ml pro Box. Letzteres hatte einen pH-Wert von 9,5. Nur bei diesem konnte die nachfolgende Farbreaktion ablaufen. Im nächsten Schritt wurden die Boxen vom Schüttler genommen und die Klammern entfernt. Das Aufgeben der Färbelösung mit 20 ml pro Box erfolgte bis zum Erreichen eines im Vergleich zur Positivkontrolle adäquaten Signals, abhängig vom Primärantikörper meistens für etwa 15 Minuten. Anschließend wurde die Formazanreaktion für 15 Minuten auf dem Schüttler in PBS gestoppt. Hier folgten noch drei Spülgänge in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, wobei im letzten Schritt zur Farbfixierung eine "Prise" 0,5 M EDTA hinzugegeben wurde. Das Trocknen der Membranen erfolgte wiederum zunächst grob mit Papiertüchern. Dann wurden die Schnitte über Nacht zwischen zwei Schichten Whatman-Cellulose unter einem beschwerenden Gewicht lichtgeschützt getrocknet. Die Mikroskopie der getrockneten Membranen erfolgte mit dem Auflichtmikroskop.

#### 2.2.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Nachweisverfahren führen grundsätzlich zu einer spezifischen Detektion bestimmter Proteine bzw. deren Aggregate über eine Antigen-Antikörper-Reaktion.

Erster Schritt war auch hier das Entparaffinieren der Gewebeschnitte wie folgt: Dreimal Xylol für je fünf Minuten, Isoxylol für eine Minute, zweimal 100 %vol Isopropanol für je zwei Minuten, 90 %vol, 70 %vol und 50 %vol Isopropanol für je zwei Minuten sowie anschließendes Spülen mit H2Odd. Initial erfolgte wahlweise ein dreißigminütiger PK-Verdau-Schritt mit einer Enzym-Konzentration von 20 µg/ml im entsprechenden Verdaupuffer in der Wärmekammer bei 37 °C und anschließendes Spülen in TBS. Zur Demaskierung des zu untersuchenden Antigens diente wahlweise folgend das sog. heatinduced epitope retrieval durch Kochen der Schnitte in der Mikrowelle, entweder mit 4 mM HCl für fünfmal drei Minuten (einmal maximale Stufe, viermal 700 Watt) oder mit 10 mM Citrat pH 6 (fünfmal drei Minuten bei 700 Watt). Dieser und alle weiteren Schritte wurden - sofern nicht anders angegeben - in Hellendahl-Küvetten durchgeführt. Es folgte ein schrittweises Abkühlen mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> sowie zweimaliges Spülen mit TBS. Nach wahlweise fünfzehnminütigem Denaturieren in 4 M GdnSCN wurde wiederum dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und dreimal mit TBS gewaschen. Nach weiteren 15 Minuten in 0,2%igem Casein zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen (nicht bei Verwendung von ICSM-18) wurden die Schnitte abermals dreimal in TBS gespült, wobei beim letzten Schritt TBST aufgeben wurde. Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig von den Objektträgern abgetupft und je Schnitt 200 µl des in TBS(T) verdünnten Primärantikörpers aufgetragen. Inkubiert wurde

über Nacht oder für 90 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Spülen in TBS – wobei im letzten Schritt wieder TBST verwendet wurde – die Inkubation dem in TBS(T)verdünnten erfolgte mit AP-gekoppelten Sekundärantikörper in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 100 µl pro Objektträger. Nach dreimaligem Waschen mit TBS konnte nun schließlich die Farbreaktion erfolgen. Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgte bis zum Erreichen eines adäquaten Signals, i. d. R. etwa 15 Minuten. Anschließend wurde die Reaktion in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gestoppt. Bei jedem Versuchsdurchgang diente eine Positivkontrolle als interner Standard. Das Ansetzen der Färbelösung geschah wie folgt (s. 2.1.4): In TBS pH 8,8 wurde auf dem Rührer unter pH-Meter-Kontrolle das Levamisol einpipettiert (Lösung III). Nach Hinzugabe von Lösung II wurde mit 1 M NaOH der pH-Wert auf 8,9 eingestellt. Schließlich wurde Lösung I mit dem Chromogen Neufuchsin hinzupipettiert. Nach zweimaligem Filtrieren war die Lösung gebrauchsfertig. Nach dem eigentlichen Färbevorgang schloss sich noch eine Kernfärbung mit Hämalaun für 15 Sekunden an. Es folgten: Spülen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, Differenzieren in HCl-Alkohol für wenige Sekunden (nicht bei Verwendung von ICSM-18) und zehn Minuten Bläuen unter laufendem Leitungswasser. Nach dem Eindeckeln mithilfe des hydrophilen Klebstoffs Aquatex trockneten die Schnitte über Nacht unter dem Abzug.

Die oben beschriebenen Vorgänge gelten für eine immunhistochemische Färbung mit dem Chromogen Neufuchsin. Wurde an dessen Stelle AEC verwendet, so ergaben sich einige Abweichungen, die hier zusammenfassend dargestellt werden sollen:

Zwischen der Denaturierung durch GdnSCN und dem Casein-Block fand ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block (Verdünnung 3%ig in TBS) für 20 Minuten sowie dreimaliges Spülen in TBST statt. Der Inkubation mit dem in Glycerin und TBS(T) verdünnten, biotinylierten Sekundärantikörper folgte der Streptavidin-Peroxidase-Block (Verdünnung 1:1000 in TBS) für 60 Minuten mit 100 μl pro Schnitt. Das Ansetzen der Färbelösung geschah nach folgendem Protokoll (s. 2.1.4): 30 ml Lösung A und 70 ml Lösung B wurden zusammengegeben und mithilfe 100%iger Essigsäure der pH-Wert unter pH-Meter-Kontrolle auf 5,2 eingestellt. Es folgte die Zugabe von 4 ml AEC-Stammlösung zu 56 ml des AB-Gemischs. Nach zweimaligem Filtrieren und Hinzufügen von 20 μl 30%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung war die Färbelösung gebrauchsfertig. Das Differenzieren in HCl-Alkohol entfiel, da AEC alkohollöslich ist.

Wie aus diesen Beschreibungen hervorgeht, ist in Bezug auf die IHC zunächst eine Vielzahl an unterschiedlichen Vorbehandlungsoptionen versucht worden, bevor sich methodisch insbesondere die Kombination aus initialem PK-Verdau sowie folgendem Epitop-retrieval durch Kochen in HCl und Denaturieren mit GdnSCN als am günstigsten erwies, da sich hierunter das distinkteste Muster ergab. Darüber hinaus ist diese Vorbehandlung derjenigen im PET-Blot relativ ähnlich, sodass sie sich gut eignet, um eine möglichst genaue Vergleichbarkeit zwischen den beiden Methoden herzustellen. Als immunhistochemisches Chromogen hat sich ferner schließlich Neufuchsin bewährt. Diese methodischen Experimente waren der Tatsache geschuldet, dass hier mit peripherem (Nerven-)gewebe

gearbeitet wurde; nicht nur das im Vergleich zum ZNS andersartig zusammengesetzte Myelin, sondern auch der höhere Anteil an u. a. Bindegewebe bedingten einen oft hohen Gesamthintergrund in den immunhistochemischen Färbungen, den es zunächst zu optimieren galt, um ein spezifisches Signal erzielen zu können.

#### 2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden hier zunächst mithilfe einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt und nachfolgend durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgel stehenden elektrischen Feldes von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Western Blot). Das Muster der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine blieb hierbei erhalten. Mithilfe einer spezifischen Antikörper-Reaktion wurden schließlich die zu analysierenden Proteine detektiert.

Die für die SDS-PAGE benötigten Polyacrylamidgele wurden eigenständig hergestellt und bestanden aus einem 15%igen Trenngel sowie einem 5%igen Sammelgel. Das Trenngel wurde als erstes angesetzt und zur Polymerisation in eine entsprechende Haltevorrichtung gegossen; das noch flüssige Gel wurde mit Ethanol überschichtet. Nach ca. einer Stunde war das Trenngel auspolymerisiert, und das Ethanol wurde verworfen. Nun konnte das Sammelgel gemischt und über das Trenngel aufgegeben werden. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm zur Erzeugung von Probentaschen eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten war auch das Sammelgel auspolymersiert. Die fertigen Gele konnten entweder direkt verwendet oder im Kühlschrank mit feuchten Papierhandtüchern bedeckt und in eine Tüte eingeschweißt aufbewahrt werden.

Das Probenmaterial zur Durchführung der SDS-PAGE sowie des sich anschließenden Western Blots war ein ausgehend von Nativgewebe hergestelltes 10%iges Homogenat in PBS mit 0,5 % DOC-Detergens. Dieses konnte entweder direkt verwendet oder bei -80 °C eingefroren werden. Auch bei dieser Methode erfolgte nun zunächst ein Vorverdau des Gewebes mittels PK für 35 Minuten in der Wärmekammer bei 37 °C: Homogenat und PK-Ansatz wurden hierfür im Verhältnis 1:1 gemischt (15 μl + 15 μl), sodass sich eine Endkonzentration des Enzyms von 50 μg/ml einstellte. Von diesem Gemisch wiederum wurden 20 μl mit 60 μl 4x Probenpuffer in einem Cup zusammengegeben und 15 Minuten im Wasserbad bei 100 °C erhitzt. Anschließend lagerten die Proben kurz auf Eis, bis sie etwa Raumtemperatur erreicht hatten. Die Hitzeeinwirkung bewirkte eine Denaturierung der Proteine, was wiederum zusammen mit der im Folgenden durch SDS gewährleisteten konstant negativen Ladung der Proteine zu deren Linearisierung führte. Auf diese Weise war eine Auftrennung nach Kettenlänge möglich, welche sich proportional zur Molekülmasse verhält; denn längere Proteine wurden in dem Gel stärker zurückgehalten als kürzere.

Nach Einbau der sich in der Halteapparatur befindlichen Gele in die Laufkammer konnte diese mit Laufpuffer aufgefüllt werden. Es folgte das Laden der Gele in dem Sinne, dass in jede Spur 10-12 µl Probengemisch eingegeben wurden; auf jedem Gel liefen i. d. R. ein

PrPsc Typ 1 und 2 (Hirnhomogenate) als Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle mit. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Proben herunterzentrifugiert und gevortext. Außerdem liefen auf jedem Gel in einer Spur 5 µl eines Markers für die Molekülmasse mit. Je Gel betrug die Stromstärke zum Durchlaufen des Sammelgels 30 mA, für das nachfolgende Trenngel 40 mA. Sobald die Lauffront herausgelaufen war, wurde noch zehn Minuten gewartet, um die Banden zu spreizen, und dann die Gele zügig in eine Glaswanne mit Transferpuffer befördert; hierbei handelte es sich im Folgenden nur noch um das Trenngel, das Sammelgel wurde zuvor abgestreift und verworfen.

Nach dem "Sandwich"-Prinzip wurde nun von unten nach oben folgender Stapel aufgebaut und in den semi-dry-Blotter eingelegt: erste Schicht Whatman-Cellulose, eine Nitrocellulose-Membran, das Gel, zweite Schicht Whatman-Cellulose. Die Whatman-Cellulose und die Membran mussten zuvor eine Weile in Transferpuffer einweichen und der Stapel mithilfe einer kleinen Rolle bearbeitet werden, um Luftblasen zu beseitigen bzw. eine gute Kontaktfläche herzustellen. Je Gel wurde bei 100 mA für 45 Minuten geblottet. Die Membranen wurden anschließend etwa eine Minute in TBS gespült und dann in 4 M GdnSCN für 30 Minuten denaturiert. Nach wiederum dreimaligem Spülen in TBS für je zehn Minuten folgte dann das dreißigminütige Blocken in 30 ml 0,2%igem Casein bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Primärantikörper 3F4 (verdünnt in TBS mit 0,02 % Casein) erfolgte bei einem Volumen von 10-15 ml pro Membran über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde nach erneut dreimaligem Spülen in TBS für je zehn Minuten ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (verdünnt in 15 ml TBS mit 0,02 % Casein) für 60 Minuten auf dem Schüttler aufgegeben. Schließlich wurde noch viermal zehn Minuten in TBS gespült.

Das Entwickeln in Form einer Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte in der Dunkelkammer nach folgendem Prinzip: Bei einer Peroxidase-katalysierten Oxidation von Luminol durch  $H_2O_2$  kam es zur Freisetzung von blauem Licht entsprechend einem Maximum des Emmissionsspektrums bei einer Wellenlänge von ca. 430 nm. Dessen Intensität erreichte ihren Gipfel zwischen fünf und 20 Minuten nach Reaktionsstart. Dabei verstärkte ein *enhancer* die Chemilumineszenz ca. um den Faktor 1000 und verlängerte gleichzeitig die Dauer der Chemilumineszenz. Ein Puffer und die Luminol/*enhancer*-Lösung wurden zu diesem Zweck im Verhältnis 1:1 (jeweils 0,75 ml) gemischt und dann auf den Blot aufgetragen. Nach fünf Minuten konnte die Membran auf eine Entwicklungsfolie gelegt und diese geschlossen werden. Ein passender Film wurde auf die Membran aufgebracht, die Entwicklungskassette geschlossen und schließlich belichtet, je nach Stärke des Signals für 20, 10 oder fünf Minuten. Nach dem Öffnen der Kassette wurde der Film für einige Minuten in ein Entwicklungsbad getaucht, dann kurz im Wasserbad gewaschen und schließlich einige Minuten in das Fixierbad gehalten. Der fertige Film wurde mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### 2.3 Wissenschaftliche Software

Für die statistische Analyse und graphische Aufarbeitung der vorhandenen Datensätze wurden die folgenden Programme verwendet: *Microsoft Excel 2016*, Statistika 13 und *python 3.6* mit den *libraries matplotlib 2.0* und *pandas 0.20*. Zur digitalen Nachbearbeitung der Kamerabilder wurde das Programm *cellSens* genutzt.

#### 2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten kam unter Statistika 13 der *Pearson Chi-square*-Unabhängigkeitstest zur Anwendung. Die Nullhypothese H<sub>0</sub> besagte hierbei, dass zwei Variablen in ihren Ausprägungsgraden stochastisch unabhängig voneinander sind. Die Hypothese H<sub>1</sub> bestand darin, dass die beiden Variablen assoziiert sind; die Nullhypothese konnte in diesem Fall statistisch signifikant abgelehnt werden kann. Als solche Variablen wählten wir einerseits die Eigenschaft einer Organprobe als entweder "positiv" oder "negativ" und andererseits den zugrundeliegenden Subtyp der Erkrankung. Alternativ zum Subtyp wurde auch eine Testung allein gegen den Codon-129-Polymorphismus bzw. den PrPsc-Typ vorgenommen. Ein Ergebnis wurde hierbei als statistisch signifikant angegeben, wenn galt p<0,05 (\*), als sehr signifikant, wenn p<0,01 (\*\*\*) und hoch signifikant, wenn p<0,001 (\*\*\*). Für den Fall, dass p>0,05 galt, wurde ein Ergebnis als statistisch nicht signifikant (n.s.) bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

Die Gesamtzahl der untersuchten Krankheitsfälle betrug 43, zusammengesetzt aus 41 CJD-und zwei FFI-Patienten. Erstere wiederum verteilten sich formal auf 39 sCJD- und 2 iCJD-Fälle. Diese beiden iatrogenen Patienten werden jedoch im Folgenden ihrem PrPsc-Typ sowie Codon-129-Polymorphismus entsprechend gemeinsam mit den sporadischen Fällen in einer Gesamtheit ausgewertet. Ursächlich für diese Betrachtungsweise ist die Tatsache, dass beide Erkrankungsfälle durch *Dura mater*-Transplantate übertragen worden sind: Sie stellen also nicht-systemische Fälle dar, da es unter diesem Inokulationsweg nur zu einer sehr geringen Ausschwemmung der Infektiosität nach extrazerebral kommt. Die Pathogenese ist also mit einer sporadischen Erkrankung vergleichbar. Die untersuchten CJD-Fälle verteilten sich folgendermaßen auf die sechs Subtypen der Erkrankung: 18x MM1 (hierunter auch die beiden iCJD-Fälle), einmal MM2, einmal MV1, 12x MV2 und neunmal VV2. Patienten mit dem Subtyp VV1 standen der Untersuchung nicht zur Verfügung.

Anhand der genannten Fälle erfolgte eine Analyse folgender Strukturen: der beiden sensiblen Ganglien Ggl. trigeminale (Ggl. Gasseri) und Ggl. nodosum sowie verschiedener Stationen des vegetativen Nervensystems. Bezüglich letzterer berücksichtigten wir einerseits unterschiedliche anatomische Höhen des sympathischen Grenzstrangs (zervikal, das Ggl. stellatum und thorakal) sowie außerdem Ganglien aus den autonomen, enterischen Nervengeflechten Pl. coeliacus (Ggl. coeliacum) und Pl. pelvinus. Beide enthalten sympathische sowie parasympathische Faseranteile, die in ihnen enthaltenen Ganglien entsprechen jedoch solchen des Sympathikus. Darüber hinaus wurden exemplarisch weitere Strukturen des PNS untersucht: N. trigeminus, N. vagus, weitere peripherere Nerven (Pl. brachialis und N. ischiadicus) sowie die Retina inklusive N. opticus.

Vor den eigentlichen immunologischen Verfahren erfolgte eine Untersuchung der Gewebeschnitte mittels einer HE-Standardfärbung, um sicherzustellen, dass in den im Rahmen der Autopsie entnommenen Proben auch Gangliengewebe vorhanden war. Tatsächlich ist dies nicht immer der Fall, insbesondere beim *Ggl. nodosum*, *Ggl. coeliacum* oder den Ganglien des *Pl. pelvinus*. Nicht selten fanden sich in den hierunter vermuteten Gewebeproben lediglich lymphatisches Gewebe oder Fettgewebe. Solche Präparate wurden zur Auswertung nicht herangezogen. Eine weitere Funktion des HE-Schnitts liegt, aufgrund seines relativ hohen morphologischen Detailreichtums, in der Beurteilung von Organcharakteristika, welche für die Klassifikation von Präparaten und Orientierung innerhalb derselben in vielen Fällen hilfreich waren. Als maßgebend für die Beurteilung eines Schnitts als positiv bzw. negativ galt das Anfärbeverhalten unter dem anti-PrP-Standardantikörper 12F10 im PET-Blot. Exemplarisch kamen auch die alternativen Antiköper 3F4 und ICSM-18 zum Einsatz. Ebenso galt aufgrund seiner höheren Sensitivität der PET-Blot als Referenz-Methode, die IHC und der *Western Blot* wurden

vielmehr zur zusätzlichen Bestätigung eingesetzt. Innerhalb aller positiven Fälle erfolgte anhand der PET-Blot-Resultate eine weitere semiquantitative Auswertung im Sinne einer Einteilung in schwach, mäßig oder kräftig positiv.

Insbesondere für jede Färbung im PET-Blot wurde eine entsprechende Positivkontrolle mitgeführt. Hierzu diente eine ZNS-Probe eines Prionfalls, i. d. R. Kleinhirn (Abbildung 1). Darüber hinaus wurde regelmäßig die Retina inklusive *N. opticus* mitgefärbt. Diese zeigt sich als ZNS-Bestandteil im weiteren Sinne bei Prionpatienten regelmäßig immunopositiv und kann daher als eine interne Positivkontrolle angesehen werden (Abbildung 2).

Als Negativkontrollen dienten zu jedem Organ korrespondierende Schnitte von insgesamt vier Patienten mit einer anderen ZNS-Erkrankung: genetischer Alzheimer-Demenz (AD), frontotemporaler Lobärdegeneration, Demenz mit Lewy-Körperchen und zusätzlicher AD-Komponente bzw. Norovirus-Enzephalitis. Diese waren zu jedem Zeitpunkt immunonegativ für Prion-spezifische Antiköper und werden in den entsprechenden Organkapiteln gezeigt.

Die erforderliche ethische Zustimmung für die Untersuchung aller genannten Patientenfälle wurde durch die Universitätsmedizin Göttingen erteilt.

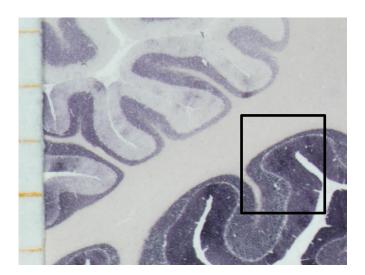


Abbildung 1: Positivkontrolle Kleinhirn

Die Abbildung zeigt beispielhaft eine typische Positivkontrolle des Kleinhirns unter dem Antiköper anti-PrP 12F10 im PET-Blot: Von innen nach außen entlang der anatomischen Schichtung betrachtet zeigt sich das Mark frei, das *Stratum granulosum* belegt, das *Stratum purkinjense* frei und das *Stratum moleculare* belegt (markiert). In den belegten Schichten zeigt sich ein feines, synaptisches Ablagerungsmuster, charakteristisch für einen PrPsc-Typ 1. Typisch ist der Farbton des tief dunklen Violetts. 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

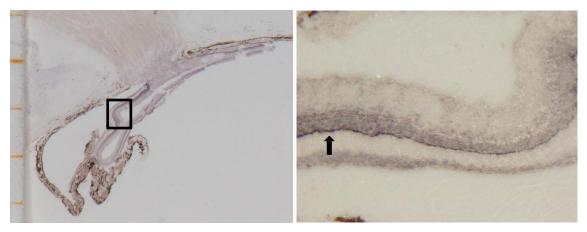


Abbildung 2: Positivkontrolle Retina

Die Abbildung zeigt beispielhaft eine typische positive Reaktion der Retina unter dem Antikörper anti-PrP 12F10 im PET-Blot: Der im linken Bildabschnitt (20-fache Vergrößerung) markierte Bereich ist rechts in einer Detailansicht dargestellt. Zu erkennen ist eine Belegung der beiden synaptischen Schichten Stratum plexiforme externum und internum. Die scharf gezogene schwarze Linie (schwarzer Pfeil) entspricht den in Reihe angeordneten Synapsen zwischen innerer und äußerer Körnerzellschicht. Hierbei handelt es sich um die größten Synapsen im menschlichen Körper. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

### 3.1 Das Ganglion trigeminale

Das typische histologische Erscheinungsbild des Trigeminusganglions ist in Abbildung 3 dargestellt.

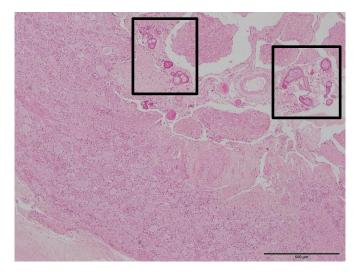


Abbildung 3: Organcharakteristika des Ganglion trigeminale

Die Abbildung zeigt eine HE-Übersichtsfärbung eines Trigeminusganglions. Charakteristisch ist das ubiquitäre Auftreten von Mineralisationen der *Arachnoidea mater*, auch als Psammomkörper bezeichnet, welche hier deutlich hervortreten (markiert). Diese Strukturen sind durch ihre Größe und typische Schichtung i. d. R. gut von den Ganglienzellen zu unterschieden. Da sie jedoch unter fast allen Farbstoffen eine unspezifische Positivreaktion zeigen, ist teilweise eine Verwechslung mit einem typischen, tatsächlich positiven neuronalen Membransaum möglich.

### 3.1.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Das Trigeminusganglion wurde bei 36 der 41 CJD-Patienten untersucht. Bei 22 dieser Patienten ist das *Ggl. trigeminale* als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen, dies entspricht 61 %. Darüber hinaus erfolgte eine weitere semiquantitative Beurteilung dieser positiven histologischen Schnitte: Zehn wiesen eine kräftige, fünf eine mäßige und sieben eine schwache Farbreaktion auf. Die entsprechende Relativverteilung kann analog abgelesen werden (Abbildung 4).

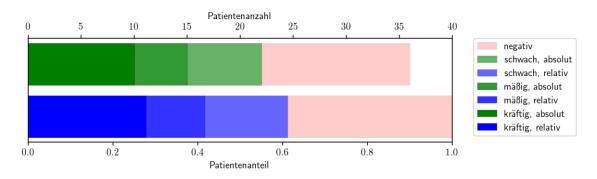


Abbildung 4: Verteilung der Färbeergebnisse des Ganglion trigeminale auf positive und negative Fälle

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Mitbeteiligung des Ggl. trigeminale im Rahmen der Grunderkrankung bzw. seine Immunopositivität mit dem Vorliegen bestimmter Subtypen der Erkrankung assoziiert ist. Die 36 untersuchten Patienten verteilten sich dabei folgendermaßen: 18-mal MM1 (50 %), einmal MV1 (3 %), neunmal MV2 (25 %) und achtmal VV2 (22 %). Abbildung 5 zeigt nun, wie sich diese Subtypen-Verteilung nach der Differenzierung aller Proben in entweder "positiv" oder "negativ" darstellt. Die in dem Histogramm angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Grundgesamtheit der untersuchten Trigeminalganglien (n=36). Es wird deutlich, dass 100 % der MV2- und VV2-Patienten ein positives Trigeminusganglion aufwiesen. Der MV1-Patient blieb negativ. Von den MM1-Fällen war die Mehrheit (72 %) negativ (n=13); nur 5 Patienten waren positiv, das entspricht 28 %. Die Mehrheit dieser Patienten (vier von fünf) wies ein lediglich schwach positives Färbeergebnis auf, wohingegen die überwiegende Zahl (zehn von 17) der positiven Typ 2-Patienten ein kräftig positives Resultat zeigte (nicht dargestellt). Anhand des Verteilungsmusters in Abbildung 5 ist zu sagen, dass in Bezug auf das Ggl. trigeminale die Tatsache, ob dieses im Krankheitsprozess involviert, d. h. positiv ist, und der jeweils zugrundeliegende Subtyp statistisch hoch signifikant miteinander assoziiert sind, wobei gilt \*\*\*=p<0,001.

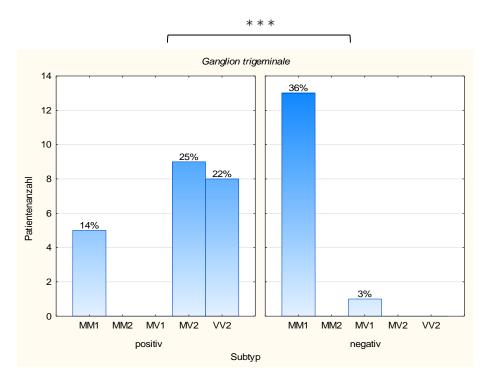


Abbildung 5: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des Ganglion trigeminale

An die Subtypenanalyse schlossen sich weiterführende Rechnungen an, in denen das Organresultat nach demselben Prinzip selektiv lediglich gegen den Codon-129-Polymorphismus bzw. den PrPsc-Typ getestet wurde. Für das *Ggl. trigeminale* ergab sich sowohl bezüglich des Polymorphismus als auch des Erregertyps ein statistisch ebenfalls hoch signifikantes Ergebnis, wobei galt \*\*\*=p<0,001 (nicht dargestellt).

### 3.1.2 Vergleichende Darstellung in *paraffin-embedded tissue blot* und Immunhistochemie

Abbildung 6 zeigt exemplarisch den sehr typischen Befund eines positiven Trigeminusganglions, wie es sich zunächst im PET-Blot präsentierte. In Bezug auf dieses Organ gelang eine Bestätigung des PET-Blot-Befundes auch in der IHC. Repräsentativ für diesen Befund zeigt Abbildung 7 denselben Fall in immunhistochemischer Darstellung, wobei sich entsprechend ein ähnlich intensives Färbeergebnis erzielen lässt. Das *Ggl. trigeminale* von Kontrollfällen zeigte sich im PET-Blot stets negativ, beispielhaft zu sehen in Abbildung 8.

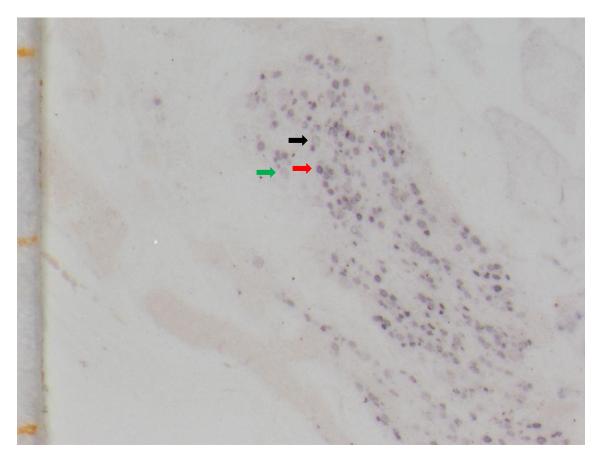
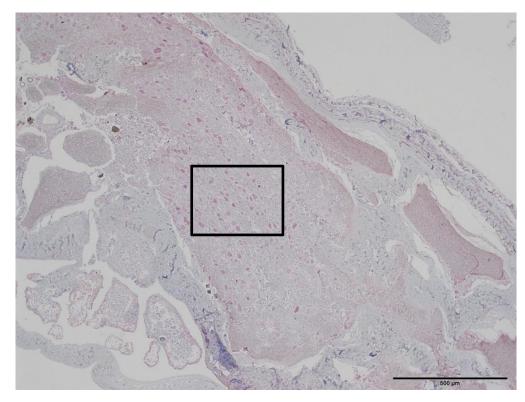


Abbildung 6: Positive Immunreaktion des *Ganglion trigeminale* eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10

Charakteristischerweise zeigen einige Ganglienzellen lediglich noch einen feinen Plasmamembran-Saum (schwarzer Pfeil), wohingegen bei anderen als Ausdruck einer fortgeschrittenen Protein-Pathologie bereits nahezu das gesamte Zytoplasma belegt erscheint (roter Pfeil). Wiederum andere Neurone in direkter Nähe scheinen nicht von der Pathologie betroffen zu sein (grüner Pfeil). 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.



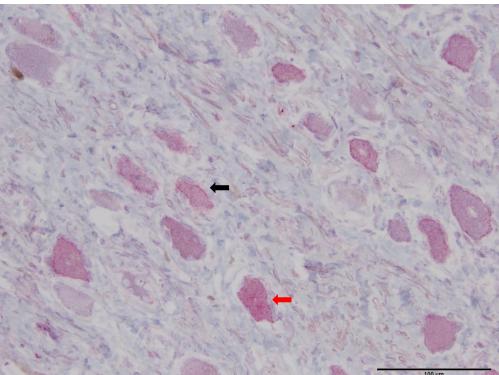


Abbildung 7: Positive Immunreaktion des *Ganglion trigeminale* eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10

In dieser Abbildung kommt dasselbe Organ wie in Abbildung 6 zur Darstellung. Zur besseren Vergleichbarkeit mit Letzterer dient die Übersichtsdarstellung (oben). Nach Vergrößerung des markierten Areals (unten) werden darüber hinaus die gleichen zellulären Details sichtbar: der Membransaum (schwarzer Pfeil) sowie die zytoplasmatische Pathologie, die sich hier im Vergleich zum PET-Blot weniger flächig, sondern eher im Form eines granulären Musters zeigt (roter Pfeil). Typisch ist der hellrote bis pinke Farbton.

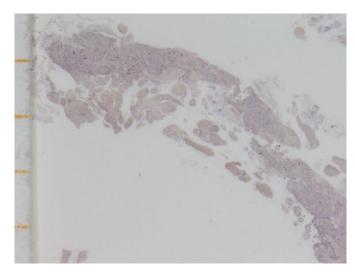


Abbildung 8: Negative Immunreaktion des *Ganglion trigeminale* eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10

In dieser Abbildung wird deutlich, dass unter denselben Bedingungen, diesmal an einem der Kontrollfälle, eine positive Immunreaktion der Ganglienzellen ausbleibt. Das tiefschwarze Muster entspricht Formalin-Präzipitaten. 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

### 3.2 Das Ganglion nodosum

Das typische histologische Erscheinungsbild des Ggl. nodosum ist in Abbildung 9 dargestellt.

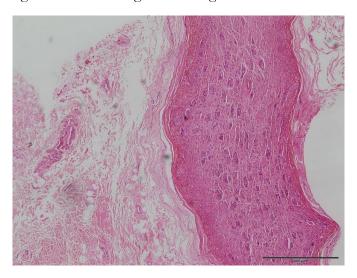


Abbildung 9: Organcharakteristika des Ganglion nodosum

Die Abbildung zeigt eine HE-Übersichtsfärbung eines *Ggl. nodosum*. Typisch ist der langstreckige Verlauf mit nur wenig Gefäßen und Bindegewebe.

### 3.2.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Das *Ggl. nodosum* wurde bei 16 der 41 CJD-Patienten untersucht. Bei fünf dieser Patienten ist das *Ggl. nodosum* als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen, dies entspricht 31 %. Eine weitere semiquantitative Beurteilung dieser positiven Fälle ergab für zwei eine kräftige, für weitere zwei eine mäßige und für einen eine schwache Farbreaktion. Die entsprechende Relativverteilung kann analog abgelesen werden (Abbildung 10).

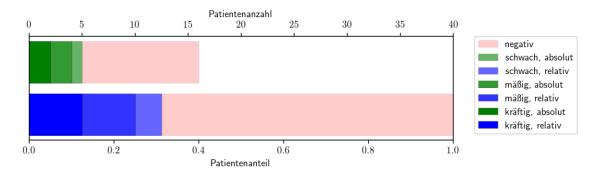


Abbildung 10: Verteilung der Färbeergebnisse des Ganglion nodosum auf positive und negative Fälle

Auch in Bezug auf das *Ggl. nodosum* wurde nun untersucht, ob seine Mitbeteiligung im Krankheitsprozess mit dem Vorliegen bestimmter Krankheitssubtypen assoziiert ist. Die 16 untersuchten Patienten verteilten sich dabei folgendermaßen: neunmal MM1 (56 %), zweimal MV2 (13 %) und fünfmal VV2 (31 %). Abbildung 11 zeigt nun, wie sich diese Subtypen-Verteilung nach der Differenzierung aller Proben in entweder "positiv" oder "negativ" darstellt. Die in dem Histogramm angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Grundgesamtheit der für das *Ggl. nodosum* untersuchten Proben (n=16). Es wird deutlich, dass die MM1-Patienten hier sämtlich negativ waren, sodass alle positiven Ganglien ausschließlich dem Subtyp MV2 bzw. VV2 zuzuordnen sind: Die MV2-Patienten waren erneut alle positiv. Die VV2-Fälle waren etwas häufiger positiv (60 %) als negativ (40 %), was in absoluten Zahlen 3 gegenüber 2 Patienten entspricht. Anhand dieses Verteilungsmusters ist zu sagen, dass in Bezug auf das *Ggl. nodosum* die Tatsache, ob dieses im Krankheitsprozess involviert, d. h. positiv ist, und der jeweils zugrundeliegende Subtyp statistisch signifikant miteinander assoziiert sind, wobei gilt \*=p<0,05.

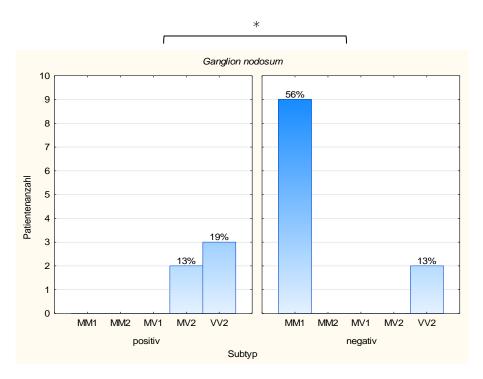


Abbildung 11: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des Ganglion nodosum

An die Subtypenanalyse schlossen sich auch hier weiterführende Rechnungen an, in denen das Organresultat nach demselben Prinzip selektiv lediglich gegen den Codon-129-Polymorphismus bzw. den PrPsc-Typ getestet wurde. Für das *Ggl. nodosum* ergab sich sowohl bezüglich des Polymorphismus als auch des Erregertyps ein statistisch sehr signifikantes Ergebnis, wobei galt \*\*=p<0,01 (nicht dargestellt).

### 3.2.2 Vergleichende Darstellung in *paraffin-embedded tissue blot* und Immunhistochemie

In Abbildung 12 ist der Befund eines sich im PET-Blot positiv darstellenden *Ggl. nodosum* präsentiert. Auch bei diesem Ganglion gelang eine Reproduktion des PET-Blot-Befundes in der IHC, jedoch mit deutlich geringerer Intensität bezüglich der Farbreaktion. Ein typisches Beispiel für diese Tatsache stellt die Abbildung 13 dar. Bei nicht-Prion-Fällen zeigte das *Ggl. nodosum* zu keinem Zeitpunkt eine Positivität im PET-Blot (Abbildung 14).

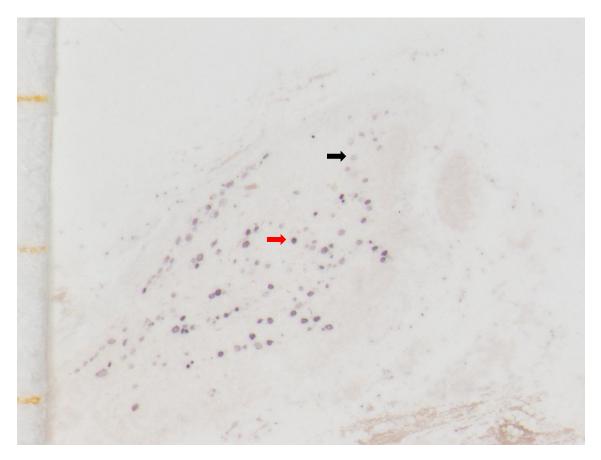


Abbildung 12: Positive Immunreaktion des *Ganglion nodosum* eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10

Auch in dieser Abbildung einer klaren Positivreaktion des *Ggl. nodosum* ist wie in Abbildung 6 das Nebeneinander von nur milder membranöser Pathologie einerseits (schwarzer Pfeil) und flächenhafter Zytoplasma-Anfärbung andererseits (roter Pfeil) zu erkennen. 32-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

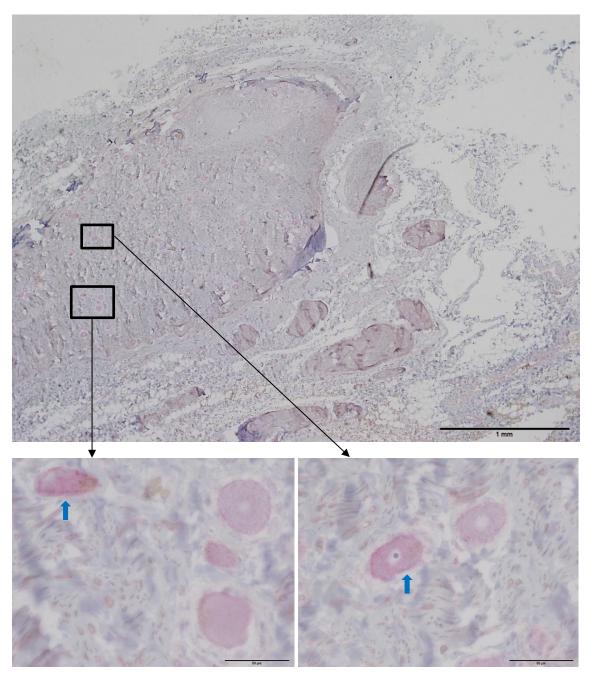


Abbildung 13: Positive Immunreaktion des *Ganglion nodosum* eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10

In dieser Abbildung kommt dasselbe Organ wie in Abbildung 12 zur Darstellung. Zur besseren Vergleichbarkeit mit Letzterer dient die Übersichtsdarstellung (oben), worin das die Ganglien umgebende Gewebe durch den Verdauprozess teilweise destruiert erscheint. Nach Vergrößerung zellulärer Details (markiert) wird in Form von feinen, hellroten Granula eine typische, Membran und Zytoplasma einschließende Positivreaktion deutlich (blaue Pfeile), die jedoch im Vergleich zu dem Ergebnis im PET-Blot insgesamt dezent ausfällt und nur einzelne Zellen betrifft.

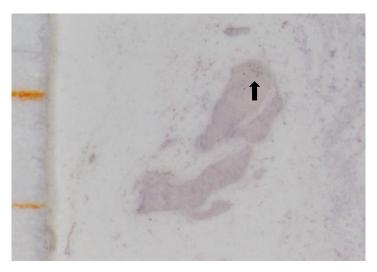


Abbildung 14: Negative Immunreaktion des *Ganglion nodosum* eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10

In dieser Abbildung wird deutlich, dass unter denselben Bedingungen, diesmal an einem der Kontrollfälle, eine positive Immunreaktion der Ganglienzellen ausbleibt. Etwas Neuromelaninbzw. Lipofuszin-Einlagerungen sind im Sinne eines neuronalen Pigments in den Ganglienzellen zu erkennen (schwarzer Pfeil). 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

### 3.3 Der zervikale Grenzstrang

Das typische histologische Erscheinungsbild von Ganglien des zerviaklen Grenzstrang ist beispielhaft anhand des *Ggl. cervicale sup.* in Abbildung 15 dargestellt.

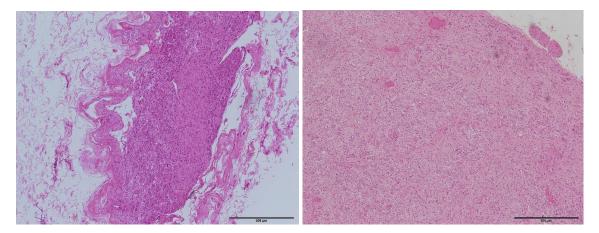


Abbildung 15: Organcharakteristika des Ganglion cervicale superius

Die Abbildung zeigt Ausschnitte einer HE-Übersichtsfärbung des *Ggl. cervicale sup*. Auch hierbei handelt es sich charakteristischerweise um ein längliches Gebilde, jedoch mit einem relativ hohen Anteil an Bindegewebe (links) und Gefäßen (rechts). Die beiden letzten Merkmale gelten auch als typische Eigenschaften des Sympathikus im Allgemeinen.

### 3.3.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Der zervikale Grenzstrang wurde bei 15 der 41 CJD-Patienten untersucht. Diese verteilten sich folgendermaßen auf die sechs Subtypen der Erkrankung: achtmal MM1 (53 %), dreimal MV2 (20 %) und viermal VV2 (27 %). Bei keinem dieser Patienten sind die Ganglien des zervikalen Grenzstrangs als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen (nicht dargestellt).

#### 3.4 Das Ganglion stellatum

Das typische histologische Erscheinungsbild des Ggl. stellatum ist in Abbildung 16 dargestellt.

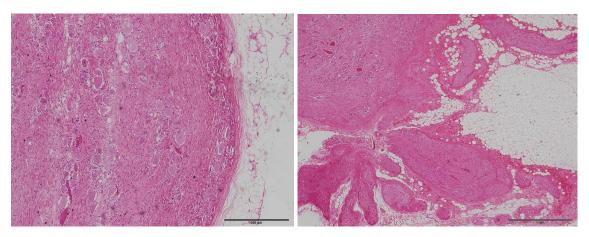


Abbildung 16: Organcharakteristika des Ganglion stellatum

Die Abbildung zeigt HE-Übersichtsfärbungen von Schnitten des *Ggl. stellatum*. Typisch ist das Vorhandensein einer bindegewebigen Kapsel (links) sowie Verzweigungen innerhalb des Organs (rechts).

## 3.4.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Das *Ggl. stellatum* wurde bei 20 der 41 CJD-Patienten untersucht. Diese verteilten sich folgendermaßen auf die sechs Subtypen der Erkrankung: elfmal MM1 (55 %), viermal MV2 (20 %) und fünfmal VV2 (25 %). Bei keinem dieser Patienten ist das *Ggl. stellatum* als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen (nicht dargestellt).

### 3.5 Der thorakale Grenzstrang

Das typische histologische Erscheinungsbild von Ganglien des thorakalen Grenzstrangs ist in Abbildung 17 dargestellt.

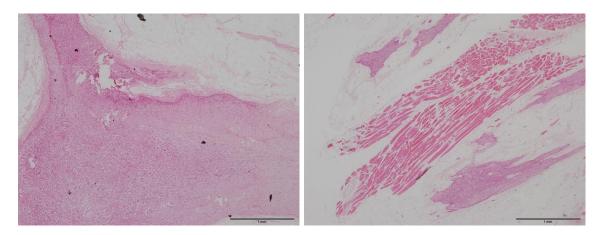


Abbildung 17: Organcharakteristika der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs

Die Abbildung zeigt HE-Übersichtsfärbungen von Schnitten thorakaler Grenzstrangganglien. Grundsätzlich ist eine Verwechslung mit dem *Ggl. stellatum* möglich. Jedoch liegen in den Verzweigungen der thorakalen Ganglien typischerweise Ganglienzellen (links). Eine noduläre Anordnung der Muskulatur (rechts) ist aufgrund seiner para- bzw. prävertebralen Lage ein weiteres Charakteristikum auch des Sympathikus im Allgemeinen.

## 3.5.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Der thorakale Grenzstrang wurde bei 11 der 41 CJD-Patienten untersucht. Bei drei dieser Patienten sind die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen, dies entspricht 27 %. In der folgenden semiquantitativen Auswertung zeigten sich zwei Ganglien als kräftig und eines als mäßig positiv. Die entsprechende Relativverteilung kann analog abgelesen werden (Abbildung 18).

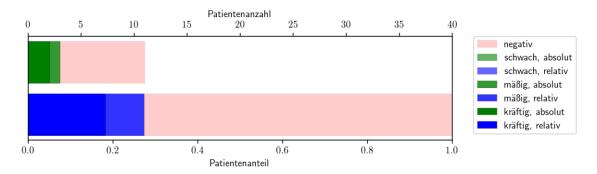


Abbildung 18: Verteilung der Färbeergebnisse der thorakalen Grenzstrangganglien auf positive und negative Fälle

Für die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs erfolgte ebenfalls eine Untersuchung zur Assoziation der Organbefunde mit den entsprechenden Subtypen. Die Verteilung der 11 untersuchten Patienten sah dabei folgendermaßen aus: fünfmal MM1 (45 %), dreimal MV2 (27 %) und dreimal VV2 (27 %). Abbildung 19 zeigt die Subtypen-Verteilung nach der Differenzierung aller Proben in entweder "positiv" oder "negativ". Die in dem Histogramm angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Grundgesamtheit der

untersuchten thorakalen Grenzstrangganglien (n=11). Wiederum erwiesen sich hier alle MM1-Patienten als negativ. Ebenso kamen daher erneut alle positiven Proben aus der MV2- bzw. VV2-Untergruppe: 67 % der MV2- (n=2) und 33 % der VV2-Patienten (n=1) waren positiv. Umgekehrt waren 33 % (n=1) der MV2- bzw. 67 % (n=2) der VV2-Fälle negativ. Die statistische Analyse dieses Verteilungsmusters konnte in Bezug auf die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs keine signifikante Assoziation zwischen dem Organbefund sowie dem dahinterstehenden Subtypen erbringen, wobei galt n.s.=p>0,05.

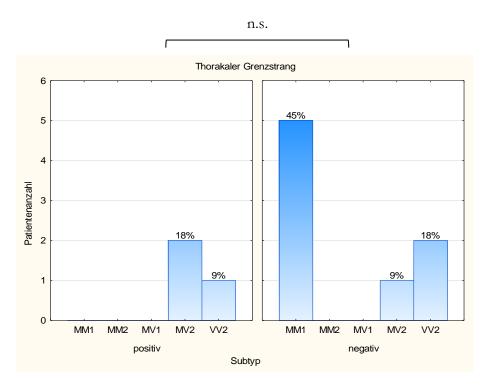


Abbildung 19: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs

An die Subtypenanalyse schlossen sich schließlich weiterführende Rechnungen an, in denen das Organresultat nach demselben Prinzip selektiv gegen den Codon-129-Polymorphismus bzw. den PrPsc-Typ getestet wurde. Für die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs ergab sich weder in Bezug auf den Polymorphismus noch auf den Erregertyp ein statistisch signifikantes Ergebnis, wobei galt n.s.=p>0,05 (nicht dargestellt).

### 3.5.2 Vergleichende Darstellung in *paraffin-embedded tissue blot* und Immunhistochemie

Beispielhaft für die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs wird hier das immunopositive PET-Blot-Ergebnis eines Ganglions auf Höhe Th3/4 gezeigt (Abbildung 20). Für die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs gelang eine Reproduktion der PET-Blot-Resultate mit annähernd derselben Intensität auch in der Immunhistochemie (Abbildung 21). Die

thorakalen Grenzstrangganglien von nicht-Prion-Patienten stellten sich im PET-Blot erwartungsgemäß stets negativ dar (Abbildung 22).

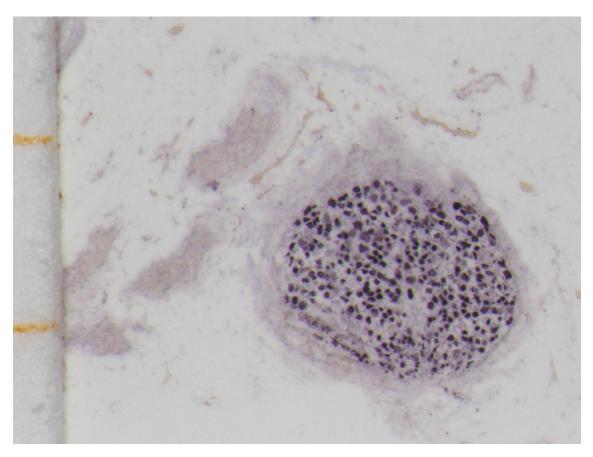


Abbildung 20: Positive Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions auf Höhe Th3/4 bei einem CJD-Fall im PET-Blot unter 12F10

Die Abbildung zeigt deutlich und überwiegend flächig immunopositive thorakale Ganglienzellen. 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

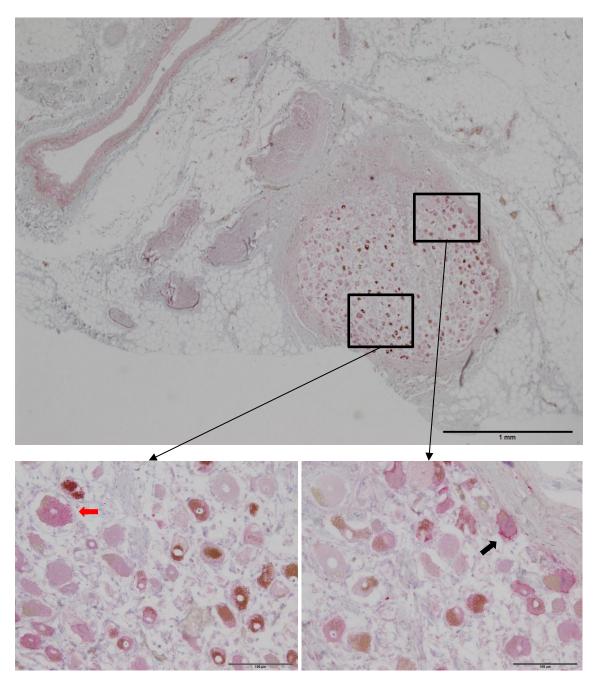


Abbildung 21: Positive Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions auf Höhe Th3/4 bei einem CJD-Fall in der Immunhistochemie unter 12F10

Zu sehen ist dasselbe Organ wie in Abbildung 20. Zur besseren Vergleichbarkeit mit letzterer dient die Übersichtsdarstellung (oben). In den hieraus entnommenen (markiert) unteren Detailaufnahmen wird ein nach seiner Intensität dem PET-Blot-Resultat annähernd vergleichbares Färbeergebnis deutlich. Gekennzeichnet sind die beiden bekannten Erscheinungsformen: der pinke Membransaum (schwarzer Pfeil) bzw. das zytoplasmatische, granuläre Muster (roter Pfeil). Gut zu erkennen ist das ubiquitäre Vorkommen von bräunlichen Neuromelanin-Granula in den Nervenzellen.

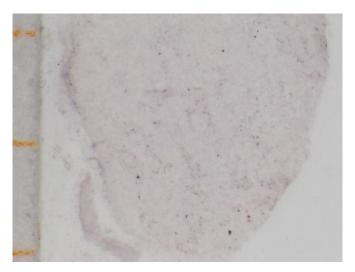


Abbildung 22: Negative Immunreaktion eines thorakalen Grenzstrangganglions bei einem Kontrollfall im PET-Blot unter 12F10

Die Abbildung zeigt, dass unter denselben Bedingungen, diesmal bei einem der Kontrollfälle, eine positive Immunreaktion der Ganglienzellen im PET-Blot ausbleibt. Die diskrete Braunfärbung der Ganglienzellen entspricht neuronalen Pigmenteinlagerungen. 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

#### 3.6 Das Ganglion coeliacum

Das typische histologische Erscheinungsbild des Ggl. voeliacum ist in Abbildung 23 dargestellt.

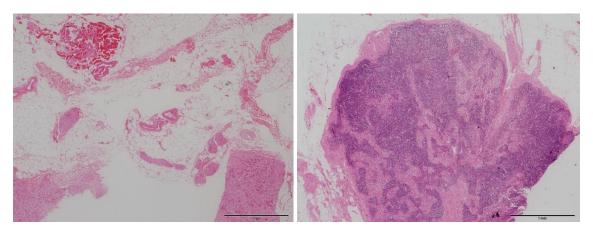


Abbildung 23: Organcharakteristika des Ganglion coeliacum

Die Abbildung zeigt HE-Übersichtsfärbungen von Schnitten des *Ggl. weliacum*. Typisch sind ein hoher Anteil an Fett- und durchziehendem Bindegewebe (links) sowie der regelmäßige Mitanschnitt von lymphatischen Strukturen (rechts).

### 3.6.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Das *Ggl. coeliacum* wurde bei 35 der 41 CJD-Patienten untersucht. Bei vier dieser Patienten ist das *Ggl. coeliacum* als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen, dies entspricht 11 %. Eine weitere semiquantitative Beurteilung dieser positiven Fälle erbrachte für zwei eine kräftige und für jeweils einen eine mäßige bzw. schwache Intensität in der Farbreaktion. Die entsprechende Relativverteilung kann analog abgelesen werden (Abbildung 24).

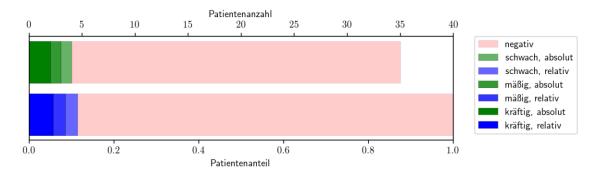


Abbildung 24: Verteilung der Färbeergebnisse des *Ganglion coeliacum* auf positive und negative Fälle

Auch für das *Ggl. coeliacum* folgte nun eine Analyse zur Assoziation von Organbefund und Krankheitssubtyp. Die Verteilung der 35 untersuchten Patienten sah dabei folgendermaßen aus: 15-mal MM1 (43 %), einmal MM2 (3 %), einmal MV1 (3 %), zehnmal MV2 (29 %) und achtmal VV2 (23 %). In Abbildung 25 ist die Subtypen-Verteilung nach der Differenzierung aller Proben in entweder "positiv" oder "negativ" darstellt. Die in dem Histogramm angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Grundgesamtheit der untersuchten Zöliakalganglien (n=35). Zu sehen ist, dass abermals alle MM1-Fälle negativ waren, ebenso der MM2- und der MV1-Patient. Die wenigen positiven Ganglien entstammen also erneut der MV2- bzw. VV2-Untergruppe: 30 % der MV2-Patienten waren positiv (n=3) sowie 12,5 % der VV2-Patienten (n=1). Negativ waren bei diesen beiden Subtypen jeweils sieben Patienten, entsprechend 70 % bei MV2 bzw. 87,5 % bei VV2. Die statistische Analyse dieses Verteilungsmusters konnte in Bezug auf das *Ggl. coeliacum* keine signifikante Assoziation zwischen dem Organbefund sowie dem dahinterstehenden Subtyp erbringen, wobei galt n.s.=p>0,05.

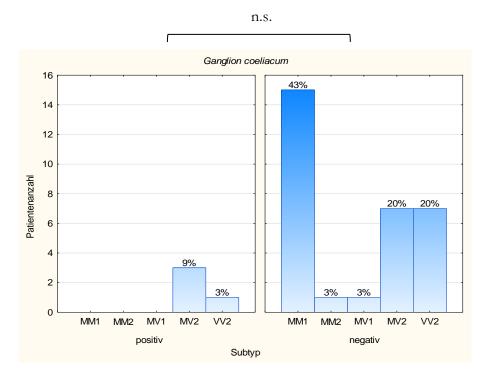


Abbildung 25: Subtypen-Verteilung in Bezug auf das positive und negative Kollektiv des Ganglion coeliacum

An die Subtypenanalyse schlossen sich wiederum weiterführende Rechnungen an, in denen das Organresultat nach demselben Prinzip selektiv lediglich gegen den Codon-129-Polymorphismus bzw. den PrPsc-Typ getestet wurde. Für das *Ggl. coeliacum* ergab sich in Bezug auf den Polymorphismus kein statistisch signifikantes Ergebnis, wobei galt n.s.=p>0,05 (nicht dargestellt). Im Hinblick auf den Erregertyp wurde das Signifikanzniveau mit p=0,051 hier knapp verfehlt, wobei galt n.s.=p>0,05 (nicht dargestellt).

## 3.6.2 Vergleichende Darstellung in *paraffin-embedded tissue blot* und Immunhistochemie

Exemplarisch wird hier ein immunopositives *Ggl. coeliacum* im PET-Blot gezeigt (Abbildung 26). Im Fall dieses Organs lag die Aggregatlast jedoch unterhalb der immunhistochemischen Detektionsschwelle, sodass eine Reproduktion des Ergebnisses mit dieser weniger sensitiven Methode nicht gelang (Abbildung 27). Der Vollständigkeit halber wurde auch hier schließlich das Anfärbeverhalten des *Ggl. coeliacum* an Kontrollfällen im PET-Blot untersucht und blieb unauffällig (Abbildung 28).

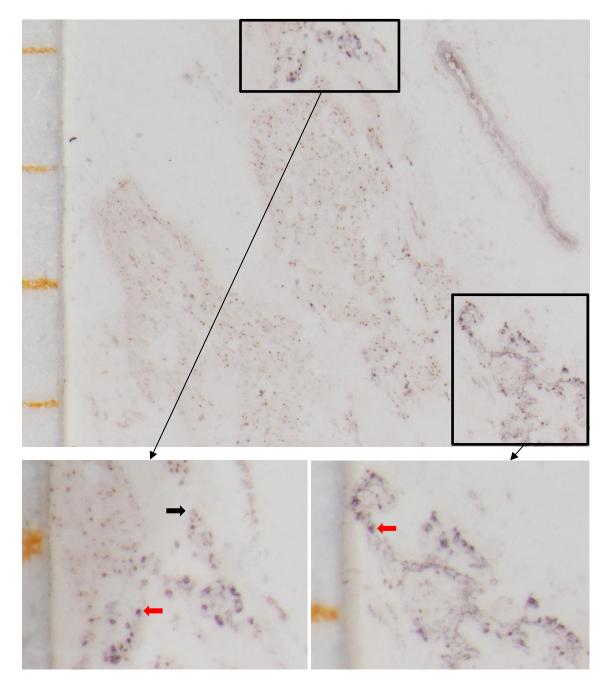


Abbildung 26: Positive Immunreaktion des *Ganglion coeliacum* eines CJD-Falls im PET-Blot unter 12F10

Die Abbildung zeigt in der Übersicht (oben, 25-fache Vergrößerung) zwei positive Nervenzellareale eines *Ggl. weliacum* (markiert), welche unten vergrößert (90fach) dargestellt sind. Erneut ist auf das gleichzeitige Vorhandensein markierter Zellmembranen (schwarzer Pfeil) und schattenhaft angefärbten Zytoplasmas (rote Pfeile) hinzuweisen. Das braune Ablagerungsmuster entspricht Neuromelanin-Einlagerungen in den Ganglienzellen. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

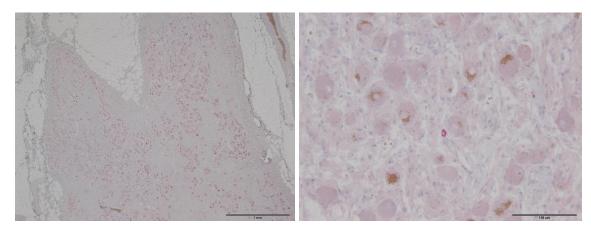


Abbildung 27: Negative Immunreaktion des *Ganglion coeliacum* eines CJD-Falls in der Immunhistochemie unter 12F10

In dieser Abbildung kommt dasselbe Organ wie in Abbildung 26 zur Darstellung. Zur besseren Vergleichbarkeit mit letzterer dient die Übersichtsdarstellung (links). In der hieraus entnommenen Detailaufnahme (rechts) wird die im Vergleich zum PET-Blot ausbleibende Immunreaktion deutlich. Die extrazellulär gelegenen flächenhaft pinken Niederschläge sind unspezifisch. Gut zu erkennen ist das ubiquitäre Vorkommen von bräunlichen Lipofuszin-Granula in den Neuronen.

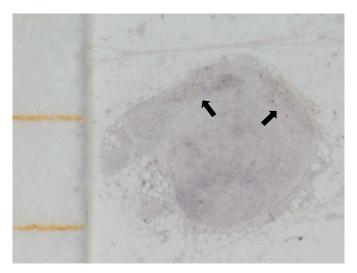


Abbildung 28: Negative Immunreaktion des *Ganglion coeliacum* eines Kontrollfalls im PET-Blot unter 12F10

Es wird deutlich, dass unter denselben Bedingungen, diesmal an einem der Kontrollfälle, eine positive Immunreaktion der Ganglienzellen im PET-Blot ausbleibt. Etwas Neuromelanin-Einlagerungen der Ganglienzellen sind zu erkennen (schwarze Pfeile). 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

#### 3.7 Der *Plexus pelvinus*

# 3.7.1 Quantitative Beurteilung der pathogenetischen Beteiligung unter Berücksichtigung der Patientendaten

Der *Pl. pelvinus* wurde bei neun der 41 CJD-Patienten untersucht. Bei einem dieser Patienten sind die hierin enthaltenen Ganglien als positiv im Sinne einer pathogenetischen Mitbeteiligung zu beurteilen, dies entspricht 11 %. Die entsprechende Farbreaktion fiel hierbei mäßig positiv aus (Abbildung 29).

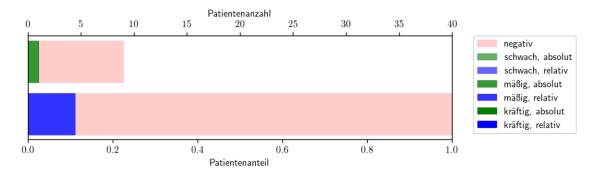


Abbildung 29: Verteilung der Färbeergebnisse der Ganglien des *Plexus pelvinus* auf positive und negative Fälle

Die neun untersuchten Patienten verteilten sich folgendermaßen auf die sechs Subtypen der Erkrankung: viermal MM1 (44 %), zweimal MV2 (22 %) und dreimal VV2 (33 %). Der positive Fall wies einen VV2-Hintergrund auf.

### 3.7.2 Vergleichende Darstellung in *paraffin-embedded tissue blot* und Immunhistochemie

Der PET-Blot-Befund zu dem in 3.7.1 beschriebenen Fall ist in Abbildung 30 dargestellt. Eine Reproduktion dieses Färbeergebnisses in der IHC blieb aus (Abbildung 31). Die Ganglien des *Pl. pelvinus* von Kontrollpatienten zeigten sich im PET-Blot stets negativ (Abbildung 32).

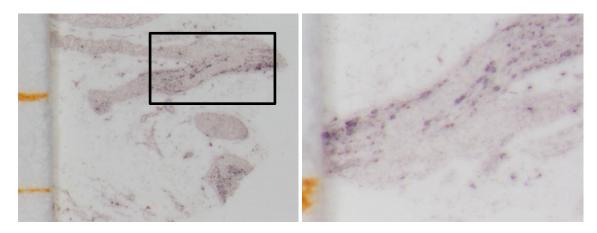


Abbildung 30: Positive Immunreaktion eines Ganglions des *Plexus pelvinus* bei einem CJD-Fall im PET-Blot unter 12F10

Die Abbildung zeigt ein Ganglion des *Pl. pelvinus* in der Übersicht (links, 40-fache Vergrößerung) bzw. einer hieraus (markiert) vergrößerten Ansicht (rechts, 90-fache Vergrößerung). Zu erkennen ist die immunopositive Reaktion der Ganglienzellen, teils membranbetont, teils flächig zytoplasmatisch. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

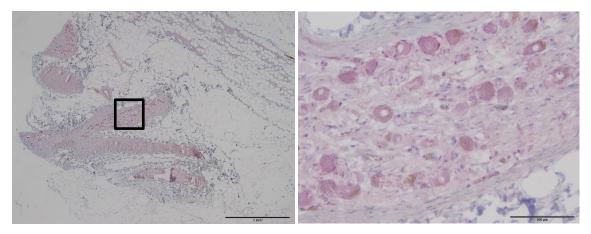


Abbildung 31: Negative Immunreaktion eines Ganglions des *Plexus pelvinus* bei einem CJD-Fall in der Immunhistochemie unter 12F10

Die Abbildung zeigt dasselbe Organ wie in Abbildung 30. Zur besseren Vergleichbarkeit mit letzterer dient die Übersichtsdarstellung (links). In der hieraus entnommenen (markiert) rechten Detailaufnahme präsentieren sich die Ganglienzellen immunonegativ. Aufgrund eines relativ hohen Gesamthintergrunds kommt es lediglich zu einer unspezifischen und gleichmäßig flächigen Rosafärbung aller Neurone. Auch hier sind zusätzlich bräunliche Neuromelanin-Granula in den Nervenzellen zu erkennen.

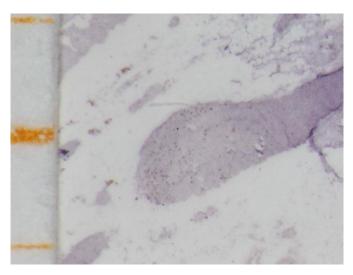


Abbildung 32: Negative Immunreaktion eines Ganglions des *Plexus pelvinus* bei einem Kontrollfall im PET-Blot unter 12F10

Die Abbildung zeigt, dass unter denselben Bedingungen, diesmal bei einem der Kontrollfälle, eine positive Immunreaktion der Ganglienzellen im PET-Blot ausbleibt. Einige der Nervenzellen imponieren zwar dunkel-violett, dies ist jedoch bei relativ hohem Gesamtfärbeniveau als nicht spezifisch zu werten. 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

### 3.8 Patientenfälle mit mehreren immunopositiven Ganglien

Unter den 41 untersuchten sCJD-Fällen fanden sich insgesamt sieben, bei welchen mindestens zwei Ganglienstrukturen betroffen waren. Entsprechend den oben ausgeführten Ergebnissen wiesen alle diese Patienten einen PrPsc-Typ 2-Hintergund auf, darunter fünf MV2- und zwei VV2-Subtypen. Ferner zeigten alle diese Fälle eine Positivität des Trigeminusganglions. Zwei der Patienten (Nummer 25 und 30) waren zusätzlich immunopositiv im *Ggl. coeliacum* sowie zwei weitere im *Ggl. nodosum* (Nummer 29) bzw. thorakalen Grenzstrang (Nummer 31). Die Patienten mit der Nummer 32 und 40 zeigten über das Trigeminusganglion hinaus einen Befall sowohl des *Ggl. nodosum* als auch der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs. Der einzige Patient mit einer immunopositiven Reaktion in den Ganglien des *Pl. pelvinus* (Nummer 37) schließlich präsentierte darüber hinaus neben dem *Ggl. trigeminale* eine Affektion des *Ggl. nodosum* und *Ggl. coeliacum*.

### 3.9 Exemplarische Darstellung unter alternativen Antikörpern

Anti-PrP 12F10 stellte unseren Referenz-Antikörper dar, da sich hierunter die zuverlässigsten und morphologisch schönsten Resultate ergaben. Im Folgenden sollen nun exemplarisch Färbeergebnisse aus dem PET-Blot mit zu 12F10 alternativen Antikörpern dargestellt werden. Es besteht dabei kein Anspruch auf Vollständigkeit. Es soll lediglich deutlich werden, dass das unter dem Referenzantikörper erzielte Ergebnis auch unter 3F4 bzw. ICSM-18 vielfach bestätigt werden konnte (Abbildung 33, Abbildung 34), wenn auch

mit teilweise geringerer Intensität (Abbildung 34, Abbildung 35). Ebenso werden aber auch diskrepante Färbeergebnisse gezeigt, bei welchen es nicht gelungen ist, mit den alternativen Antikörpern das Resultat des Standards 12F10 zu reproduzieren (Abbildung 36, Abbildung 37). Ausgangpunkt dieser Versuchsreihe war üblicherweise ein kräftig positives Färbeergebnis im PET-Blot unter 12F10. Die dahinterstehende Überlegung war, die Wahrscheinlichkeit einer Antigen-Detektion bei einem teilweise recht subtilen Maß an Positivität bzw. im Vergleich zu 12F10 reduzierter Sensitivität des entsprechenden Antikörpers möglichst zu erhöhen.

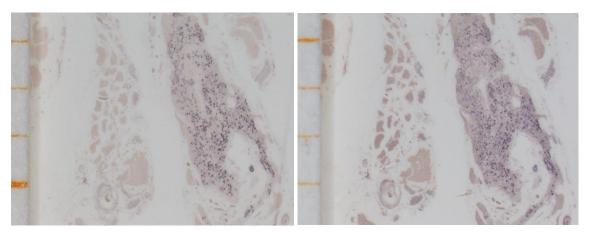


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung eines Ganglion trigeminale im PET-Blot unter 12F10 (links) bzw. 3F4 (rechts)

Die beiden Abbildungen machen im Vergleich deutlich, wie sich ein Trigeminusganglion im PET-Blot sowohl unter 12F10 als auch unter 3F4 kräftig positiv anfärben ließ. Beide 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

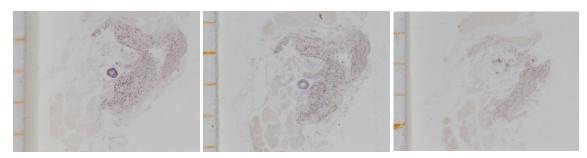


Abbildung 34: Vergleichende Darstellung eines *Ganglion trigeminale* im PET-Blot unter 12F10 (links), ICSM-18 (Mitte) bzw. 3F4 (rechts)

Die drei Abbildungen machen im Vergleich deutlich, wie sich ein Trigeminusganglion im PET-Blot unter 12F10 und ICSM-18 kräftig, unter 3F4 jedoch nur schwach positiv anfärben ließ. Alle 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

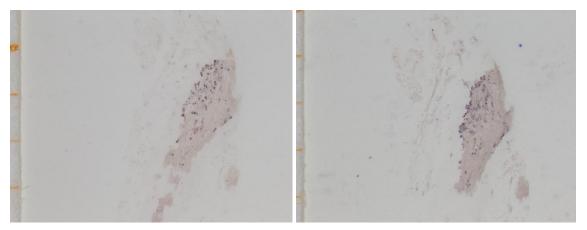


Abbildung 35: Vergleichende Darstellung eines *Ganglion nodosum* im PET-Blot unter 12F10 (links) bzw. ICSM-18 (rechts)

Die beiden Abbildungen machen deutlich, wie sich ein *Ggl. nodosum* im PET-Blot unter 12F10 kräftig und im Vergleich dazu unter ICSM-18 bei relativ hohen Hintergrund mäßig positiv anfärben ließ. Beide 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

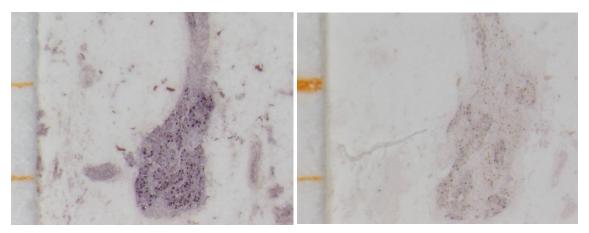


Abbildung 36: Vergleichende Darstellung eines *Ganglion coeliacum* im PET-Blot unter 12F10 (links) bzw. 3F4 (rechts)

Die beiden Abbildungen machen im Vergleich deutlich, wie sich ein *Ggl. weliacum* im PET-Blot unter 12F10 kräftig positiv darstellte, wohingegen eine Immunreaktion unter 3F4 ausblieb. Lediglich etwas braune Neuromelanin-Einlagerungen sind in den Ganglienzellen zu erkennen (rechts). Beide 40-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.





Abbildung 37: Vergleichende Darstellung eines thorakalen Grenzstrangganglions im PET-Blot unter 12F10 (oben) bzw. ICSM-18 (unten)

Die beiden Abbildungen machen im Vergleich deutlich, wie sich ein thorakales Grenzstrangganglion im PET-Blot unter 12F10 kräftig positiv darstellte, wohingegen eine eindeutige Immunreaktion unter ICSM-18 ausblieb. Das dunkelbraune Muster entspricht Formalin-Präzipitaten (grünes Oval). An der 12F10-Färbung wird noch ein weiterer, allgemeiner Aspekt deutlich, welcher recht häufig zu beobachten war: Die positive Reaktion beschränkt sich fast ausschließlich auf bestimmte Areale (rotes Oval), wohingegen andere, unmittelbar benachbarte Bereiche des Gewebes im Vergleich nur sehr schwach betroffen bzw. fast ausgespart von der Pathologie erscheinen (schwarzes Oval). Beide 20-fache Vergrößerung. Der Abstand zwischen zwei Markierungen im Maßstab beträgt 1 mm.

#### 3.10 Weiterführende Untersuchungen mit dem Western Blot

Im Folgenden sollen ebenfalls lediglich beispielhaft ausgewählte Ganglienresultate zusätzlich im *Western Blot* zur Darstellung kommen. Es soll verdeutlicht werden, dass sich die im PET-Blot und teilweise auch in der IHC demonstrierte pathogenetische Beteiligung peripherer Ganglien im Rahmen der CJD grundsätzlich mithilfe dieser weiteren, nun nichtmorphologischen, sondern biochemischen Methode bestätigen lässt. Den Erfahrungen im PET-Blot entsprechend wählten wir für diese Untersuchungen ausschließlich Patienten mit einem MV2- oder VV2-Subtyp der Erkrankung aus, da sich – mit Ausnahme des *Ggl. trigeminale* – ausschließlich in diesen Fällen positive Färberesultate gezeigt hatten.

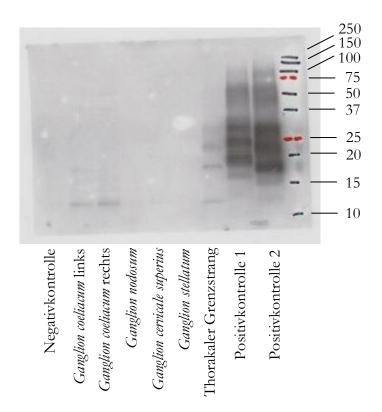


Abbildung 38: Darstellung ausgewählter Ganglien im Western Blot unter 3F4 (I)

Die Abbildung zeigt das Resultat einer ergänzenden Untersuchung ausgewählter Ganglien mit dem Western Blot. Die zugehörigen Banden wurden entsprechend beschriftet. Ein Größenmarker für das Molekulargewicht in kDa ist am rechten Rand aufgetragen. Zum Vergleich sind ebenfalls eine Negativ- sowie zwei Positivkontrollen mit abgebildet. Letztere entsprechen Hirnhomogenaten von je einem Fall mit PrPsc-Typ 1 bzw. 2 und unterscheiden sich in dieser gelelektrophoretischen Auftrennung nach PK-Verdau in der Größe ihres deglykosylierten Fragments (s. 1.1.4): Der unteren Bande entsprechend beträgt diese bei Typ 1 20,5 kDa sowie bei Typ 2 18,7 kDa. Die beiden jeweils oberhalb davon deutlich zu erkennenden Banden mit höherem Molekulargewicht repräsentieren entsprechend die einfach (mittlere Bande) bzw. zweifach (obere Bande) glykosylierte Form. Unterhalb davon im niedermolekularen Bereich sind teilweise Abbaubanden zu erkennen. Von links nach rechts: Die beiden Proben des Zöliakalganglions wurden dem linken bzw. rechten Organ desselben Patienten entnommen, welcher einen MV2-Subtyp aufwies. Das Ggl. nodosum sowie die sympathischen Strukturen stammen ebenfalls von einem MV2-Fall.

Als positiv sind in Abbildung 38 die beiden *Ganglia coeliaca* sowie das thorakale Grenzstrangganglion zu bewerten, wobei die hier sichtbaren Banden als Resultat der getroffenen Fallauswahl (MV2) entsprechend mit denen der Typ 2-Kontrolle korrespondieren. Die übrigen Proben sind negativ.

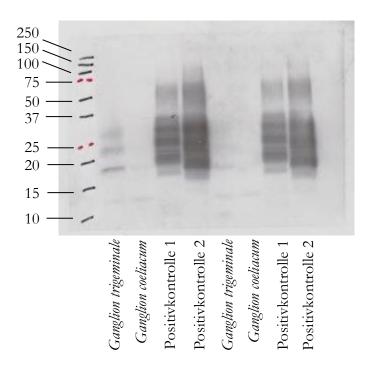


Abbildung 39: Darstellung ausgewählter Ganglien im Western Blot unter 3F4 (II)

Die Abbildung zeigt ein weiteres Ergebnis der ergänzenden Untersuchung ausgewählter Ganglien mit dem Western Blot. Die zugehörigen Banden wurden entsprechend beschriftet. Ein Größenmarker für das Molekulargewicht in kDa ist am linken Rand aufgetragen. Zum Vergleich wurden dieselben Positivkontrollen wie in Abbildung 38 mit abgebildet. Das *Ggl. trigeminale* und *coeliacum* auf der linken Seite stammen abermals von einem MV2-Patienten, jene auf der rechten von einem VV2-Subtyp.

Als eindeutig positiv sind in Abbildung 39 nur die beiden Trigeminalganglien zu beurteilen; entsprechend der Probenauswahl (MV2 bzw. VV2) korrespondieren die Banden hier erneut mit denen der Typ 2-Positivkontrollen. Die Spuren der beiden *Ganglia coeliaca* erscheinen nicht vollkommen frei von jedem Signal, für eine klare Befundung als positiv ist dies jedoch nicht ausreichend.

#### 3.11 Die genetischen Fälle

Insgesamt wurden auch zwei FFI-Patienten im PET-Blot untersucht. In beiden Fällen stand ausschließlich das *Ggl. coeliacum* für eine Analyse zur Verfügung. Hierbei ergab sich keinerlei Positivität (nicht dargestellt). Auf weiterführende Untersuchungen wurde entsprechend verzichtet.

#### 3.12 Nicht-ganglionäre Ablagerungsmuster

Ergänzend zur Ganglienanalyse erfolgte auch eine Darstellung von Nervenstrukturen. Selektiv geschah dies für periphere Nerven in Form des N. ischiadicus und Fasern des Pl. brachialis; deren Schnitte zeigten sich stets immunonegativ. Darüber hinaus beinhalteten die Proben des Ggl. trigeminale und Ggl. nodosum in vielen Fällen auch Anteile des N. trigeminus bzw. N. vagus. Während die Fasern des N. vagus ebenfalls zu jedem Zeitpunkt negativ blieben, präsentierten sich in der PET-Blot-Färbung eines Trigeminusganglions axonale Fasern positiv, welche mutmaßlich dem N. trigeminus zuzuordnen sind (nicht dargestellt).

Ferner konnten im Rahmen der histologischen Untersuchungen nebenbefundlich zu den neuronalen auch noch weitere Ablagerungsmuster der Proteinpathologie beobachtet werden (nicht dargestellt). Im PET-Blot konnte einmalig ein nicht näher klassifizierbares Ablagerungsmuster im Nebennierenmark beobachtet werden, wobei es sich bekanntermaßen um sympathisches, Ganglien-ähnliches Gewebe handelt. In der IHC zeigte sich teilweise eine positive Farbreaktion von Satellitenzellen, also jenen Gliazellen, die die Perikarien der Neurone in den Ganglien umhüllen.

Darüber hinaus zeigte sich regelmäßig ein weiteres Muster unklarer Ätiologie bzw. anatomischer Zuordnung (nicht dargestellt), das im PET-Blot seiner Farbgebung nach am ehesten der typischen Positivreaktion im Sinne eines dunklen Violetts ähnelt, morphologisch ist es jedoch punktartig im umliegenden Gewebe verteilt. Ein mögliches Korrelat konnte ebenfalls in der IHC beobachtet werden: in Form von kleinen Zellen mit einer perinukleären Pathologie, d. h. Anfärbung des Zytoplasmas und Aussparung des Zellkerns. Diese Zellen fanden sich ebenfalls perineuronal, entweder diffus im Binde- und Fettgewebe oder aber im lymphatischen Gewebe. Bei Vorkommen in Ersterem erschienen sie klein, länglich und hatten einen eher randständigen Zellkern. Bei überwiegendem Auftreten in Fett- oder lymphatischem Gewebe zeigten sich die Zellen größer, rund und mit zentral gelegenem Kern. Interessanterweise fand sich dieses Muster allgemein nur unter den anti-PrP-Antikörpern 12F10 und ICSM-18, nicht jedoch unter 3F4. Ferner kam es sowohl bei den Prion-Fällen als auch den Kontrollen zur Darstellung, wenn auch bei Letzteren insgesamt weniger ausgeprägt.

#### 4 Diskussion

### 4.1 Einordnung der humanen Ganglienbefunde

Die Resultate unserer Ganglienuntersuchung zur sCJD bzw. iCJD (s. 3) lassen sich wie grundsätzliche Immunreaktivität im Sinne zusammenfassen: Eine pathogenetischen Mitbeteiligung ließ sich mithilfe der Standardmethode des PET-Blots im Ggl. trigeminale und Ggl. nodosum, im thorakalen Grenzstrang sowie im Ggl. coeliacum und den Ganglien des Pl. pelvinus nachweisen, nicht jedoch im zervikalen Grenzstrang oder dem Ggl. stellatum. Eine immunhistochemische Bestätigung der Positivbefunde gelang vollständig in Bezug auf das Ggl. trigeminale, relativ überzeugend für die Ganglien des thorakalen Grenzstrangs, nur mäßig für das Ggl. nodosum und gar nicht für das Ggl. coeliacum sowie die Ganglien des Pl. pelvinus. Eine sich final anschließende Untersuchung mit dem Western Blot konnte die positiven Ergebnisse im Ggl. trigeminale und Ggl. coeliacum sowie im thorakalen Grenzstrang reproduzieren; das Ggl. nodosum blieb negativ. Ganglien des Pl. pelvinus standen für eine Analyse im Western Blot nicht zur Verfügung, zusätzlich wurden jedoch auch der zervikale Grenzstrang am Beispiel des Ggl. cervicale sup. sowie das Ggl. stellatum untersucht, bei welchen ein Nachweis von PrPsc ausblieb. Bei den FFI-Patienten erfolgte eine sehr wobei lediglich der Zöliakalganglien, ausgewählte Untersuchung wir keine Immunreaktivität feststellen konnten.

Ein Vergleich mit der bestehenden Literatur zur Ganglienbeteiligung im Rahmen humaner Prionerkrankungen zeichnet folgendes Bild: Haïk et al. (2003) beschrieben die immunhistochemische Beteiligung des sympathischen Nervensystems in Form des Ggl. coeliacum, Ggl. stellatum und Ggl. mesentericum sup. für die vCJD, verneinten diese aber ausdrücklich im Fall der sCJD oder iCJD. Zur Bestätigung ihrer Ergebnisse ergänzten sie die IHC um weitere Methoden: In einer PET-Blot-Untersuchung zeigten sich das Ggl. coeliacum und Ggl. stellatum positiv bei der vCJD, aber negativ bei den sporadischen CJD. Die Analyse des Ggl. mesentericum und Ggl. stellatum im Western Blot lieferte, wie auch in den entsprechenden Immunfärbungen, ausschließlich für die vCJD, nicht jedoch im Fall der sCJD ein positives Ergebnis. Die vollständig negativen Resultate im Hinblick auf das Ggl. den sporadischen CJD und der iCJD stimmen mit unseren stellatum bei Versuchsergebnissen überein. Eine Diskrepanz besteht jedoch in Bezug auf das Ggl. coeliacum: Zwar gelang uns ebenfalls keine Bestätigung dieses Befundes in der IHC (s. Abbildung 27), im PET-Blot konnte aber eine klare Immunreaktivität nachgewiesen werden (s. Abbildung 26). Ein wesentlicher Kritikpunkt an der Studie von Haïk et al. (2003) und zugleich mögliche Erklärung für diese fehlende Übereinstimmung ist, dass hier im Vergleich zur vCJD insgesamt nur zwei sporadische CJD-Patienten und ein iCJD-Patient untersucht worden sind. Diese auch für eine seltene Krankheit sehr niedrige

Fallzahl führt zu einer eingeschränkten Aussagekraft, insbesondere, wenn man bedenkt, wie gering teilweise der Anteil eindeutig immunopositiver Proben im Rahmen der von uns untersuchten Ganglien war, etwa 11 % im Fall des Ggl. coeliacum. Hainfellner und Budka (1999) konnten in ihren immunhistochemischen Analysen von u. a. enterischen Ganglien keine pathologischen Proteinablagerungen in denselben feststellen. Untersucht wurden hierbei drei sporadische CJD-Patienten und ein FFI-Patient. In den von uns untersuchten enterischen Ganglien, dem Ggl. coeliacum und den Ganglien des Pl. pelvinus, gelang hingegen der Nachweis von Proteinaggregaten wenigstens bei einzelnen CJD-Patienten (s. Abbildung 26 und Abbildung 30). Im Hinblick auf die FFI fanden wir ebenfalls immunonegative Zöliakalganglien vor. Als Erklärungsansätze für diese differierenden Ergebnisse kommt einerseits wiederholt die sehr niedrige Fallzahl der Autoren in Betracht, andererseits sei auf die der IHC überlegene Sensitivität des PET-Blots verwiesen. Demgegenüber konnten Lee et al. (2005) bereits zeigen, dass sich der Befall von autonomen Ganglien nicht auf die vCJD beschränkt. Immunhistochemisch blieb das sympathische Ganglion aus dem thorakalen Grenzstrang eines sCJD-Patienten hier zwar negativ, bei einem von zwei untersuchten Patienten mit einer sporadischen CJD aber zeigte sich das Ggl. coeliacum positiv. Es zeichnet sich somit tendenziell eine Übereinstimmung mit unseren Färberesultaten ab, in welchen sich allerdings auch die thorakalen Grenzstrangganglien immunopositiv gezeigt hatten (s. Abbildung 20). Zu kritisieren ist an dieser Arbeit abermals die Verwendung einer nicht optimalen Methode sowie von für diese Fragestellung sehr kleinen Patientenkollektiven. Im Fall einer Untersuchung von mehr als nur einem Patienten wäre auch unter den Bedingungen von Lee et al. (2005) vermutlich mit einer Immunreaktivität des sympathischen Grenzstrangs zu rechnen gewesen. Ferner resultiert aus dieser Studie eine große Bedeutung des sensiblen Nervensystems in der CJD-Pathogenese (s. 1.2.5), was auch mit unseren Daten übereinstimmt: Mit über 60 % war das Ggl. trigeminale in unserer Arbeit mit Abstand am häufigsten immunopositiv, das Ggl. nodosum am zweithäufigsten mit 31 %. Zur biochemischen Bestätigung ihrer morphologischen Resultate führten schließlich auch Lee et al. (2005) eine Western-Blot-Untersuchung durch. Hierfür stand ihnen ein Ggl. Gasseri eines sCJD-Patienten zur Verfügung, in welchem ihnen ebenfalls in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen der Nachweis von PrPsc gelang. Auch Guiroy et al. (1989) hatten bereits auf die Rolle des Trigeminusganglions im Rahmen der CJD-Pathogenese verwiesen. Zum Ggl. nodosum hingegen scheinen, ganz anders als beim Tier (s. 1.2.2), im Kontext der sCJD bislang keine vergleichbaren Untersuchungen zu existieren.

Head et al. (2004) gelang es durch die Untersuchung verschiedener peripherer Gewebe mithilfe von IHC und Western Blot, Befallsmuster zu erarbeiten, welche es erlauben, die sporadischen CJD sowie vCJD und iCJD voneinander zu differenzieren. Exemplarisch für Letztere diente hierbei ein mit einer Hormontherapie assoziierter peripherer Fall. Die Detektion von PrPres erfolgte dabei u. a. im Trigeminusganglion, und zwar immunhistochemisch bei den meisten sporadischen CJD- und allen vCJD-Fällen. Eine

Bestätigung gelang bei diesen beiden Gruppen auch im Western Blot, ebenso wie der Nachweis von PrPres bei der iCJD. Eine PrPres-Positivität in den Spinalganglien zeigte sich darüber hinaus in der IHC bei der Hälfte der sCJD- und abermals allen vCJD-Patienten. Nur bei Letzteren gelang dieser Nachweis grundsätzlich auch im Western Blot, hier zeichnete sich ferner der iCJD-Fall durch das Fehlen pathologischen Proteins aus. Wie einleitend erklärt (s. 3), setzte sich unser Patientenkollektiv neben überwiegend sporadischen CJD- auch aus zwei zentralen iCJD-Fällen zusammen, eine weitere Differenzierung bezüglich dieser beiden Diagnosen wurde von uns nicht vorgenommen. Tatsächlich waren aber in der Untersuchung von Head et al. (2004) die Befunde im Hinblick auf das Trigeminusganglion jedenfalls unabhängig von der Subform der Erkrankung recht einheitlich im Sinne einer grundsätzlichen Immunreaktivität. Diese können wir sowohl morphologisch im PET-Blot und der IHC als auch im Western Blot bestätigen.

### 4.2 Morphologische Charakterisierung der ganglionären Pathologie

Im Hinblick auf das Gesamterscheinungsbild der Ganglienfärbungen haben wir nicht selten die Beobachtung gemacht, dass sich innerhalb ein und desselben Schnitts pathologisch betroffene sowie nicht betroffene Areale oder sogar einzelne Zellen mit diesen Eigenschaften in unmittelbarer Nachbarschaft befinden können (s. Abbildung 6 und Abbildung 37). Eine Erklärung für diesen Aspekt einer fokalen Betroffenheit bleibt offen. Es stellt sich jedoch die Frage nach möglichen protektiven Mechanismen in den physiologisch erscheinenden Zellen. Grundsätzlich ist dieses Phänomen weder unbekannt noch auf Neurone beschränkt: DeJoia et al. (2006) bemerkten bezüglich der von ihnen beobachteten PrPsc-positiven Skelettmuskelzellen ebenfalls, dass diese in vielen Fällen von PrPsc-negativen Zellen derselben Art umgeben waren. Dieser Vergleich wird durch die Tatsache relativiert, dass sich das beschriebene Muster in der Skelettmuskulatur durch entsprechende Motoneuron-Versorgungsgebiete erklärt (Herzog et al. 2005). Man könnte jedoch spekulieren, dass das Ablagerungsmuster im Gangliengewebe ebenfalls in Abhängigkeit von der Innervation durch periphere Nerven entsteht. Darüber hinaus ist die Beobachtung eines Nebeneinanders von pathologisch veränderten und vollkommen unauffälligen Zellen nicht Prion-spezifisch, sondern kann beispielsweise auch bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, der amyotrophen Lateralsklerose, in diesem Fall an den Pyramidenzellen gemacht werden (Braak et al. 2017). Auch Head et al. (2004) bemerkten in ihren immunhistochemischen Untersuchungen peripherer Gewebe, dass das sich hier zeigende Muster im Gegensatz zum ZNS sehr heterogen ist, in dem Sinne, dass nur ein geringer Teil der Zellen Akkumulationen von PrPres enthielt, während die meisten hingegen unmarkiert blieben.

Die wesentlichen zellulären Charakteristika der von uns im PET-Blot und analog der IHC beobachteten Ablagerungen pathologischen Proteins bestehen in ihrem klaren Bezug zur Zellmembran bzw. dem Zytoplasma sowie ihrem insbesondere in der IHC sehr distinkten,

granulären Erscheinungsbild (s. Abbildung 6 und Abbildung 7). Sie befinden sich damit innerhalb des Spektrums bereits mittels verschiedener Färbemethoden definierter Morphologien. Lee et al. (2005) beschrieben ihre positiven immunhistochemischen Färbeergebnisse an Ganglien im Rahmen humaner Prionkrankheiten ebenfalls als ein Nebeneinander von Membran-assoziierten bzw. diffus-zytoplasmatischen Akkumulationen. Jeffrey et al. (2001) benannten die immunhistochemische Markierung ganglionärer Neurone bei Scrapie-Schafen als granulär intrazytoplasmatisch. Auch Groschup et al. (1999) erkannten die immunhistochemische Positivität von Ganglienzellen verschiedener Organe bei experimenteller Scrapie in Form markanter granulärer PrPsc-Einschlüsse des Zytoplasmas. Auch die immunhistochemischen Untersuchungen am oralen Hamstermodell ergaben granuläre Ablagerungen in den Nervenzellen verschiedener Ganglien sowie ein zusätzliches extrazelluläres Muster im CMGC (McBride und Beekes 1999) und den Ganglien des ENS (Beekes und McBride 2000). Haïk et al. (2003) wandten für die Untersuchung sympathischer Ganglien bei Patienten mit vCJD neben der IHC zur Bestätigung auch die PET-Blot-Methode an. Hier zeigte sich ein korrespondierendes punktförmiges Ablagerungsmuster mit Bezug zur Zellmembran.

### 4.3 Überlegungen zu immunonegativen Ganglien

Mit Ausnahme des Ggl. trigeminale gilt im Hinblick auf alle anderen immunopositiven Organe, dass hier, trotz des klaren Nachweises dieser grundsätzlichen Immunreaktivität, zugleich die überwiegende Zahl der untersuchten Proben negativ blieb. Bezüglich des zervikalen Grenzstrangs sowie des Ggl. stellatum gelang uns sogar keinerlei Anfärbung. Neben einer tatsächlich selteneren pathogenetischen Beteiligung dieser Strukturen kommen prinzipiell auch technische Erklärungsansätze für dieses Phänomen in Frage. Lediglich im Hinblick auf das Ggl. trigeminale und Ggl. coeliacum konnte annähernd die Gesamtzahl der Patienten untersucht werden. Für alle anderen Organe war die Fallzahl deutlich niedriger, was die Wahrscheinlichkeit, immunopositive Proben zu detektieren bzw. eine möglichst repräsentative Aussage zu treffen, reduziert. Dies liegt einerseits daran, dass das Ggl. nodosum sowie die sympathischen Strukturen in unserer Arbeitsgruppe erst seit kürzerer Zeit regelhaft im Rahmen humaner Autopsien mit entnommen werden, sie standen daher nur in geringerer Zahl zur Verfügung. Andererseits sind die niedrigen Fallzahlen insbesondere der Ganglien des Pl. pelvinus sowie des Ggl. nodosum darauf zurückzuführen, dass hier einige im Rahmen der Autopsie gewonnene Proben aufgrund des fehlenden Anteils von Gangliengewebe verworfen werden mussten (s. 3). Auch im Hinblick auf das Ggl. coeliacum fanden sich des Öfteren Proben, die frei von Gangliengewebe waren. Neben dem hohen technischen Anspruch der Ganglienpräparation im Allgemeinen existiert eine weitere Erklärung für das regelmäßige Vorhandensein ganglienleerer Proben. Gerade für das Ggl. coeliacum und die Ganglien des Pl. pelvinus, die beide in große Nervengeflechte einstrahlen, wurden in vielen Fällen gezielt auch über das Kernganglion hinaus Gewebeproben entnommen, um die Ausbreitung in umliegende anatomische Strukturen zu

bestimmen. In den entsprechenden Schnitten dominierten Binde-, Fett- und lymphatisches Gewebe sowie Nervenfasern in Abwesenheit neuronaler Somata. Bisweilen wurden bei all diesen Betrachtungen auch Schnitte in die Analyse mit aufgenommen, die zwar formal Gangliengewebe enthielten, im Vergleich zu einer durchschnittlichen Probe gesehen aber nur in geringer Menge, sodass also eine relativ niedrige Ganglienzelldichte bestand. Auch diese Tatsache reduziert die Wahrscheinlichkeit, immunopositive Zellen zu detektieren, zumal es regelhaft möglich war, in unmittelbarer Nachbarschaft zu nicht betroffenen Gewebearealen solche mit einer klaren Immunreaktivität zu finden (s. Abbildung 37). Auch das direkte Nebeneinander eindeutig immunopositiver und negativer Zellen war nicht selten (s. Abbildung 6). Von einem relativ kleinen negativen Ausschnitt einer Probe konnte also nur selten auf ihr Gesamtanfärbeverhalten geschlossen werden. Abgesehen von der Fallzahlbetrachtung muss auch die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse in Erwägung gezogen werden. Über alle Proben hinweg, zumal sie über einen Zeitraum von Jahren zusammengetragen worden sind, kam es aufgrund von Protokollveränderungen mit der Zeit zwangsläufig zu kleineren Unterschieden in der Fixierungsdauer. Je länger man letztere wählt, desto Protease-sensitiver werden die Proben im Allgemeinen und desto höher also auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein potentiell spezifisches Antigen mitverdaut wird, was durchaus schwächere oder falsch negative Färbeergebnisse bedingen kann; diese Ausführungen gelten insbesondere für das Ggl. coeliacum. Ein weiterer potentieller Erklärungsansatz, welcher für die Negativresultate des Ggl. coeliacum sowie der Ganglien des zervikalen Grenzstrangs und des Ggl. stellatum zu diskutieren ist, besteht in der Tatsache, dass in diesen Fällen das jeweils linke und rechte Organ verschiedene anatomische Areale versorgen und sich daher auch in ihrem Färbeergebnis unterscheiden können. Für die hier durchgeführten morphologischen Untersuchungen stand in den meisten Fällen nur das eine dieser beiden Organe zur Verfügung, während das jeweils kontralaterale biochemischen Analysen vorbehalten war. Dies kann eine Verzerrung der Ergebnisse bedingen, insbesondere zumal die Zuordnung der jeweiligen Organseite zu einer der beiden Methodiken systematisch erfolgte. So wurde in der vorliegenden Arbeit stets das linke Ganglion zur histologischen Analyse herangezogen. Dieses Vorgehen rechtfertigt sich bei vermuteter Seitendifferenz sowie insgesamt relativ geringer Probenanzahl dadurch, dass auf diese Weise eine repräsentative Aussage für wenigstens eine der beiden Seiten getätigt werden kann. In zukünftigen Untersuchungen müsste diese Tatsache berücksichtigt werden bzw. die Seitenzuordnung gezielt umgekehrt erfolgen. Schließlich bleibt zu bedenken, dass die Krankheitsdauer der Patienten in unseren Auswertungen nicht berücksichtigt werden konnte. Diese ist möglicherweise ein wesentlicher Faktor, der Einfluss darauf haben könnte, in welchem Ausmaß wenigstens eine Beteiligung des PNS bereits stattgefunden hat, sofern man diese auch als eine Funktion der Zeit begreift. Glatzel et al. (2003) postulierten in ihrer Untersuchung zu den sporadischen CJD, dass das extraneurale Vorkommen von PrPsc im Allgemeinen im Zusammenhang mit einer signifikant verlängerten Krankheitsdauer stand (s. 1.3.2).

### 4.4 Erklärungsansätze für das unspezifische Ablagerungsmuster

Zu dem in 3.11 beschriebenen, unklaren Ablagerungsmuster, welches sich uns als Zufallsbefund präsentierte, existieren verschiedene Überlegungen. Da das Auftreten desselben ganz klar auf bestimmte Antikörper beschränkt ist, könnte man einen antikörperabhängigen Effekt vermuten. Ein mögliches Äquivalent wären Abbauprodukte der entsprechenden Antikörper: Gerade 12F10 zeigt auch im Western Blot mehr Nebenbanden, weshalb dort 3F4 verwendet wird. Möglicherweise neigt also dieser Antikörper im Allgemeinen vermehrt zu unspezifischen Bindungen. Abgesehen davon grundsätzlich iedes Artefakt auch eine Frage Fixierung Bemerkenswerterweise präsentiert sich das punktartige Muster außerdem in zwei unterschiedlichen morphologischen Erscheinungsformen, welche sich möglicherweise durch die jeweils verschiedenen Eigenschaften des betrachteten Gewebes erklären lassen. So ist das Fettgewebe recht locker strukturiert und könnte den Zellen erlauben, ihre runde Form anzunehmen. Das Bindegewebe hingegen ist vergleichsweise straff angeordnet, die Zellen würden in eine längliche Form gebracht. Darüber hinaus muss aufgrund eben dieser Morphologien bei den Zellen an solche des mononukleär-phagozytären Systems gedacht werden. Gerade das längliche Zytoplasma spricht für eine histiozytäre Zelle, Fibroblasten wären auch denkbar, allerdings waren hierfür die entsprechenden Zellen an der Zahl zu wenig. Die eher runde Erscheinungsform zeigt durchaus Ähnlichkeit zu Makrophagen. Beekes und McBride (2000) beschrieben eine Prion-Pathologie von Makrophagen im Rahmen des GALT-Befalls am oralen Hamstermodell. Bei der intranasalen Scrapie-Inokulation von Hamstern bzw. der darauffolgenden primären NALT-Pathologie zeigten sich die PrPTSE-Ablagerungen u. a. innerhalb von Zellen, die von den Autoren a.e. als Makrophagen beurteilt wurden (Sbriccoli et al. 2009). Auch bei der transnasalen TME-Infektion von Hamstern zeigten sich die Ablagerungen von fehlgefaltetem PrP im Rahmen einer primären Erregerreplikation im NALT überwiegend in Zellen, die hier zwar nicht mittels spezifischer Marker identifiziert wurden, aber basierend auf ihrer Morphologie mit Makrophagen vereinbar wären (Kincaid und Bartz 2007). Die immunhistochemische Untersuchung lymphatischer Gewebe von Schafen mit Scrapie lieferte Akkumulationen von PrPsc u. a. in Makrophagen - den Autoren nach wahrscheinlich sog. tingible body macrophages (TBM), wobei die Identifizierung letzterer über das zusätzliche Vorliegen von Lipofuszin-Pigment in ihrem Zytoplasma erfolgte (van Keulen et al. 1996). Die TBM sind eine spezielle Art von Makrophagen, die in den Keimzentren sekundär-lymphatischer Gewebe vorkommen. Ihr Name rührt daher, dass sie Reste von apoptotischen, phagozytierten Zellen enthalten (sog. tingible bodies) (Smith et al. 1998). Auch Jeffrey et al. (2001) beschrieben bei Scrapie-Schafen immunhistochemische PrP-Akkumulationen in Zellen mit Ähnlichkeit zu TBM. Bei Schafen mit Scrapie existieren auch Untersuchungen lymphatischer Gewebe mittels Doppel-Markierung in der IHC. Damit gelang eine Phänotypisierung PrPsc-positiver Makrophagen über ein Zell-spezifisches Antigen (Andréoletti et al. 2000; Andréoletti et al. 2002).

In diesen Berichten scheint jedoch eine Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen als eine weitere Komponente des mononukleär-phagozytären Systems in den meisten Fällen nicht eindeutig gegeben zu sein: So war die immunologische Markierung bezüglich pathologischen PrPs in den Untersuchungen von Beekes und McBride (2000) am deutlichsten jedenfalls in den FDZ zu sehen. In beiden NALT-Studien werden als Alternative zu den oben genannten Makrophagen auch dendritische Zellen (Sbriccoli et al. 2009) bzw. FDZ (Kincaid und Bartz 2007) angeführt. Die durch van Keulen et al. (1996) beschriebene mutmaßliche Makrophagen-Pathologie wurde nur zusätzlich zu einem anderen Ablagerungsmuster von PrPse beobachtet, welches a.e. FDZ-assoziiert ist. Die von Jeffrey et al. (2001) postulierte Prion-Pathologie in TBM war ebenfalls begleitet von einer ebensolchen in FDZ. Auch die spezifischen IHC-Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe um Andréoletti et al. (2000; 2002) ergaben nicht nur eine zusätzliche PrPse-Pathologie ebenso in FDZ, sondern unter morphologischen Gesichtspunkten könnten die immunologisch markierten Zellen (s. o.) in demselben Maße auch interdigitierenden dendritischen Zellen entsprechen.

Auf die wahrscheinlich bedeutende Rolle von dendritischen Zellen (FDZ) im Rahmen der Prionpathogenese (Kitamoto et al. 1991) wurde bereits einleitend hingewiesen (s. 1.3.1). Eine zusätzliche Beteiligung von Makrophagen, insbesondere TBM, erscheint vor dem Hintergrund der obigen Ausführungen jedoch wenigstens unsicher. Auch unsere Befunde deuten in diese Richtung, denn das hier beschriebene Muster kann nicht pathologischem PrP entsprechen. Dagegen spricht neben der vollständig fehlenden Reaktivität unter einem der drei Prion-Antikörper die Tatsache, dass sich die entsprechenden Ablagerungen auch Kontrollfällen fanden. Als alternativer Erklärungsansatz für das positive Reaktionsmuster einer histiozytären Differenzierungsstufe bzw. von Makrophagen ist in der IHC auch ein allgemeiner Hintergrundeffekt denkbar (s. 2.2.4). Im Rahmen eines artifiziellen Epitop-retrievals kann es zu einer fälschlicherweise angefärbten, endogenen alkalischen Phosphatase in den Immunzellen kommen, ein Effekt, der üblicherweise mittels Levamisol durch Aktivitätsreduktion dieses Enzyms verhindert werden soll. Abschließend konnte die Zellart des dargestellten Ablagerungsmusters hier nicht geklärt werden. Hierfür wären weiterführende Untersuchungen wie die selektive Darstellung bestimmter Immunzellen notwendig. Bis auf Weiteres muss von einem unspezifischen Effekt ausgegangen werden.

### 4.5 Weitere ganglienunabhängige Pathologien

Über das in 4.4 diskutierte Ablagerungsmuster hinaus sollen auch die weiteren nichtneuronalen Präsentationsformen der Proteinpathologie hier besprochen werden (s. 3.11).
So wurde von einigen anderen Autoren ebenfalls bereits über eine immunhistochemische
Mitreaktion von Satellitenzellen bei der CJD (Guiroy et al. 1989; Lee et al. 2005) bzw.
Scrapie (Jeffrey et al. 2001) berichtet. Auch die Detektion von fehlgefaltetem PrP in der
Nebenniere wurde schon beschrieben: im Western Blot bei experimenteller BSE (Masujin

et al. 2007), mittels ELISA am nicht-humanen Primatenmodell für humane TSE (Herzog et al. 2005) sowie immunhistochemisch bei der Scrapie (Jeffrey et al. 2001). Die medullären PrP-Akkumulationen im Rahmen der letzteren Untersuchung zeigten ein lineares Muster, weshalb die Autoren eine Assoziation mit sympathischen Nervenfasern vermuteten.

Unsere Befunde die peripheren Nerven betreffend lassen sich folgendermaßen einordnen: Die beobachtete positive Immunreaktion eines N. trigeminus deckt sich nicht nur mit dem Befund der regelhaften Mitbeteiligung des Ggl. trigeminale im Kontext humaner Prionerkrankungen (Guiroy et al. 1989; Lee et al. 2005), sondern auch mit tierexperimentellen Beobachtungen, wonach dieser Nervenroute sowohl in zentrifugaler (Ingrosso et al. 1999; DeJoia et al. 2006) als auch in zentripetaler (Carp 1982; Ingrosso et al. 1999) Richtung eine relevante Bedeutung zukommt (s. 1.2.4). Zwischen dem in unseren Untersuchungen relativ häufigen Befund eines immunopositiven Ggl. nodosum und Ggl. coeliacum sowie einem stets negativen Befund des N. vagus hingegen besteht eine Diskrepanz. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür besteht in der Tatsache, dass letzterer Theoretisch müssten sich auch in dem Nervengewebe großflächig ist. Proteinablagerungen finden lassen, die Wahrscheinlichkeit jedoch, dass der entsprechende Bereich im Rahmen der Analyse angeschnitten wird, ist deutlich geringer. Diese Erfahrung eines divergierenden Ergebnisses zwischen Ganglienzellen einerseits und Nervenfasern andererseits haben auch andere Autoren gemacht: McBride et al. (2001) konnten in ihrem oralen Hamstermodell u. a. ebenfalls mit der PET-Blot-Methode zeigen, dass PrPsc-Akkumulationen in den Nervenfasern von N. vagus, N. splanchnicus und Spinalnerv auch in terminalen Krankheitsstadien nicht detektierbar bzw. minimal waren. Es wurde geschlussfolgert, dass in diesen Teilen des PNS also eher ein Transport stattfindet, wohingegen eine aktive Replikation und Akkumulation des Erregers weitestgehend auf neuronale Somata beschränkt bleibt. Entsprechend zeigten auch Untersuchungen zur Infektiosität hier niedrigere Titer für den N. vagus im Vergleich zum CMGC. In Übereinstimmung hiermit gelang Hoffmann et al. (2007) in einer oralen BSE-Studie mittels IHC und Western Blot ebenfalls kein Nachweis von PrPsc-Akkumulationen im N. vagus. Die ausbleibende Immunreaktivität in den weiteren durch uns untersuchten peripheren Nerven, dem N. ischiadicus und den Ästen des Pl. brachialis, unterscheidet sich von der durch Groschup et al. (1996) im Rahmen der Scrapie festgestellten Infektiosität in u. a. N. ischiadicus, N. axillaris, N. ulnaris und N. medianus. Neben dem allgemeinen Argument potentieller Speziesunterschiede bezüglich der Prionpathologie muss wenigstens in demselben Maße wie in Bezug auf den N. vagus (s. o.) bei diesem Befund auch an die Großflächigkeit der anatomischen Strukturen als mögliche Erklärung gedacht werden. Ferner gelang Jeffrey et al. (2001) bei Scrapie-Schafen ebenfalls der immunhistochemische Nachweis von PrP-Akkumulationen zwar in peripheren Ganglien, nicht aber in peripheren Nerven, wie, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, dem N. vagus sowie N. ischiadicus, jedoch auch dem N. trigeminus.

### 4.6 Theorien zur Ausbreitungsrichtung im Vergleich mit Tierstudien

Zur Ganglienbeteiligung im Rahmen von Prionkrankheiten gibt es beim Menschen bislang nur wenig Erkenntnisse. Entsprechend existieren auch keine Ausbreitungsmodelle, vergleichbar denen, wie sie in verschiedenen Tierversuchen gewonnen wurden (s. 1.2.1 bis 1.2.3). Lediglich im Hinblick auf die bekannte Beteiligung des Trigeminusganglions (Guiroy et al. 1989; Lee et al. 2005) kann ein zentrifugaler Mechanismus vermutet werden. Diese Regel dürfte womöglich auch auf andere ZNS-nahe Ganglien, wie etwa das ebenfalls sensible *Ggl. nodosum*, zutreffen. Die ZNS-fernen, autonomen Ganglien hingegen sind aus theoretisch-anatomischen Überlegungen heraus jedenfalls mit einer höheren Wahrscheinlichkeit im Rahmen eines zentripetalen Ausbreitungsgeschehens betroffen.

Als ergiebig zur experimentellen Untersuchung der Infektionsrouten haben sich die Nagermodelle erwiesen. Diese verorten die zentripetale Route der Prionen im Bereich des ANS, wobei ein rückenmarksabhängiger (Kimberlin und Walker 1980) neben einem rückenmarksunabhängigen (Baldauf et al. 1997; Beekes et al. 1998) Weg zu existieren scheint, was einer Betonung des sympathischen bzw. parasympathischen Schenkels gleichkommt. Erst im Rahmen einer sekundär-zentrifugalen Ausbreitung wird auch eine Beteilung des sensiblen Nervensystems angenommen (McBride et al. 2001). Dem gegenüber geht aus den aktuellen Primatenversuchen hervor, dass hier ein Befall des sensiblen Nervensystems dem des autonomen vorausgeht (Holznagel et al. 2015).

In unseren Untersuchungen konnten wir über das bereits relativ gut untersuchte Ggl. trigeminale hinaus eine pathogenetische Beteiligung des Ggl. nodosum und Ggl. coeliacum sowie der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs und des Pl. pelvinus feststellen. Diese Befundlage befindet sich in Übereinstimmung mit mehreren der genannten Modellvorstellungen aus dem Tierversuch, sodass eine eindeutige Zuordnung in ein entweder zentripetales oder zentrifugales Geschehen nicht möglich erscheint. Vielmehr bietet das Muster der betroffenen Organe Argumente in beide Richtungen, auch ein gemischtes Geschehen ist durchaus denkbar. Denn dass auch innerhalb einer Spezies verschiedene Ausbreitungskonzepte nebeneinander bestehen können, demonstrieren insbesondere die Versuche mit nicht-humanen Primaten. Parallel zu den bereits dargestellten Untersuchungen von Holznagel et al. (2015) (s. 1.2.3) existiert auch eine ältere orale BSE-Inokulationsstudie an Makaken, welche dem Verteilungsmuster der von der Prion-Pathologie betroffenen Gewebe nach hinweisend ist für einen Ausbreitungsmechanismus vergleichbar den Nager-Modellen (s. 1.2.1), in dem Sinne, dass sich hier ein zentripetaler Pfad entlang des ANS vermuten lässt (Herzog et al. 2004). Möglicherweise existieren also über die Art der Spezies hinaus weitere, noch unbekannte Faktoren, die zur Bevorzugung einer Ausbreitungsrichtung beitragen können. Entsprechend ist es grundsätzlich denkbar, dass auch im humanen Kontext keine unbedingte Aussage in die eine oder andere Richtung getroffen werden kann.

So wäre ein Befall prävertebraler sympathischer Ganglien, wie des *Ggl. coeliacums* oder jenen des *Pl. pelvinus*, sowohl im Rahmen eines zentripetalen (Kimberlin und Walker 1980;

McBride et al. 2001) als auch eines sekundär-zentrifugalen (Holznagel et al. 2015) Geschehens mit bestehenden Daten vereinbar. Der Befall der sympathischen, paravertebralen Ganglien des thorakalen Grenzstrangs lässt sich grundsätzlich überzeugend mit einem sekundär-zentrifugalen Ausbreitungsmechanismus aus dem Rückenmark im Sinne der Beobachtungen von Holznagel et al. (2015) erklären. Die Nn. splanchnici, welche einen Großteil des Gastrointestinaltrakts versorgen, gehen zwar aus den Ggl. thoracica hervor, werden jedoch nicht in diesen, sondern in prävertebralen Ganglien auf das zweite Neuron umgeschaltet. Im Vergleich zu letzteren erscheint daher ein zentripetaler Pfad als Erklärung für die immunopositiven Neurone in den paravertebralen Ganglien zunächst eher unwahrscheinlich, jedoch vermutlich auch in Abhängigkeit von der anatomischen Höhe nicht ausgeschlossen. Interessant ist jedoch, dass in unseren Untersuchungen sowohl der zervikale Grenzstrang als auch das Ggl. stellatum stets negativ waren. Diese Konstellation wäre zwar auch im Rahmen eines zentrifugalen Geschehens denkbar, denn nach Holznagel et al. (2015) kann die spinale Pathologie auf Höhe der lumbalen Segmente beginnen; eine Involvierung zervikaler Paravertebralganglien dürfte also aufgrund der anatomischen Distanz grundsätzlich später stattfinden als die der thorakalen. Eine vollständig fehlende Beteiligung im Terminalstadium der Erkrankung ist aber wiederum kaum denkbar. Wahrscheinlicher hingegen erscheint unter diesem Aspekt doch ein zentripetaler Prozess, bei welchem die kranialen Anteile des Sympathikus von dem aus den enterischen Gebieten aufsteigenden Erreger ausgespart bleiben. Angesichts der Immunreaktivität des Ggl. nodosum kommen wiederum zwei Deutungsansätze in Frage: Einerseits die von McBride et al. (2001) postulierte sekundär-zentrifugale Route in sensible Ganglien, in diesem Fall innerhalb des parasympathischen Systems. Andererseits besteht auch eine zentripetale Alternative über die im N. vagus mitgeführten viszerosensiblen Fasern (McBride und Beekes 1999). Lediglich die praktische Überprüfung der letzteren Variante erwies sich als problematisch, da es uns, abgesehen von den Faseranteilen des Pl. coeliacus und Pl. pelvinus, nicht möglich war, die peripheren Stationen des Parasympathikus systematisch zu untersuchen. Im Gegensatz zum Sympathikus liegen die Ganglien hier in den meisten Fällen intramural, was eine Präparation nahezu unmöglich macht. Auch die Analyse des N. vagus an sich stellte uns, wie auch andere Autoren zuvor, vor nachvollziehbare Herausforderungen (s. 4.5). Alle weiteren Strukturen schließlich liegen bereits zentral.

Aus denselben Gründen sind wir auch nicht in der Lage, etwa die sympathische (Kimberlin und Walker 1980) oder parasympathische (Baldauf et al. 1997; Beekes et al. 1998) Route zu favorisieren (s. 1.2.1). Vielmehr haben wir grundsätzlich deutliche Hinweise für eine Rolle des sympathischen Systems in Form des *Ggl. coeliacum* sowie der Ganglien des thorakalen Grenzstrangs und des *Pl. plevinus*. Eine möglicherweise ebenfalls bedeutende Funktion des Parasympathikus konnten wir nicht angemessen überprüfen. Im Zweifel muss auch hier ein kombiniertes Geschehen angenommen werden. Kaatz et al. (2012) konnten im Rahmen ihrer experimentellen BSE-Verlaufsstudie zur Neuroinvasion ebenfalls eine Beteiligung des

gesamten ANS beschreiben, mit einem früheren und ausgedehnteren Befall des sympathischen Schenkels gegenüber dem parasympathischen und ohne einen zwingend simultanen Befall dieser beiden Systeme. Die Autoren kommen zu der Annahme, dass die tatsächliche Route zum Gehirn abhängig ist von der Art des Nervengewebes, welches initial im ENS infiziert wird.

Unberücksichtigt blieb in den Ausführungen bisher die Überlegung, dass allein aufgrund des im Vergleich zu Nagern evolutionär gesehen deutlich näheren Verwandtschaftsgrads zwischen Menschen und Primaten möglicherweise die Erkenntnisse, die an diesem Modell gewonnen wurden, zu bevorzugen sind, wobei ja selbst hier wie oben beschrieben zwei alternative Ausbreitungswege zu bestehen scheinen (Herzog et al. 2004; Holznagel et al. 2015). Angesichts dieser großen Variabilität von Neuroinvasionsstrategien allein im Tierreich muss also vermutlich Vorsicht im Umgang mit der Frage herrschen, ob aus diesen Befunden überhaupt Erkenntnisse für die humane Pathologie abgeleitet werden können. Bereits Holznagel et al. (2015) selbst hatten die Sonderstellung ihres Modellvorschlags zum Anlass genommen, diese Spezies-Unterschiede zu thematisieren (s. 1.2.3).

## 4.7 Der Zusammenhang zwischen Erregerstamm und Ausbreitungsrichtung

Das TSE-Stammkonzept ist bereits einleitend im Hinblick auf verschiedene Spezies erläutert worden (s. 1.1.4). In der Betrachtung unserer Ergebnisse fällt auf, dass nur PrPsc-Typ 2-Patienten eine – über den Befall des *Ggl. trigeminale* hinausgehende – Beteiligung des PNS im Sinne weiterer immunopositiver Ganglien, entweder der autonomen oder des *Ggl. nodosum*, aufwiesen. Lediglich in Bezug auf das Trigeminusganglion präsentierte auch eine Minderheit der untersuchten MM1-Patienten eine Immunreaktivität. Innerhalb der Gruppe der immunopositiven Trigeminalganglien kam diesen jedoch nur ein Anteil von 23 % (n=5) zu, der weitaus größere Teil (77 %, n=17) entstammte auch hier der MV2- oder VV2-Gruppe. Es dominierte also ebenfalls der Typ 2-Erreger (s. Abbildung 5). Zudem war die Färbeintensität innerhalb des immunopositiven Typ 1- im Vergleich zum Typ 2-Kollektiv deutlich geringer ausgeprägt (s. 3.1.1).

Wir wissen heute, dass die Priontypen 1 und 2 nicht auf die humane Prionkrankheit CJD beschränkt, sondern auch speziesübergreifend erkennbar sind. Wemheuer et al. (2009) verglichen die Prion-Charakteristika der humanen sCJD Typen 1 und 2 mit denen von zwei verschiedenen Formen der Scrapie bei Schafen – der klassischen und einer atypischen. Dabei fanden sich deutliche Gemeinsamkeiten bezüglich pathologischer und biochemischer Eigenschaften jeweils zwischen Typ 1 und der atypischen Form bzw. Typ 2 und der klassischen. Eine solche Zuordnung lässt sich auch für die BSE treffen. Über die klassische Form hinaus sind inzwischen zwei weitere entdeckt worden, die sog. L-Typ (Casalone et al. 2004) und H-Typ BSE (Biacabe et al. 2004). Eine Ähnlichkeit konnte

zwischen dem H-Typ und der sCJD Typ 1 sowie dem L-Typ und der sCJD Typ 2 gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Zanusso 2010). In einem Übersichtsartikel stellen Wemheuer et al. (2017) nun interessanterweise fest, dass Prionkrankheiten, die unter natürlichen Bedingungen primär mit einem peripheren Übertragungsmechanismus in Verbindung gebracht werden und sich auf diese Weise in bestimmten Spezies-Populationen ausbreiten, a.e. als Typ 2-Erkrankung einzuordnen sind; dazu zählen die klassische Scrapie sowie BSE, daraus resultierend auch die vCJD, aber auch die CWD. Collinge (2010) beschrieb Prionstämme im Allgemeinen als ein "ensemble" (S. 1112), zusammengesetzt aus einer die biologischen Eigenschaften bestimmenden Hauptkomponente sowie einem geringeren Anteil weiterer Formen. Unter dem Einfluss des jeweiligen Wirtes entsteht ein Selektionsdruck, sodass - sofern nicht die Möglichkeit zur Propagation der bisher dominierenden Komponente besteht - eine vormals nur in einer Minderheit vorhandene Form nun alternativ von dem Wirt bevorzugt wird. So wissen wir, dass auch bei den sporadischen CJD das gleichzeitige Vorkommen von PrPsc-Typ 1 und 2 durchaus nicht selten ist (Parchi et al. 2009). Aus verschiedenen Tier-Inokulationsversuchen ist ferner bekannt, dass eine solche Veränderung des ursprünglichen Erregertyps tatsächlich stattfinden kann. Die Infektion mit atypischer Scrapie bzw. H-Typ BSE resultierte bei einem Schaf bzw. einer Teilmenge transgener Mäuse in der Entwicklung der jeweils klassischen Form der Erkrankung (Torres et al. 2011; Simmons et al. 2015). Es hatte also offensichtlich ein Wandel von Typ 1 hin zu Typ 2 stattgefunden. Eine ebensolche Selektion der Konformere im Sinne einer Bevorzugung des Typs 2 gegenüber dem Typ 1 halten daher auch Wemheuer et al. (2017) für die wahrscheinlichste Erklärung bezüglich der Dominanz des Priontyps 2 im Rahmen der oben genannten TSE. Da bei diesen ferner an einen überwiegend oralen Übertragungsmodus gedacht werden muss, vermuten die Autoren, dass das LRS des Darms eine Art Barrierefunktion im Hinblick auf Typ 1-Konformere einnimmt, hingegen die Replikation von Typ 2-Konformationsvarianten begünstigt. Hinweise dafür, dass das LRS den Typ 1 nicht propagiert, ergaben sich auch bereits in der Untersuchung von Wemheuer et al. (2009), in welcher interessanterweise eine Detektion von PrPsc im lymphatischen Gewebe mit der klassischen im Gegensatz zu der atypischen Form von Scrapie in Verbindung gebracht werden konnte. Darüber hinaus lassen sich auch die beiden TME-Stämme nach diesem Kriterium unterteilen: Im Gegensatz zu dem HY- ist der DY-Erreger nicht in der Lage, sich im LRS zu replizieren (Bartz et al. 2004) (s. 1.3.1). Shikiya et al. (2017) zeigten erstmals einen potentiellen Mechanismus für diese Unfähigkeit des DY- gegenüber dem HY-Stamm auf, eine Infektion in den Organen des lymphoretikulären Systems zu etablieren: Ein relatives Überwiegen der DY-PrPsc-Degradation gegenüber seiner Formation in diesen Gewebearten wird von den Autoren als ursächlich vermutet.

In Zusammenschau dieser Befunde liegt es also nahe, anzunehmen, dass auch die unseren humanen Daten zu entnehmende deutliche Assoziation von PNS-Beteiligung jenseits des *Ggl. trigeminale* und Vorliegen einer Typ 2-Erkrankung kein Zufall ist. Vielmehr könnte

vermutet werden, dass hier ebenfalls eine selektive Fähigkeit des LRS Erregerreplikation eine Rolle gespielt hat, in dem Sinne, dass nur mutmaßlich reine Typ 2-Erregerisolate zu einer Infektion auf diesem Wege führten. Alternativ kann es unter dieser Gewebepräferenz zu einer Umstrukturierung der Einzelkomponenten im Sinne von Collinge (2010) gekommen sein, d. h. ein zuvor vernachlässigbar geringer Anteil von Typ 2-Konformeren wurde nun gezielt vermehrt. Erregermaterial, das ausschließlich aus Typ 1-Konformationsvarianten bestand, wurde im Hinblick auf seine weitere Ausbreitung an dieser Stelle möglicherweise blockiert (Wemheuer et al. 2017). Auch bei den humanen Typ 2-Prionerkrankungen über die vCJD hinaus könnten wir also über eine orale o. ä. geartete Aufnahme und anschließende Wanderung des Erregers primär in die die enterischen Gebiete versorgenden autonomen Ganglien spekulieren. Ferner könnte nun vermutet werden, dass tatsächlich alle ausschließlich von dem Typ 2 befallenen Ganglien auf zentripetalem Weg erreicht worden sind, da nur in diesem Fall dem LRS eine potentiell entscheidende Rolle in der Erregerausbreitung zukäme. Für das Trigeminusganglion hätte die Theorie einer zentrifugalen Route weiterhin Bestand, welche erwartungsgemäß auch den Typ 1-Konformeren zur Verfügung steht. Diese Konstellation wäre theoretisch auch für das Ggl. nodosum vorstellbar gewesen, dessen Einordnung in ein entweder zentripetales oder zentrifugales Geschehen gerade im Vergleich mit der bestehenden Literatur noch offen geblieben war. Basierend auf den obigen Ausführungen zur Erregertyp-Selektion kann hierfür nun jedoch die zentripetale Theorie favorisiert werden. Dasselbe gilt für die befallenen autonomen Ganglien, was sich sowohl mit theoretischen Überlegungen als auch der bestehenden Literatur durchaus deckt (s. 4.6).

Bemerkenswerterweise sind die beiden von uns untersuchten, gesichert übertragenen Fälle, nämlich die beiden iCJD-Patienten, als Typ 1 (MM1) einzuordnen. Die Transmission erfolgte hierbei allerdings zentral, also LRS-unabhängig (s. 3). Die meisten weltweiten iCJD-Fälle stehen allerdings im Zusammenhang mit dem Einsatz kontaminierter Wachstumshormon-Präparate (Ritchie et al. 2017). Von diesen als peripher zu bezeichnenden Hypophysenhormon-bedingten iCJD-Fällen wissen wir, dass sie mit einer Valin-Homozygotie assoziiert sind (Collinge et al. 1991) (s. 1.1.4). Das Valin-Allel wiederum weist eine grundsätzliche Assoziation mit dem PrPsc-Typ 2 auf (Parchi et al. 1999). Auch in Bezug auf die iCJD lässt sich also eine solche Tendenz vermuten, die letztlich die Proteinkonformation in einen Zusammenhang zur Ausbreitungsrichtung stellt.

# 4.8 Patientenfälle mit Prionpathologie in mehreren Ganglien – mögliche Schlussfolgerungen zur Ausbreitungsrichtung

An dieser Stelle sollen nun noch die in 3.8 genannten Patienten, welche einen Befall von mehr als einem Ganglion aufwiesen, hinsichtlich ihres Informationsgehalts in Bezug auf mögliche Ausbreitungsrichtungen besprochen werden. Die Proteinpathologie bei dem Patienten mit der Nummer 29 beschränkte sich auf die beiden ZNS-nahen, sensiblen

Strukturen, das Ggl. trigeminale und Ggl. nodosum; weitere, relevante Organproben standen in diesem Fall einer Untersuchung nicht zur Verfügung. Alle anderen Patienten zeigten einen zusätzlichen Befall entweder der Ganglien des thorakalen Sympathikus (Nummer 31, 32 und 40) oder aber der enterischen im Sinne des Ggl. coeliacum bzw. der Ganglien des Pl. pelvinus (Nummer 25, 30 und 37). Offenkundig zeigte sich also bei keinem der drei Fälle mit immunopositivem thorakalen Grenzstrang eine gleichzeitige Pathologie in den enterischen Ganglien. Eine Erklärung für diese Beobachtung bleibt zunächst offen, jedoch könnte sie grundsätzlich einen sequentiellen, zentripetalen Pfad entlang dieser anatomischen Strukturen in Frage stellen. In diesem Zusammenhang sei auf die Überlegungen zu immunonegativen Proben des Ggl. coeliacum sowie des Pl. pelvinus im Allgemeinen verwiesen (s. 4.3). Für die zentripetale Hypothese sprechen hingegen die Untersuchungsergebnisse des kranialen Grenzstrangs bei allen diesen Patienten (Nummer 25, 30, 31, 32, 37 und 40). Mit einer Ausnahme (Nummer 25) konnten hier ebenfalls zervikale Paravertebralganglien und insbesondere das Ggl. stellatum analysiert werden. Diese zeigten sich stets negativ, was gegen einen zentrifugalen Ausbreitungsmechanismus in die genannten, weiter peripher gelegenen sympathischen Ganglien spricht, sondern vielmehr für ein kombiniertes Geschehen bei in all diesen Fällen vorhandenem, zentrifugalen Befall des Ggl. trigeminale. Schließlich zeigte sich bei den vier Patienten mit einem Befall des Ggl. nodosum (Nummer 29, 32, 37 und 40) – in Ermangelung an Probenmaterial mit Ausnahme der Nummer 29 (s. o.) – stets auch eine gleichzeitige Immunopositivität ZNS-ferner, autonomer Ganglien, sodass auch hier die zentripetale Hypothese durchaus weiterhin bestehen kann.

### 4.9 Zur Aussagekraft der statistischen Analyse

Die Subtypenanalyse war gewissen Restriktionen unterworfen: VV1-Patienten standen gar nicht, von den Unterformen MM2 und MV1 nur jeweils ein Patient der Analyse zur Verfügung. Es folgt, dass nur die drei Subformen MM1, MV2 und VV2 in repräsentativer Zahl untersucht werden konnten. Positive Färberesultate ließen sich – mit Ausnahme des Trigeminusganglions, bezüglich dessen sich auch ein geringer Anteil der MM1-Patienten immunopositiv zeigte – nur in den Subgruppen MV2 und VV2 beobachten. Diese Tendenz ist in allen quantitativ aufgearbeiteten Organen deutlich zu erkennen, auch der einzige Patient mit einem immunopositiven Ganglion des Pl. pelvinus besitzt einen VV2-Subtyp. Ein statistisch signifikantes Korrelat für diese Beobachtung ließ sich jedoch nur für das Ggl. trigeminale und Ggl. nodosum erbringen. Es sagt bezüglich eines bestimmten Organs aus, dass die Verteilung der Subgruppen auf die beiden Kategorien "positiv" und "negativ" nicht zufällig, sondern in Assoziation zueinander erfolgt. Mögliche Ursachen, die die Berechnung eines solchen Resultats im Hinblick auf die übrigen Ganglien erschwert haben könnten, sind einerseits eine recht geringe Gesamtfallzahl (thorakale Grenzstrangganglien), andererseits ein sehr niedriger Anteil immunopositiver Proben (Ggl. coeliacum). Beide Umstände reduzieren die Wahrscheinlichkeit einer Mustererkennung. Mit dem Ziel, im Rahmen der Grunderkrankung prädisponierende Eigenschaften für die pathogenetische

Mitbeteiligung peripherer Ganglien zu formulieren, ergaben sich nun im Wesentlichen zwei Möglichkeiten: Der PrPsc-Typ 2 und/oder das Vorliegen von einem oder zwei Valin-Allelen; denn dies sind die beiden Merkmale, welche die MM1- von der MV2- bzw. VV2-Form unterscheiden. Hierbei ist allerdings der oben genannte (s. 4.7) allgemeine Zusammenhang zwischen dem PrPsc-Typ 2 und dem Valin-Allel sowie umgekehrt auch zwischen dem PrPsc-Typ 1 und dem Methionin-Allel zu bedenken (Parchi et al. 1999). Allein mit der vorhandenen Datenlage ließ sich diese Frage formal nicht beantworten, zumal strategisch relevante, weitere Subtypen nicht in ausreichendem Maß untersucht werden konnten. Die Resultate im Hinblick auf den MM2- bzw. MV1-Patienten können höchstens als hinweisend angesehen werden: Das Ggl. coeliacum wurde bei diesen beiden Patienten untersucht, bei dem MV1-Fall zusätzlich auch das Ggl. trigeminale, welches allerdings als einziges Ganglion in seinem Befall keine klare Assoziation zu speziellen Subtypen aufwies und somit in dieser Sache eigentlich nicht als hinweisgebend gelten dürfte. Keine dieser Färbungen ergab ein positives Resultat. Die Tatsache, dass der MM2-Fall negativ war, spricht theoretisch für das Valin-Allel als ursächlich. Allerdings handelt es sich hierbei lediglich um ein Organ eines Patienten. Der MV1-Patient ist trotz des Vorliegens von immerhin einem Valin-Allel in formal wenigstens zwei Organen negativ gewesen, was tendenziell auf den Priontyp als relevante Größe hinweist. Diese beiden Ergebnisse weisen also in entgegengesetzte Richtungen und können, zumal von ähnlicher Qualität, noch nicht zur Klärung der Frage beitragen. Auch die selektive Testung gegen entweder den Codon-129-Polymorphismus oder aber den PrPsc-Typ allein erbrachte keinen richtungsweisenden Befund, da für beide stets ein der Subtypenanalyse vergleichbares Signifikanzniveau berechnet wurde. Die Entscheidung, dem Erregertyp als kausalem Faktor mehr Gewicht zu verleihen als dem genetischen Polymorphismus hatte also letztlich weniger statistische Gründe, sondern war vielmehr den Hinweisen aus der bestehenden Literatur geschuldet (s. 4.7).

### 4.10 Mögliche Relevanz für andere neurodegenerative Erkrankungen

Es bestehen Hinweise darauf, dass sog. *prion-like* Mechanismen auch in der Pathophysiologie anderer neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielen könnten. Prionkrankheiten können daher gewissermaßen als Modellerkrankungen für nichtinfektiöse Proteinaggregationskrankheiten betrachtet werden, wie beispielsweise den klinisch sehr viel häufigeren M. Alzheimer oder M. Parkinson (Lee et al. 2010; Costanzo und Zurzolo 2013). Darüber hinaus wird gerade im Hinblick auf die Parkinsonerkrankung seit einigen Jahren auch eine mögliche Bedeutung des ANS, insbesondere seines parasympathischen Anteils, diskutiert, welche konzeptuell Ähnlichkeit zu den entsprechenden Überlegungen bei TSE aufweist. So wurde zur Pathogeneseerklärung des M. Parkinson die sog. *dual-hit*-Hypothese entwickelt. Hiernach erreicht ein neurotropes Agens nach transnasaler Übertragung das Gehirn über zwei simultane Wege, einerseits anterograd entlang olfaktorischer Bahnen, andererseits soll es sekundär durch das

Schlucken von kontaminiertem nasalen Sekret im Gastrointestinaltrakt zu einer Infektion des ENS sowie einer retrograden Ausbreitung des Pathogens in den Hirnstamm entlang des *N. vagus* kommen (Hawkes et al. 2007). Von manchen Autoren wurde wiederum auch über eine eventuelle Bedeutung dieser Route für bestimmte Varianten der sCJD spekuliert (Zanusso et al. 2009). Ferner scheint dieser Beobachtung eine klinische Relevanz zuzukommen: So konnte jüngst ein möglicherweise protektiver Effekt der trunkalen Vagotomie im Hinblick auf die Entstehung einer Parkinsonerkrankung gezeigt werden (Liu et al. 2017).

Es liegt also nahe, auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in diesem erweiterten Kontext zu betrachten und auf ihre mögliche Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese nicht nur humaner Prionkrankheiten, sondern auch verwandter neurodegenerativer Erkrankungen hinzuweisen. Die von uns dargestellte Möglichkeit eines aus den autonomen enterischen Gebieten heraus zentripetalen Übertragungsmodus für die Typ 2-Konformere im Rahmen der sCJD fände somit durchaus eine Entsprechung in den obigen Hypothesen zum M. Parkinson, wenngleich bei unseren Untersuchungen der Fokus eher auf dem sympathischen System lag (s. 4.6).

5 Zusammenfassung 79

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Art und Ausmaß der PNS-Beteiligung im Rahmen der sCJD neu einzuschätzen. Allgemein anerkannt war bis heute lediglich ein Befall des *Ggl. trigeminale*, wahrscheinlich im Rahmen eines zentrifugalen Prozesses, welchen wir ebenfalls in ausgeprägter Form beobachten konnten. Zusätzlich gelang uns erstmals auch der Nachweis für eine Beteiligung des *Ggl. nodosum* als weiteres sensibles Ganglion. Darüber hinaus konnte die Hypothese, dass ein Befall des ANS, insbesondere des Sympathikus, nicht auf die Variante-Form dieser Erkrankung beschränkt ist, hier im Fall des *Ggl. coeliacum* bestätigt und um die immunopositiven Befunde in den Ganglien des *Pl. pelvinus* sowie des thorakalen Grenzstrangs erweitert werden.

Wesentlich zur Gewinnung dieser Erkenntnisse war die Verwendung des PET-Blots als hoch sensitives Nachweisverfahren, welches der IHC als Standardmethode im Bereich der Prionforschung in dieser Hinsicht klar überlegen ist. Eine prinzipielle Bestätigung der PET-Blot-Ergebnisse gelang sowohl immunhistochemisch als auch im *Western Blot*.

Der Nachweis einer PNS-Beteiligung über die Ganglien hinaus, in Gestalt immunopositiver peripherer Nerven, war in der vorliegenden Untersuchung lediglich von untergeordnetem Interesse, auch ergaben sich diesbezüglich nur sehr wenig Hinweise. Neben den praktischen Schwierigkeiten aufgrund der anatomischen Größe der entsprechenden Strukturen sei hier auch auf die dargestellte Vorstellung verwiesen, dass hier überwiegend ein axonaler Erregertransport stattfindet, wohingegen Akkumulation und Replikation im Bereich neuronaler Somata verortet zu sein scheinen.

Der oben dargestellte Ganglienbefall zeigte sich mit Ausnahme des *Ggl. trigeminale*, welches auch in einem Teil der MM1-Fälle betroffen war, ausschließlich bei Patienten mit einem MV2- oder VV2-Subtyp. Im Abgleich mit der bestehenden Literatur erwies sich daher insbesondere der PrPsc-Typ 2, welcher grundsätzlich auch mit einem gehäuften Vorkommen des Valin-Allels verbunden ist, als prädisponierender Faktor im Hinblick auf eine periphere Ganglienbeteiligung im Rahmen der Grunderkrankung einer sporadischen CJD.

Die Aufdeckung dieses Verteilungsmusters war ferner wesentlich für den Versuch einer Einordnung der hier beschriebenen Ganglienbefunde in ein entweder zentripetales oder zentrifugales Geschehen. So kann vermutet werden, dass im Rahmen des speziesübergreifenden Typ 1/2-Konzepts von TSE auch bei den sporadischen CJD nur der Typ 2-Erreger zur Propagation durch das intestinale LRS befähigt ist. Im Rahmen dieser Hypothese müssten alle ausschließlich von einem solchen Erregerstamm befallenen Ganglien auf zentripetalem Weg erreicht worden sein. Dies betrifft also das *Ggl. nodosum* sowie die sympathischen Organe. In diesem Kontext kann nun schließlich ein enteraler Beginn der Pathologie diskutiert werden.

### 6 Literaturverzeichnis

Akowitz A, Sklaviadis T, Manuelidis EE, Manuelidis L (1990): Nuclease-resistant polyadenylated RNAs of significant size are detected by PCR in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. Microb Pathog <u>9</u>, 33–45

- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature 214, 764–766
- Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen J-M, Lantier F (2000): Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. J Gen Virol <u>81</u>, 3115–3126
- Andréoletti O, Berthon P, Levavasseur E, Marc D, Lantier F, Monks E, Elsen J-M, Schelcher F (2002): Phenotyping of protein-prion (PrPsc)-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 50, 1357–1370
- Baldauf E, Beekes M, Diringer H (1997): Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. J Gen Virol <u>78</u>, 1187–1197
- Bartz JC, Aiken JM, Bessen RA (2004): Delay in onset of prior disease for the HY strain of transmissible mink encephalopathy as a result of prior peripheral inoculation with the replication-deficient DY strain. J Gen Virol 85, 265–273
- Bartz JC, Dejoia C, Tucker T, Kincaid AE, Bessen RA (2005): Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection. J Virol <u>79</u>, 11858–11863
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986): Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell <u>46</u>, 417–428
- Beekes M, McBride PA (2000): Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. Neurosci Lett <u>278</u>, 181–184
- Beekes M, Baldauf E, Diringer H (1996): Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. J Gen Virol <u>77</u>, 1925–1934
- Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998): Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. J Gen Virol <u>79</u>, 601–607
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC (1992): Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. Neurology 42, 149–156
- Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, Regli F, Rabinowicz T, Gajdusek DC, Gibbs CJ (1977): Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. Lancet 1, 478–479
- Besnoit C, Morel C (1898): Note sur les lésions nerveuses da la tremblante du mouton. Rev Med Vet (Toulouse) <u>23</u>, 397–400

Bessen RA, Marsh RF (1992a): Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. J Virol <u>66</u>, 2096–2101

- Bessen RA, Marsh RF (1992b): Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. J Gen Virol <u>73</u>, 329–334
- Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B (1995): Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. Nature 375, 698–700
- Biacabe A-G, Laplanche J-L, Ryder S, Baron T (2004): Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. EMBO Rep <u>5</u>, 110–115
- Blättler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtländer T, Weissmann C, Aguzzi A (1997): PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. Nature 389, 69–73
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982): Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. Science <u>218</u>, 1309–1311
- Borchelt DR, Koliatsos VE, Guarnieri M, Pardo CA, Sisodia SS, Price DL (1994): Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. J Biol Chem <u>269</u>, 14711–14714
- Braak H, Ludolph AC, Neumann M, Ravits J, Del Tredici K (2017): Pathological TDP-43 changes in Betz cells differ from those in bulbar and spinal α-motoneurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol (Berl) 133, 79–90
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996a): Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. Nature 379, 339–343
- Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blättler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A (1996b): Normal host prion protein (PrPc) is required for scrapie spread within the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A <u>93</u>, 13148–13151
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997a): Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. Exp Neurol 146, 104–112
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W et al. (1997b): The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature 390, 684–687
- Brown P, Gibbs CJ, Amyx HL, Kingsbury DT, Rohwer RG, Sulima MP, Gajdusek DC (1982): Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob disease virus. N Engl J Med 306, 1279–1282
- Brown P, Goldfarb LG, Gajdusek DC (1991): The new biology of spongiform encephalopathy: infectious amyloidoses with a genetic twist. Lancet 337, 1019–1022
- Brown P, Cervenáková L, Goldfarb LG, McCombie WR, Rubenstein R, Will RG, Pocchiari M, Martinez-Lage JF, Scalici C, Masullo C (1994): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine. Neurology <u>44</u>, 291–293
- Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I, Fletcher A, Will RG, Pocchiari M, Cashman NR et al. (2000): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. Neurology <u>55</u>, 1075–1081

Bruce ME, Dickinson AG (1987): Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. J Gen Virol <u>68</u>, 79–89

- Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG (1991): The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. J Gen Virol <u>72</u>, 595–603
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C et al. (1997): Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. Nature 389, 498–501
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992): Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature <u>356</u>, 577–582
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell <u>73</u>, 1339–1347
- Buyukmihci N, Rorvik M, Marsh RF (1980): Replication of the scrapie agent in ocular neural tissues. Proc Natl Acad Sci U S A <u>77</u>, 1169–1171
- Carp RI (1982): Transmission of scrapie by oral route: effect of gingival scarification. Lancet 1, 170–171
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M (2004): Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3065–3070
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE (1990): Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. Cell <u>61</u>, 185–192
- Cassirer R (1898): Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomische und bakterielle Untersuchung. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med <u>153</u>, 89–110
- Caughey B, Kocisko DA, Raymond GJ, Lansbury PT (1995): Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. Chem Biol <u>2</u>, 807–817
- Collinge J (2010): Medicine. Prion strain mutation and selection. Science 328, 1111–1112
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ (1991): Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 337, 1441–1442
- Come JH, Fraser PE, Lansbury PT (1993): A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. Proc Natl Acad Sci U S A <u>90</u>, 5959–5963
- Costanzo M, Zurzolo C (2013): The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. Biochem J <u>452</u>, 1–17
- Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (Vorläufige Mitteilung). Z Ges Neurol Psychiatr <u>57</u>, 1–18
- Cuillé J, Chelle P-L (1938): La tremblante du mouton est bien inoculable. C R Acad Sci Paris <u>206</u>, 78–79

DeJoia C, Moreaux B, O'Connell K, Bessen RA (2006): Prion infection of oral and nasal mucosa. J Virol <u>80</u>, 4546–4556

- Delasnerie-Laupretre N, Poser S, Pocchiari M, Wientjens DP, Will R (1995): Creutzfeldt-Jakob disease in Europe. Lancet 346, 898
- Deslys JP, Marcé D, Dormont D (1994): Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. J Gen Virol <u>75</u>, 23–27
- Dickinson AG, Outram GW (1988): Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. Ciba Found Symp <u>135</u>, 63–83
- Diener TO, McKinley MP, Prusiner SB (1982): Viroids and prions. Proc Natl Acad Sci U S A <u>79</u>, 5220–5224
- Diringer H, Braig HR, Czub M (1988): Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. Ciba Found Symp <u>135</u>, 135–145
- Diringer H, Beekes M, Oberdieck U (1994): The nature of the scrapie agent: the virus theory. Ann N Y Acad Sci <u>724</u>, 246–258
- Dodelet VC, Cashman NR (1998): Prion protein expression in human leukocyte differentiation. Blood <u>91</u>, 1556–1561
- Duguid JR, Dinauer MC (1990): Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res <u>18</u>, 2789–2792
- Duguid JR, Rohwer RG, Seed B (1988): Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. Proc Natl Acad Sci U S A <u>85</u>, 5738–5742
- Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A (1989): Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. Biochemistry 28, 8380–8388
- Fraser H, Dickinson AG (1970): Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. Nature <u>226</u>, 462–463
- Fraser H, Dickinson AG (1973): Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. J Comp Pathol <u>83</u>, 29–40
- Gajdusek DC: Infectious amyloids: subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloidoses. In: Fields DN, Knipe DM, Howley PM (Hrsg.): Fields Virology. Band 2; 3. Auflage; Lippincott Raven, Philadelphia 1996, 2851–2900
- Gajdusek DC, Zigas V (1957): Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. N Engl J Med <u>257</u>, 974–978
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966): Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. Nature <u>209</u>, 794–796
- German TL, McMillan BC, Castle BE, Dees C, Wade WF, Marsh RF (1985): Comparison of RNA from healthy and scrapie-infected hamster brain. J Gen Virol <u>66</u>, 839–844
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I (1936): Über eine eigenartige hereditär- familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. Z Ges Neurol Psychiatr <u>154</u>, 736–762

Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968): Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. Science 161, 388–389

- Gibbs CJ, Gajdusek DC, Latarjet R (1978): Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. Proc Natl Acad Sci U S A <u>75</u>, 6268–6270
- Gibbs CJ, Asher DM, Kobrine A, Amyx HL, Sulima MP, Gajdusek DC (1994): Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>57</u>, 757–758
- Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, Boyes L, Linehan J, Simmons M, Webb P, Bellerby P et al. (2013): Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. BMJ 347, f5675
- Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A (2001): Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. Neuron <u>31</u>, 25–34
- Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A (2003): Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. N Engl J Med 349, 1812–1820
- Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW (1992): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. Science <u>258</u>, 806–808
- Groschup Martin H, Weiland F, Straub OC, Pfaff E (1996): Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. Neurobiol Dis <u>3</u>, 191–195
- Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Hardt M, Hainfellner JA, Budka H (1999): Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. Acta Neuropathol (Berl) <u>98</u>, 453–457
- Guiroy DC, Shankar SK, Gibbs CJ, Messenheimer JA, Das S, Gajdusek DC (1989): Neuronal degeneration and neurofilament accumulation in the trigeminal ganglia in Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol <u>25</u>, 102–106
- Hadlow WJ (1959): Scrapie and Kuru. Lancet 274, 289-290
- Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, Privat N, Kemeny J-L, Perret-Liaudet A, Hauw J-J (2003): The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. Nat Med 9, 1121–1123
- Hainfellner JA, Budka H (1999): Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. Acta Neuropathol (Berl) <u>98</u>, 458–460
- Hartsough GR, Burger D (1965): Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. J Infect Dis <u>115</u>, 387–392
- Head MW, Ritchie D, Smith N, McLoughlin V, Nailon W, Samad S, Masson S, Bishop M, McCardle L, Ironside JW (2004): Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease. Am J Pathol <u>164</u>, 143–153
- Herms JW, Kretzschmar H: Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrPc als kupferbindendes Protein an der Synapse. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 74–80

Herzog C, Salès N, Etchegaray N, Charbonnier A, Freire S, Dormont D, Deslys J-P, Lasmézas CI (2004): Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. Lancet 363, 422-428

- Herzog C, Rivière J, Lescoutra-Etchegaray N, Charbonnier A, Leblanc V, Salès N, Deslys J-P, Lasmézas CI (2005): PrP<sup>TSE</sup> distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. J Virol <u>79</u>, 14339–14345
- Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997): Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. Lancet 349, 99–100
- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M et al. (1999): Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. Lancet 353, 183–189
- Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J (1998): Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 352, 703–704
- Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH (2007): Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. J Gen Virol 88, 1048–1055
- Holznagel E, Yutzy B, Kruip C, Bierke P, Schulz-Schaeffer W, Löwer J (2015): Foodborne-transmitted prions from the brain of cows with bovine spongiform encephalopathy ascend in afferent neurons to the simian central nervous system and spread to tonsils and spleen at a late stage of the incubation period. J Infect Dis 212, 1459–1468
- Ingrosso L, Pisani F, Pocchiari M (1999): Transmission of the 263K scrapie strain by the dental route. J Gen Virol <u>80</u>, 3043–3047
- Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Z Ges Neurol Psychiatr <u>64</u>, 132–146
- Jarrett JT, Lansbury PT (1993): Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell 73, 1055–1058
- Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I, González L (2001): Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. J Comp Pathol <u>125</u>, 48–57
- Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JDF, Collinge J (2005): High levels of disease related prion protein in the ileum in variant Creutzfeldt-Jakob disease. Gut <u>54</u>, 1506–1508
- Kaatz M, Fast C, Ziegler U, Balkema-Buschmann A, Hammerschmidt B, Keller M, Oelschlegel A, McIntyre L, Groschup MH (2012): Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. Am J Pathol 181, 515–524
- Kellings K, Meyer N, Mirenda C, Prusiner SB, Riesner D (1992): Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. J Gen Virol 73, 1025–1029
- Kimberlin RH, Walker CA (1980): Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. J Gen Virol <u>51</u>, 183–187
- Kimberlin RH, Walker CA (1989): Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. Virus Res 12, 213–220

Kimberlin RH, Hall SM, Walker CA (1983a): Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. J Neurol Sci <u>61</u>, 315–325

- Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA (1983b): Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. J Gen Virol <u>64</u>, 713–716
- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA (1987): Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. J Gen Virol <u>68</u>, 1875–1881
- Kincaid AE, Bartz JC (2007): The nasal cavity is a route for prion infection in hamsters. J Virol <u>81</u>, 4482–4491
- Kitamoto T, Mohri S, Tateishi J (1989): Organ distribution of proteinase-resistant prion protein in humans and mice with Creutzfeldt-Jakob disease. J Gen Virol <u>70</u>, 3371–3379
- Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991): Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. J Virol 65, 6292–6295
- Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V (1959): Pathology of Kuru. Lab Invest 8, 799-847
- Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1997): A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. Nature 390, 687–690
- Knight R (2000): Therapeutic possibilities in CJD: patents 1996 1999. Expert Opin Ther Pat 10, 49–57
- Kretzschmar H: Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 207–224
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ (1986): Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. Am J Pathol <u>122</u>, 1–5
- Kretzschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J (1996): Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol <u>53</u>, 913–920
- Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lugan S, Corbière F, Cassard H, Costes P, Bergonier D et al. (2008): Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. PLoS Pathog 4, e1000238
- Lang CJ, Heckmann JG, Neundörfer B (1998): Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. J Neurol Sci <u>160</u>, 128–139
- Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alpérovitch A, Launay JM (1994): Molecular genetics of prion diseases in France. French research group on epidemiology of human spongiform encephalopathies. Neurology 44, 2347–2351
- Lasmézas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Locht C, Dormont D (1996): Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. J Virol <u>70</u>, 1292–1295
- Lee C-CM, Kuo LT, Wang CH, Scaravilli F, An SF (2005): Accumulation of prion protein in the peripheral nervous system in human prion diseases. J Neuropathol Exp Neurol <u>64</u>, 716–721

Lee S-J, Desplats P, Sigurdson C, Tsigelny I, Masliah E (2010): Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. Nat Rev Neurol <u>6</u>, 702–706

- Leopoldt JG: Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirtschaft. Rothe, Sorau 1750
- Liu B, Fang F, Pedersen NL, Tillander A, Ludvigsson JF, Ekbom A, Svenningsson P, Chen H, Wirdefeldt K (2017): Vagotomy and Parkinson disease: a Swedish register-based matchedcohort study. Neurology <u>88</u>, 1996–2002
- Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P (1986): Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. N Engl J Med 315, 997–1003
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994): 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. Mol Neurobiol 8, 121–127
- Manuelidis EE, Angelo JN, Gorgacz EJ, Kim JH, Manuelidis L (1977): Experimental Creutzfeldt-Jakob disease transmitted via the eye with infected cornea. N Engl J Med <u>296</u>, 1334–1336
- Manuelidis L (1994): Dementias, neurodegeneration, and viral mechanisms of disease from the perspective of human transmissible encephalopathies. Ann N Y Acad Sci <u>724</u>, 259–281
- Masters CL, Richardson EP (1978): Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. Brain 101, 333–344
- Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Bernoulli C, Asher DM (1979): Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. Ann Neurol <u>5</u>, 177–188
- Masujin K, Matthews D, Wells GAH, Mohri S, Yokoyama T (2007): Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. J Gen Virol <u>88</u>, 1850–1858
- Mathews JD, Glasse R, Lindenbaum S (1968): Kuru and cannibalism. Lancet 2, 449-452
- McBride PA, Beekes M (1999): Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. Neurosci Lett <u>265</u>, 135–138
- McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001): Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. J Virol <u>75</u>, 9320–9327
- McGowan JP (1922): Scrapie in sheep. Scottish J Agric 5, 365–375
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. Cell <u>35</u>, 57–62
- McKinley MP, Braunfeld MB, Bellinger CG, Prusiner SB (1986): Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. J Infect Dis <u>154</u>, 110–120
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW et al. (2004): Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. Am J Pathol 165, 227–235
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K (1981): Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. Acta Neuropathol (Berl) <u>54</u>, 63–74

Meyer N, Rosenbaum V, Schmidt B, Gilles K, Mirenda C, Groth D, Prusiner SB, Riesner D (1991): Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. J Gen Virol 72, 37–49

- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986): Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A <u>83</u>, 2310–2314
- Mok T, Jaunmuktane Z, Joiner S, Campbell T, Morgan C, Wakerley B, Golestani F, Rudge P, Mead S, Jäger HR et al. (2017): Variant Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with heterozygosity at PRNP codon 129. N Engl J Med <u>376</u>, 292-294
- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995): Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. Neuron <u>14</u>, 509–517
- Moya KL, Hässig R, Créminon C, Laffont I, Di Giamberardino L (2004): Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. J Neurochem <u>88</u>, 155–160
- Mumenthaler M, Mattle H: Erkrankungen durch Prionen. In: Neurologie. Thieme, Stuttgart 2008, 103–106
- Murdoch GH, Sklaviadis T, Manuelidis EE, Manuelidis L (1990): Potential retroviral RNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. J Virol <u>64</u>, 1477–1486
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell <u>40</u>, 735–746
- Oesch B, Groth DF, Prusiner SB, Weissmann C (1988): Search for a scrapie-specific nucleic acid: a progress report. Ciba Found Symp 135, 209–223
- O'Rourke KI, Huff TP, Leathers CW, Robinson MM, Gorham JR (1994): SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication. J Gen Virol <u>75</u>, 1511–1514
- Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991): Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Nature 352, 340–342
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A <u>90</u>, 10962–10966
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ et al. (1996): Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 39, 767–778
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P et al. (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. Ann Neurol <u>46</u>, 224–233
- Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW et al. (2000): Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A <u>97</u>, 10168–10172
- Parchi P, Strammiello R, Notari S, Giese A, Langeveld JPM, Ladogana A, Zerr I, Roncaroli F, Cras P, Ghetti B et al. (2009): Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPsc types: an updated classification. Acta Neuropathol (Berl) 118, 659–671

Pattison IH, Millson GC (1961): Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. J Comp Pathol <u>71</u>, 101–109

- Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA (1972): Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. Vet Rec <u>90</u>, 465–468
- Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA (1974): Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. Br Vet J 130, lxv–lxvii
- Pauly PC, Harris DA (1998): Copper stimulates endocytosis of the prion protein. J Biol Chem <u>273</u>, 33107–33110
- Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216, 136-144
- Prusiner SB (1991): Molecular biology of prion diseases. Science 252, 1515–1522
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. Cell <u>35</u>, 349–358
- Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L (1991): Genomic structure of the human prion protein gene. Am J Hum Genet <u>49</u>, 320–329
- Race B, Meade-White K, Oldstone MBA, Race R, Chesebro B (2008): Detection of prion infectivity in fat tissues of scrapie-infected mice. PLoS Pathog 4, e1000232
- Reuber M, Al-Din AS, Baborie A, Chakrabarty A (2001): New variant Creutzfeldt-Jakob disease presenting with loss of taste and smell. J Neurol Neurosurg Psychiatry 71, 412–413
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K (1996): NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). Nature 382, 180–182
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K (1997): NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). FEBS Lett <u>413</u>, 282–288
- Ritchie DL, Barria MA, Peden AH, Yull HM, Kirkpatrick J, Adlard P, Ironside JW, Head MW (2017): UK Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: investigating human prion transmission across genotypic barriers using human tissue-based and molecular approaches. Acta Neuropathol (Berl) 133, 579–595
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998): Eight prion strains have PrPsc molecules with different conformations. Nat Med 4, 1157–1165
- Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M, Pocchiari M (1994):
  Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jakob disease.
  Hum Genet <u>94</u>, 375–379
- Sbriccoli M, Cardone F, Valanzano A, Lu M, Graziano S, De Pascalis A, Ingrosso L, Zanusso G, Monaco S, Bentivoglio M et al. (2009): Neuroinvasion of the 263K scrapie strain after intranasal administration occurs through olfactory-unrelated pathways. Acta Neuropathol (Berl) 117, 175–184
- Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995): Prion protein gene variation among primates. J Mol Biol <u>245</u>, 362–374
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000): The paraffin-embedded tissue blot detects PrPsc early in the incubation time in prion diseases. Am J Pathol <u>156</u>, 51–56

Scott JR, Foster JD, Fraser H (1993): Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease. Vet Microbiol <u>34</u>, 305–309

- Seed CR, Hewitt PE, Dodd RY, Houston F, Cervenakova L (2018): Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion safety. Vox Sang 113, 220-231
- Shikiya RA, Langenfeld KA, Eckland TE, Trinh J, Holec SAM, Mathiason CK, Kincaid AE, Bartz JC (2017): PrPsc formation and clearance as determinants of prion tropism. PLoS Pathog 13, e1006298
- Sigurdson CJ, Williams ES, Miller MW, Spraker TR, O'Rourke KI, Hoover EA (1999): Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (Odocoileus hemionus). J Gen Virol <u>80</u>, 2757–2764
- Sigurdsson B (1954): Rida a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. Br Vet J <u>110</u>, 341–354
- Simmons MM, Moore SJ, Lockey R, Chaplin MJ, Konold T, Vickery C, Spiropoulos J (2015): Phenotype shift from atypical scrapie to CH1641 following experimental transmission in sheep. PloS One <u>10</u>, e0117063
- Smith JP, Burton GF, Tew JG, Szakal AK (1998): Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. Dev Immunol <u>6</u>, 285–294
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T (1986): Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A <u>83</u>, 7358–7362
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell <u>51</u>, 229–240
- Suardi S, Vimercati C, Casalone C, Gelmetti D, Corona C, Iulini B, Mazza M, Lombardi G, Moda F, Ruggerone M et al. (2012): Infectivity in skeletal muscle of cattle with atypical bovine spongiform encephalopathy. PloS One 7, e31449
- Tabaton M, Monaco S, Cordone MP, Colucci M, Giaccone G, Tagliavini F, Zanusso G (2004): Prion deposition in olfactory biopsy of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol <u>55</u>, 294–296
- Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Rossi G, Giaccone G, Farlow MR, Dlouhy SR, Ghetti B, Bugiani O, Frangione B (1994): Amyloid fibrils in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (Indiana and Swedish kindreds) express only PrP peptides encoded by the mutant allele. Cell <u>79</u>, 695–703
- Taylor DM (1999): Inactivation of prions by physical and chemical means. J Hosp Infect 43, 69-76
- Taylor DM, Fernie K, McConnell I, Steele PJ (1998): Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. Vet Microbiol <u>64</u>, 33–38
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996): Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. Science <u>274</u>, 2079–2082
- Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, Krüger D, Beekes M (2003): Widespread PrPsc accumulation in muscles of hamsters or ally infected with scrapie. EMBO Rep 4, 530–533

Torres J-M, Andréoletti O, Lacroux C, Prieto I, Lorenzo P, Larska M, Baron T, Espinosa J-C (2011): Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. Emerg Infect Dis <u>17</u>, 1636–1644

- van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP (1996): Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. J Clin Microbiol <u>34</u>, 1228–1231
- van Keulen LJM, Bossers A, van Zijderveld F (2008): TSE pathogenesis in cattle and sheep. Vet Res <u>39</u>, 24
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bähr M, Zerr I (2004): Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. Neurosci Lett 372, 146–150
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987): A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet Rec <u>121</u>, 419–420
- Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ, Dawson M (1998): Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. Vet Rec <u>142</u>, 103–106
- Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Schulze-Sturm U, Wemheuer WE, Hahmann U, Gawinecka J, Schütz E, Zerr I, Brenig B et al. (2009): Similarities between forms of sheep scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease are encoded by distinct prion types. Am J Pathol 175, 2566–2573
- Wemheuer WM, Wrede A, Schulz-Schaeffer WJ (2017): Types and strains: their essential role in understanding protein aggregation in neurodegenerative diseases. Front Aging Neurosci <u>9</u>, 187
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB (1988): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. Vet Rec <u>123</u>, 638–644
- Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ (1991): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. Vet Rec <u>128</u>, 199–203
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Estibeiro K, Cousens SN, Smith PG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 347, 921–925
- Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E, de Silva R, D'Alessandro M, Delasnerie-Laupretre N, Zerr I et al. (1998): Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU collaborative study group for CJD. Ann Neurol 43, 763–767
- Williams ES, Young S (1980): Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. J Wildl Dis <u>16</u>, 89–98
- Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC et al. (1996): Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. Hum Genet <u>98</u>, 259–264
- Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon T, Gruffydd-Jones TJ, Wells GAH (1990): Spongiform encephalopathy in a cat. Vet Rec <u>126</u>, 513

Zanusso G: Evidence from molecular strain typing. In: Chernoff YO (Hrsg.): Prion 2010 Meeting report. Landes Bioscience Intelligence Unit Series, Austin, TX 2010, 111

- Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, Farinazzo A, Gardiman M, Cavallaro T, Bentivoglio M et al. (2003): Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. N Engl J Med 348, 711–719
- Zeidler M, Stewart G, Cousens SN, Estibeiro K, Will RG (1997a): Codon 129 genotype and new variant CJD. Lancet 350, 668
- Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA et al. (1997b): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. Lancet 350, 903–907
- Zeidler M, Johnstone EC, Bamber RW, Dickens CM, Fisher CJ, Francis AF, Goldbeck R, Higgo R, Johnson-Sabine EC, Lodge GJ et al. (1997c): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. Lancet 350, 908–910
- Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RS, Bernheimer H, Cardone F, Delasnerie-Lauprêtre N, Cuadrado Corrales N et al. (2000): Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology <u>55</u>, 811–815

## Danksagung

Ich danke ganz herzlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer für die freundliche Überlassung des Themas und die konstruktive Betreuung der vorliegenden Arbeit, welche mir eine Begeisterung für die Thematik sowie einen kritischen Zugang zur Methodik vermittelte. Unsere zahlreichen differenzierten Diskussionen sowohl im Rahmen der Experimente als auch während des Korrekturprozesses nach Fertigstellung der ersten Schriftfassung der Arbeit waren für mich sehr lehrreich.

Besonderer Dank gilt außerdem Frau Tatjana Pfander, Frau Kerstin Brekerbohm und Frau Manuela Becker für ihre intensive und exzellente technische Unterstützung im Labor. Erstere vermittelten mir sämtliche relevanten Methoden und waren mir eine große Hilfe bei der Anfertigung der zahlreichen histologischen Schnitte. Frau Pfander begleitete mit großer Geduld und vielerlei Anregungen die lange Phase methodischer Experimente im Rahmen der Immunhistochemie. Nur durch die Mitarbeit von Frau Becker war die Aufnahme der Western-Blot-Methode in meine Arbeit möglich.

Ich danke ferner Herrn Dr. med. Arne Wrede für seine Unterstützung bei der Erstellung der mikroskopischen Bilder. Außerdem geht mein Dank an Frau Insa Dammann, die mir vielfach mit Ratschlägen und ihrer Erfahrung bei der Arbeit im Labor zur Seite stand.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und insbesondere auch ideelle Förderung in den vergangenen Jahren. Diese hat nicht nur mein Studium außerordentlich bereichert, sondern auch manche Weiche für meine berufliche Zukunft gestellt.

Abschließend möchte ich außerdem ganz besonders meinen Eltern, Anke und Dr. med. dent. Walter S. Hofmann, sowie meinem Großvater Walter Georg Hofmann danken, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben, und denen ich diese Arbeit widme.