

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

**Paraffin-embedded-tissue-blot-Analyse
des PrP^{sc}-Vorkommens im
lymphatischen Gewebe bei
sporadischer Creutzfeldt-Jakob-
Erkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Lena Jytte Cordes

aus

Oldenburg

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. W. J. Schulz-Schaeffer
Ko-Referent/in:	PD Dr. Felix Bremmer
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 18. August 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Paraffin-embedded-tissue-blot-Analyse des PrP^{sc}-Vorkommens im lymphatischen Gewebe bei sporadischer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 18. August 2021

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Prionerkrankungen	1
1.2 Das PrP ^c	2
1.2.1 Eigenschaften und Funktion des physiologischen Prionproteins	2
1.3 Die Prion-Protein-only-Hypothese	6
1.4 β -Konversion des physiologischen Prionproteins in die pathologische Isoform	7
1.5 Das PrP ^{sc}	8
1.5.1 Eigenschaften des pathologischen Prionproteins	8
1.5.2 Ablagerungsmuster des PrP ^{sc} im ZNS.....	8
1.5.3 PrP ^{sc} und das lymphatische System.....	9
1.6 Die Prionerkrankungen bei Menschen	9
1.6.1 Überblick über die Diagnostik und Therapie.....	10
1.6.2 Sporadische Prionerkrankungen	11
1.6.3 Erworbene Prionerkrankungen.....	15
1.7 Prionerkrankungen in Tieren.....	22
1.7.1 Die klassische Scrapie	22
1.7.2 Klassische Bovine Spongiforme Enzephalopathie	24
1.8 Ausbreitungswege nach sekundärem Kontakt mit humanen Prionerkrankungen auf Grundlage verschiedener Scrapie-Maus-Modelle.....	26
1.8.1 Sekundäre Übertragungsmöglichkeiten und Eintrittspforten	26
1.8.2 Von der oralen PrP ^{sc} -Aufnahme bis zur Neuroinvasion	27
1.9 Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Verwendete Gewebeproben	31
2.1.2 Verwendete Substanzen	35
2.1.3 Verwendete Geräte und Materialien.....	37
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Allgemeine Rezepte für die PET-Blot-Methode sowie für den immunhistochemischen Nachweis.....	38
2.2.2 Dekontamination, Formalinfixierung und Paraffineinbettung des sCJD- und iCJD-Gewebes als erhaltene Fremddienstleistung	40
2.2.3 Enzymfärbungen/Histochemische Färbungen	41
2.2.4 PET-Blot-Methode	42

2.2.5	Immunhistochemie	47
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Vorbereitung der PET-Blot-Auswertung mit Hilfe der HE-Übersichtsfärbung.....	50
3.1.1	Auswertung mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie	50
3.2	Detektion der PrP ^{sc} -Ablagerungen im LRS und in ausgewähltem peripherem Gewebe von sCJD-Fällen mit Hilfe der PET-Blot-Methode	51
3.2.1	Detektion von PrP ^{sc} -Ablagerungen im LRS von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers.....	51
3.2.2	Detektion von PrP ^{sc} -Ablagerungen in peripheren organischen Strukturen von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers.....	51
3.2.3	Detektion von PrP ^{sc} -Ablagerungen in der olfaktorischen Mukosa sowie in peripheren Nerven von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers	51
3.2.4	Zusammenfassung der Detektion von PrP ^{sc} -Ablagerungen im peripheren Gewebe der sCJD-Fälle mittels der PET-Blot-Methode.....	54
3.3	Differenzierung von Hintergrundreaktionen im Rahmen der PET-Blot-Methode von spezifischen PrP ^{sc} -Ablagerungsmustern bei sCJD-Patienten.....	55
3.3.1	Differenzierung der „Sternenhimmel“-Hintergrundreaktion des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode bei sCJD-Patienten	55
3.3.2	Bestätigung weiterer nichtspezifischer Farbsignale mittels des 12F10-Prionantikörpers durch den 3F4-Prionantikörper im Rahmen der PET-Blot-Methode.....	57
3.4	Detektion der PrP ^{sc} -Ablagerungen im LRS und in weiteren peripheren Geweben mit Hilfe der PET-Blot-Methode im Kontrollgewebe.....	61
3.4.1	PrP ^{sc} -Detektion in humanen Gewebeproben als Negativkontrollkollektiv.....	61
3.4.2	PrP ^{sc} -Detektion in klassischen Scrapie-Gewebeproben als Positivkontrollkollektiv	62
3.5	Zusammenfassung der PrP ^{sc} -Detektion im LRS von sCJD-Fällen im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen und der klassischen Scrapie mit Hilfe der PET-Blot-Methode	64
4	Diskussion.....	66
4.1	Die Gründe für die Durchführung der vorliegenden Untersuchung.....	66
4.2	Kritische Auseinandersetzung mit Untersuchungsmaterial und Untersuchungsmethoden dieser Arbeit	68
4.2.1	Untersuchungsmaterial.....	68
4.2.2	Untersuchungsmethode.....	69
4.3	Einordnung in die inhaltliche Diskussion	71
4.3.1	Die humanen Prionerkrankungen und das lymphatische System	71
4.3.2	PrP ^{sc} und die Transmission via nasaler/oraler Mukosa oder via Blutbahn	77
4.3.3	Vergleich der erworbenen Prionerkrankungen in Bezug auf Klinik, Erregerstamm und Transmissioneigenschaften	78
4.4	Offene Fragen und Ausblick	84
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literaturverzeichnis	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: sCJD: Definitive und wahrscheinliche Fälle im Zeitraum von 1993 bis 2013 weltweit und in Großbritannien	12
Abbildung 2: iCJD: Todeszahlen definitiver und wahrscheinlicher Fälle im UK zwischen 1990 und 2018.....	17
Abbildung 3: vCJD - Todeszahlen zwischen 1990 und 2018 im UK, weltweit und in der Gesamtzahl	19
Abbildung 4: Paraffineinbettung.....	40
Abbildung 5: Übersichtsfärbung Hämatoxylin/ Eosin	41
Abbildung 6: Positiver PrP ^{sc} -Nachweis mittels der PET-Blot-Methode und dem 12F10-Prionantikörper	52
Abbildung 7: Vergleich der PET-Blot-Färbungen des N. ischiadicus mit dem 12F10-Antikörper, dem 3F4-Antikörper und dem ICSM-18-Antikörper	53
Abbildung 8: Vergleich der PET-Blot-Färbungen der olfaktorischen Mukosa mit dem 12F10-Antikörper, dem 3F4-Antikörper und dem ICSM-18-Antikörper	53
Abbildung 9: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode.....	56
Abbildung 10: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers sowie des 3F4-Antikörpers mit im Gewebe verbliebenen Formalinpigmenten.....	58
Abbildung 11: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers im Vergleich zum negativen Ergebnis der Re-Färbung des gleichen Gewebes mit dem 3F4-Antikörper.	59
Abbildung 12: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers mit dem Drüsenepithel im Vergleich zum negativen Ergebnis nach Re-Färbung des gleichen Gewebes mit dem 3F4-Antikörper.....	60
Abbildung 13: Negatives Ergebnis der PET-Blot-Färbung mit dem 12F10-Antikörper des Lymphknotengewebes eines Alzheimer-Patienten.....	61
Abbildung 14: Positiver PrP ^{sc} -Nachweis im LRS von klassischer Scrapie-Schafen.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung und Anzahl der verwendeten sCJD-Fälle.....	32
Tabelle 2: Anzahl, Genotyp und Priontyp der hier verwendeten sCJD-Gewebetypen	33
Tabelle 3: Überblick über Diagnose, Genotyp und Anzahl der Gewebearten der verwendeten humanen Negativkontrollfälle	34
Tabelle 4: Überblick über Anzahl, Genotyp, Geschlecht und Gewebetypen, der hier verwendeten klassischen Scrapie-Gewebe	35
Tabelle 5: Verwendete Substanzen und ihre Herkunft.....	35
Tabelle 6: Verwendete(s) Geräte/Material inkl. Hersteller	37
Tabelle 7: Allgemeine Rezepte.....	39
Tabelle 8: Im Rahmen der PET-Blot-Methode verwendete Primärantikörper zum humanen PrP-Nachweis	42
Tabelle 9: Im Rahmen der PET-Blot-Methode verwendeter Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 10: Quantitative Auswertung der PrP ^{sc} -Ablagerungen im LRS bzw. außerhalb des LRS mit Hilfe der PET-Blot-Methode.....	46
Tabelle 11: Semiquantitative Auswertung der als positiv gewerteten PrP ^{sc} -Ablagerungen mit Hilfe der PET-Blot-Methode.....	47
Tabelle 12: Für den immunhistochemischen Nachweis verwendeter humaner Primärantikörper.....	47
Tabelle 13: Für den immunhistochemischen Nachweis verwendeter Sekundärantikörper.....	47
Tabelle 14: Überblick über die mittels der PET-Blot-Methode als positiv gewerteten sCJD-Fälle und ihre Ergebnisse.....	54
Tabelle 15: Überblick über die ausgewählten Gewebetypen zur Untersuchung der Kreuzreaktion des 12F10-Prionantikörpers inkl. Ergebnis und Schlussfolgerung	57
Tabelle 16: Vergleich der Sekundärkontrolle mittels des 3F4-Antikörpers zu ausgewählten nichtspezifischen Farbsignalen im Lymphfollikel mittels des 12F10-Antikörpers.....	58
Tabelle 17: Überblick über die Sekundärkontrolle mittels des 3F4 ausgewählter nichtspezifischer Farbsignale mittels des 12F10 innerhalb eines Lymphfollikels, welche als Kreuzreaktion gewertet wurden.....	59
Tabelle 18: Kontrolle weiterer nichtspezifischer Farbsignale des 12F10 mittels des 3F4, welche als nichtspezifisch bzw. negativ gewertet wurden.....	60
Tabelle 19: Überblick über die verwendeten Gewebetypen der klassischen Scrapie in Schafen und die semiquantitative Auswertung der PrP ^{sc} -Ablagerungen.....	64
Tabelle 20: PrP ^{sc} -Ablagerungen im LRS und in weiteren ausgewählten peripheren Geweben in sCJD-Fällen im Vgl. zur klassischen Scrapie, iatrogener sCJD, neurodegenerativen Erkrankungen mit Hilfe der PET-Blot-Methode (Prionantikörper 12F10, 3F4, ICSM-18).....	65

Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>alzheimer's disease</i>
ADV	<i>aleutian mink disease parvovirus</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BASE	<i>bovine amyloidotic spongiform encephalopathy</i>
BCIP	Brom-4-chlor-3-inoxylphosphat
BSE	<i>bovine spongiform encephalopathy</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBD	corticobasale Degeneration
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CWD	<i>chronic wasting disease</i>
DLB	<i>dementia with lewy bodies</i>
DMFA	Dimethylformamid
DWI	<i>diffusion weighted imaging</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
FAE	follikelassoziertes Epithel
FDC/FDCs	follikuläre dendritische Zelle/Zellen
FFI	<i>fatal familial insomnia</i>
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i>
FSE	feline spongiforme Enzephalopathie
FTD	frontotemporale Demenz
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GdnSCN	Guanidinthiocyanat
Gl.	Glandula
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI-Virus	<i>human immunodeficiency virus</i>
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

ILF	isolierte Lymphfollikel
LK	Lymphknoten
LRP/LR	Lamininrezeptor
LRS	lymphatisch-retikuläres System
LTbetaR	<i>lymphotoxin beta receptor</i>
M	Methionin
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MBM	<i>meat and bone meal</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MNP	mononukleäre Phagozyten
MRT	Magnetresonanztomographie
<i>MTMR7</i>	<i>myotubularin related protein 7</i>
MZ	Marginalzone
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
N-CAM	<i>nerve cell adhesion molecule</i>
NCJDRSU	The National CJD Research & Surveillance Unit
NS	Nervensystem
NTM	Natrium-Tris-Magnesium-Puffer
PAF	Paraformaldehyd
PALS	periarteriöläre lymphatische Scheide
PAS	<i>periodic acid-schiff reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PET-Blot	<i>paraffin-embedded-tissue-blot</i>
<i>PLCXD3</i>	<i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3</i>
PMCA	<i>protein misfolding cyclic amplification</i>
POX	Streptavidin-Peroxidase
Prion	<i>proteinaceous infectious particle</i>
PRNP	Prionprotein
PrP ^c	physiologische Isoform des Prionproteins
PrP ^{sc}	pathologische Isoform des Prionproteins
PSWC	<i>periodic short wave complexes</i>
RT-QuIC	<i>real-time quaking induced conversion</i>
sCJD	sporadische Creutzfeld-Jakob-Erkrankung

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBM	<i>tingible body macrophages</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered-saline + Tween</i>
term.	terminal
TME	<i>transmissible mink encephalopathy</i>
TNFR1	<i>tumor-necrosis-factor-receptor-1</i>
TNT	<i>tunneling nanotubes</i>
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
UBFT	Untersuchung-Behandlung-Forschung-Therapie
V	Valin
vCJD	variante Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
VPSPr	<i>variably protease-sensitive prionopathy</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Prionerkrankungen

Die Prionerkrankungen werden aufgrund ihrer Klinik zu den tödlichen neurodegenerativen Erkrankungen gezählt. Wichtige Faktoren, die sie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen unterscheiden sind, dass sie nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Tieren auftreten sowie die Übertragbarkeit zwischen den Menschen und von Tieren auf den Menschen. Ursächlich für die Erkrankung ist ein infektiöses Agens, welches ein fehlgefaltetes Protein beinhaltet oder allein aus diesem besteht. Dieses proteinhaltige, infektiöse Agens wird als ‚Prion‘ (*Proteinaceous infectious particle*) bezeichnet. Der Begriff wurde in den achtziger Jahren von Stanley B. Prusiner eingeführt (Prusiner 1982). Er entstand als Abgrenzung zu bisher bekannten infektiösen Organismen wie Viren, Bakterien, Viroiden, Pilzen sowie Parasiten und beschreibt einen bisher völlig unbekanntem Charakter bezüglich der Übertragung von Krankheiten (Prusiner 1982). Die daraufhin aufgestellte Prionhypothese versucht zu erklären, warum ein Protein alleine infektiös wirken und verschiedene Phänotypen hervorrufen kann (Griffith 1967; Prusiner 1982). Zu den tierischen Prionerkrankungen zählt die Scrapie in Schafen sowie die Traberkrankheit der Schafe und Ziegen, die chronische Auszehrungskrankheit der Hirsche (CWD), die Bovine Spongiforme Enzephalopathie in Rindern (BSE), die übertragbare Hirndegeneration der Nerze (TME), die schwammartige Hirndegeneration der Katzen (FSE) sowie die spongiforme Enzephalopathie von Zootieren (Jeffrey und Wells 1988, Kirkwood et al. 1990). Die menschlichen Prionerkrankungen werden in erbliche, sporadische und erworbene Formen unterteilt. Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die letale familiäre Schlaflosigkeit (FFI) und die familiäre Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung werden den erblichen Formen zugeordnet, wohingegen die sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (sCJD), die sporadische Form der FFI sowie die variable proteasesensible Prionopathie (VPSP) (Gambetti et al. 2008) unter den sporadischen Formen subsumiert werden. Kuru, die iatrogene CJD (iCJD) und auch die in den neunziger Jahren vor allem in Großbritannien neu aufgetretene Form, die Variante der CJD (vCJD), werden zu den erworbenen Formen dieser neurodegenerativen Erkrankung gezählt. Ursächlich ist ihnen allen das ‚Prion‘. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer phänotypischen Ausprägung u. a. bezüglich ihrer Pathogenese, ihrer Inkubationszeit oder der Dauer ihrer Erkrankung. Das sogenannte Prionprotein kann in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen. Zum einen kommt es physiologisch in Lebewesen in verschiedenen zellulären Bestandteilen vor und wird als PrP^c bezeichnet. Als pathologische Prionproteinisoform PrP^{sc} liegt dieses bei den oben genannten Erkrankungen in einer anderen Konformation vor. Diese Konformationsänderung wird auch für die Pathogenität und Infektiösität verantwortlich gemacht. Sie kann nach sekundärer Übertragung, spontan oder durch eine Mutation induziert werden

und bewirkt dann über eine Protein-Protein-Interaktion die Konversion des PrP^c in das PrP^{sc} (Brown und Mastrianni 2010). Aufgrund der natürlichen und experimentellen Übertragungsmöglichkeit und ihrer Neuropathologie werden die Prionerkrankungen in der Fachliteratur auch als Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) bezeichnet. Das Auftreten einer bisher unbekannt Form, der varianten Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, in der Mitte der 1990iger Jahren vor allem in Großbritannien, hat eine beunruhigende Vermutung nach sich gezogen, denn der gleiche Prionerregerstamm, der für die BSE-Erkrankung verantwortlich ist, ist auch für diese neue Form ursächlich (Collinge et al. 1996). Dies deutet darauf hin, dass die vCJD-Patienten mit dem PrP^{sc} der BSE-Erkrankung in Kontakt gekommen sein müssen und sich so infiziert haben. Doch wie groß die Prävalenz in Großbritannien und auch in anderen Ländern tatsächlich ist, kann nur abgeschätzt werden. Die Gefahr besteht jedoch, dass die stummen Träger andere über Blutprodukte, Organspenden oder fehlerhaft desinfiziertes medizinisches Material infizieren können und so eine ungeahnte Anzahl von Patienten in den kommenden Jahrzehnten Behandlung ersuchen könnten. Deswegen ist es von großer Bedeutung, diese stummen Träger frühzeitig zu identifizieren, die entsprechenden Hygienemaßnahmen zu beachten, sie von Blut- und Organspenden auszuschließen und so die Prävalenz dieser Erkrankung so gering wie möglich zu halten. Um sie identifizieren zu können, ist jedoch das Verständnis der Charakteristika des PrP^{sc}, der Pathogenese, der Infektionswege sowie der Ausbreitungswege im menschlichen und tierischen Körper von großer Bedeutung. Des Weiteren wirft die Prionforschung ein neues Licht auf andere neurodegenerative Erkrankungen wie den Morbus Alzheimer oder den Morbus Parkinson, denn auch hier sind fehlgefaltete und aggregierte Proteine Ursache der Erkrankungen. Auch bezüglich der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus wird eine pathophysiologische Assoziation mit pathologisch aggregierenden Proteinen vermutet - ein grundlegender Beweis hierfür steht jedoch noch aus. Dies führte zu dem Überbegriff der Proteinaggregationskrankheiten für über 20 verschiedene Erkrankungen, u. a. auch für die oben genannten (Soto 2001, Chiti und Dobson 2006). Ob Ähnlichkeiten in den Ursachen, der Pathogenese oder der Infektiosität bestehen, ist noch Gegenstand der Forschung.

1.2 Das PrP^c

Die Abkürzung PrP^c steht für die zelluläre, physiologische Isoform des Prionproteins (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986). Seine Bedeutung, Funktion und Eigenschaften werden im Folgenden erläutert und in Kapitel 1.5 in Kontrast zu der pathologischen Isoform, dem PrP^{sc}, gestellt.

1.2.1 Eigenschaften und Funktion des physiologischen Prionproteins

1.2.1.1 Primär- und Sekundärstruktur des PrP^c

Bei dem Prionprotein handelt es sich um ein Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankertes Sialoglykoprotein, das mit Hilfe des GPI-Ankers auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (Stahl

et al. 1987). Dieses PrP^c ist sensitiv gegenüber dem Proteinase-K-Verdau (Oesch et al. 1985), wird durch diese Behandlung zu Oligopeptiden verdaut (McKinley et al. 1983), ist nicht aggregationsfähig (Meyer et al. 1986), jedoch in Detergenzien löslich (Meyer et al. 1986; Oesch et al. 1985). Die für das Prionprotein codierende Sequenz, das *PRNP*-Gen, wurde im menschlichen Genom dem Exon II des kurzen Arms des Chromosoms 20 zugeordnet (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986). Über Speziesgrenzen hinweg zeigt die Prionproteingenesequenz eine ähnliche Lokalisation und eine starke Konservierung (Oesch et al. 1985, Westaway und Prusiner 1986), sodass die Ergebnisse der molekularen Analyse der Genome und ihres Prionproteins von Mäusen oder Hamstern auf den Menschen und andere Säugetiere übertragen werden können, da diese bis zu 90% identisch sind. Das PrP^c in Mäusen zeigt eine glykosylierte 208 Aminosäuren lange Primärstruktur (Schätzl et al. 1995). In der C-terminalen Domäne finden sich im Bereich der zweiten und dritten Helix zwei N-Glykosylierungen (humPrP N181, humPrP N197 und ovPrP N184, ovPrP N200) (Schätzl 2007), sodass das Prionprotein konsekutiv unglykosyliert, monoglykosyliert und diglykosyliert vorliegen kann. Die Sekundärstruktur des PrP^c zeigt zusammenfassend größtenteils eine räumliche Anordnung aus drei alpha-Helices und zwei antiparallelen beta-Faltblättern (Riek et al. 1996, Zahn et al. 2000, Pérez et al. 2010). Insgesamt nehmen drei alpha-Helices 45% des strukturierten Anteils des C-Terminus des PrP^c ein.

1.2.1.2 Die Synthese und Mobilität des PrP^c

Das *PRNP*-Gen codiert für ein 253 Aminosäuren langes Vorläufer-Protein (Basler et al. 1986). Das PrP^c wird innerhalb von 20 Minuten synthetisiert, an die Zelloberfläche transportiert und besitzt eine Halbwertszeit von sechs Stunden (Borchelt et al. 1990). Posttranslational wird dieses dann zahlreich modifiziert, u. a. wird ein Phosphatidylinositolglykolipid-Anker angehängt, der an der Zelloberfläche adheriert (Stahl et al. 1987; Stahl und Prusiner 1991; Stahl et al. 1992) und sich in sogenannten Lipidrafts befindet. Das Prionprotein ist jedoch kein stationäres Protein, sondern zeigt eine Mobilität zwischen verschiedenen Zellkompartimenten. Es kann über den sogenannten Lamininrezeptor (LRP/LR) internalisiert werden (Gauczynski et al. 2001), tritt über sogenannte Clathrin-coatedpits in den Kreislauf der Endozytose und Wiederverwertung ein (Shyng et al. 1994; Naslavsky et al. 1997; Sunyach et al. 2003), kann die Zelle über sogenannte Exosomen (multivesikuläre Endosomen, die dann mit der Plasmamembran fusionieren) verlassen (Fevrier et al. 2004) und nachfolgend von anderen Zellen via Phagozytose aufgenommen werden (Mabbott 2012).

1.2.1.3 Zentrale und periphere PrP^c-Verteilung mit Schwerpunkt auf dem lymphatisch-retikulären System

Das physiologische Prionprotein findet man zum größten Teil im zentralen Nervensystem (**ZNS**) membrangebunden in den Neuronen im Neuropil (Kretzschmar et al. 1986; Moser et al. 1995; Manson et al. 1992; Harris et al. 1993; Taraboulos et al. 1992) sowie in den Gliazellen, wie Astrozyten und Oligodendrozyten (Moser et al. 1995; Prinz et al. 2004). Auf der

Ebene der Zellkompartimente findet man es vor allem in der präsynaptischen Membran (Herms et al. 1999), im Dendritenbaum, in den Axonen und im Bereich der Synapsen und weniger in den neuronalen Zellkörpern (Taraboulos et al. 1992). Im **peripheren Nervensystem** findet man das PrP^c in sympathischen Ganglien/Nerven, im parasympathischen Anteil (N. vagus im thorakalen und abdominellen Abschnitt), im Splanchnicusgebiet (Ford et al. 2002), im autonomen Nervensystem, im enterischen Nervensystem (Plexus myentericus und Plexus submucosus) (Ford et al. 2002) sowie im olfaktorischen System (N. olfactorius, olfaktorische Mukosa) und im Ganglion trigeminale (Ford et al. 2002). **Extraneuronal** findet man das PrP^c unter Zuhilfenahme von Mausmodellen in Organen wie Herz, Lunge, Pankreas, Milz, Hoden, Niere (Oesch et al. 1985), Leber (Kretzschmar et al. 1986), Skelettmuskulatur (Brown et al. 1998), Blase, Nebenhoden, dem neuroendokrinen System des gastrointestinalen Trakts, dem respiratorischen Trakt (Ford et al. 2002) sowie im Uterus, der Plazenta (Makzhami et al. 2014), Nebenniere und der Schilddrüse (Horiuchi et al. 1995). Im peripheren Blut findet man, neben der PrP-mRNA, das PrP^c in höchster Konzentration in den Thrombozyten (Ford et al. 2002). Bezüglich des PrP^c im **lymphatisch-retikulären System (LRS)** muss primär angemerkt werden, dass es sich in der Anordnung der N-Glykosylierung sowie der verwendeten Zuckerstruktur von dem PrP^c aus dem ZNS unterscheidet (Li et al. 2001). Im **primären lymphatischen Gewebe** zeigen der Thymus, hier im Cortex vor allem die Stromazellen und im Thymusmark die epithelialen als auch die dendritischen, interdigitierenden Zellen ein PrP^c-positives Signal (Ford et al. 2002; McBride et al. 1992). Im Knochenmark wurde das PrP^c in nicht weiter spezifizierten hämatopoetischen Progenitorzellen, Megakaryozyten sowie in Monozyten detektiert (Ford et al. 2002). Granulozyten hingegen wiesen kein PrP^c auf (Ford et al. 2002). Im **sekundären lymphatischen Gewebe** findet man das PrP^c nur in einer Subpopulation der lymphatischen Zellen (Li et al. 2001; Ford et al. 2002). Insgesamt stellt man fest, dass über 85% der vorhandenen T-Lymphozyten in primärem sowie sekundärem lymphatischen Gewebe PrP^c-negativ sind (Ford et al. 2002). Im peripheren Blutpool stehen an erster Stelle die T-Zellen (CD8+ ≥ CD4+), NK-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen. Diese exprimieren ähnliche Level an PrP^c, wohingegen die B-Zellen signifikant weniger PrP^c und die Granulozyten sowie Erythrozyten gar kein PrP^c exprimieren (Bendheim et al. 1992; Dürig et al. 2000; Ford et al. 2002). In der Milz zeigte sich vornehmlich in der weißen Pulpa der Peripherie (McBride et al. 1992) bezüglich der folliculären dendritischen Zellen in B-Zell-Follikeln und der dendritischen Zellen, die B-Zell- und T-Zell-Follikel im Bereich der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS) extrafollikulär umgeben, ein positiver Nachweis des PrP^c (Ford et al. 2002). Mit zunehmendem Alter des Organismus nimmt der Gehalt der auf der Zelloberfläche der folliculären dendritischen Zellen (FDCs) in der Milz exprimierten PrP^c-Moleküle jedoch ab. Jedoch ist unklar, welcher Mechanismus diesem Prozess zugrunde liegt (Brown P et al. 2012). Kleinere PrP^c-positive Lymphozyten wurden ebenfalls in der weißen, meist am Rand eines B-Zell-Follikels, aber auch vereinzelt in der roten Pulpa detektiert (Ford et al. 2002). Die T-Zell-Zone in der weißen Pulpa der Milz (PALS) ist jedoch frei von PrP^c (McBride et al. 1992). Auch in den

Lymphknoten lässt sich in den T-Zellregionen, dem Cortex, kein PrP^c detektieren (McBride et al. 1992), jedoch in den Keimzentren der Lymphfollikel auf der Oberfläche der FDCs (Klein et al. 1998; Brown KL et al. 1999; Bruce et al. 2000). Im GALT („gut-associated-lymphoid-tissue“), welches als ein Teil des MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) den Appendix, die Peyerschen Plaques, Plaques im Kolon sowie im Coecum und andere im Magen-Darm-Trakt isolierte Lymphfollikel (ILF) umfasst (Mabbott 2012), findet man in allen beschriebenen Kompartimenten PrP^c-positive Lymphozyten und dendritische Zellen (Ford et al. 2002). Die oben bereits erwähnten mobilen follikulären dendritischen Zellen findet man hier im GALT vor allem in den Peyerschen Plaques (McBride et al. 1992; Prinz et al. 2002). Sie gehören zu antigenpräsentierenden Zellen und aktivieren u.a. über diese Präsentation B-Gedächtniszellen. Es wird vermutet, dass das auf ihrer Oberfläche exprimierte physiologische Prionprotein eine Rolle in der Antigenpräsentation spielen könnte (McBride et al. 1992). Auch die M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels (FAE), welches sich als Barriere zwischen dem Darmlumen und dem GALT befindet, spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen. Hier lässt sich das PrP^c auf der luminalen Seite der apikalen Plasmamembran der M-Zellen detektieren. Dort kolokalisiert es mit dem Glykoprotein zwei (Nakato et al. 2009), welches Bakterien nutzen, um ihren Übertritt in die Mukosa zu erleichtern (Hase et al. 2009).

1.2.1.4 Funktion des PrP^c

Die exakte Funktion des PrP^c ist bis zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt (Singh und Udgaonkar 2015) und verschiedene mögliche Funktionen werden aktuell diskutiert. Die extrazellulär liegende Polypeptidkette könnte darauf schließen lassen, dass es eventuell PrP^c-vermittelte **Signaltransduktionswege** über die Membran in Verbindung mit anderen, aus Signalwegen bekannten, Membranproteinen geben könnte (Spielhauer und Schätzl 2001). In den Neuronen und auch anderen Zellen ist das PrP^c laut Kuwahara et al. in das **Zellüberleben** involviert und dies entweder über die Protektion der Zelle gegenüber oxidativem Stress, über Inhibition der Apoptose (Brown et al. 1998; Brown DR et al. 1999; Kuwahara et al. 1999; Westergard et al. 2007) oder über eine Aktivität entsprechend einer Superoxid-Dismutase (Brown DR et al. 1999). Hinzukommend konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die PrP^c-Konzentration nach **cerebraler Ischämie** unterschiedlicher Ausdehnung als Reaktion auf eine cerebrale Hypoxie, hochreguliert wird und neuroprotektive Prozesse induzieren könnte (McLennan et al. 2004; Weise et al. 2004; Doeppner et al. 2015). In der präsynaptischen Plasmamembran ist es mit dem Membranprotein Synaptophysin koexprimiert und in die Regulation der präsynaptischen **Kupferkonzentration** (Brown et al. 1998; Brown DR et al. 1999; Westergard et al. 2007) involviert. PrP^c-knock-out-Mäuse zeigen weiterhin ein verändertes Schlafverhalten und Veränderungen ihrer **zirkadianen Rhythmik** (Tobler et al. 1996). Von Schmitt-Ulms et al. wird proklamiert, dass das PrP^c auch in die **Zelladhäsion** über die Nerven-Zelladhäsionsmoleküle (N-CAMs) involviert ist und Einfluss auf die Zellproliferation besitzt (Schmitt-Ulms et al. 2001). Des Weiteren

konnte in humanen und murinen Lymphozyten gezeigt werden, dass die PrP^c-Expression mit der Aktivierung und der Entwicklungsstufe des **hämatopoetischen Systems** korreliert (Cashman et al. 1990; Dürig et al. 2000). Die PrP^c-Dichte auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten wird bei Zellaktivierung hochreguliert, sodass Gedächtnis-T-Zellen eine höhere Dichte an physiologischem Prionprotein auf ihrer Zelloberfläche präsentieren als naive T-Zellen (Li et al. 2001). Umgekehrt wird eine verminderte Lymphozytenaktivierung bei Fehlen der PrP^c-Expression vermerkt (Mabbott et al. 1997). Das physiologische Prionprotein wird bereits sehr früh, schon während der Hämatopoese im Knochenmark auf CD 34+-Stammzellen gefunden und sein Vorkommen steigt proportional mit der Differenzierung der weißen Blutreihe bezüglich der Lymphozyten und Monozyten an, wohingegen es bezüglich der granulozytären Differenzierungsreihe abfällt (Dodelet und Cashman 1998). Des Weiteren lässt sich aufgrund der extrazellulären Lage der PrP^c-Polypeptidkette, die Vermutung aufstellen, dass das PrP^c in die **Signaltransduktion** über die Zellmembran eingebunden ist (Loertscher und Lavery 2002; Westergard et al. 2007).

1.3 Die Prion-Protein-only-Hypothese

Der Begriff ‚Prion‘ steht für „Proteinaceous infectious particles that resist inactivation by procedures which modify nucleic acids“ (Prusiner 1982) und wurde von S.B. Prusiner in den 80iger Jahren eingeführt. Dieser entwickelte die Prion-Protein-only-Hypothese, die die Grundlage der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bildet. Die Prionhypothese besagt, dass das fehlgefaltete Prionprotein, PrP^{sc}, der Erreger der TSEs ist und sich vermehrt, indem es das zelleigene, physiologische Protein PrP^c in die pathologische Isoform das PrP^{sc} umwandelt (Griffith 1967; Prusiner 1982). Das infektiöse Agens war resistent gegenüber UV-Licht und radioaktiver Strahlung, die normalerweise nukleäre Säuren (DNA) zerstörte und auch gegenüber anderen Inaktivierungsschritten, die normalerweise bisher alle bekannten Mikroorganismen inaktivierten (Prusiner 1982) und ließ somit auf eine neue infektiöse Entität schließen. Prusiner et al. fingen daraufhin an, die Existenz eines Proteins zu überprüfen und konnten belegen, dass die Infektiosität des Materials sank, wenn dieses mit proteinzerstörenden Substanzen in Kontakt kam. Dazu gehörten Proteinase-K, Guanidiniumthiocyanat, Phenol, Hydroxylamin u.v.m. (Prusiner et al. 1980a; Prusiner et al. 1980b; McKinley et al. 1981; Prusiner et al. 1981). Auch die Entstehung von Sauerstoffradikalen bei radioaktiver Bestrahlung lässt auf die Existenz einer biologischen Membran oder auf Lipoproteine schließen, jedoch nicht auf nukleäre Säuren (Alper et al. 1978). Die gesammelten experimentellen Daten deuten darauf hin, dass das Scrapieagens sich von bisher bekannten Viren, Viroiden oder Plasmiden unterscheidet. Da die bislang bekannten Eigenschaften eine Ähnlichkeit mit Proteineigenschaften aufweisen, wird diese notwendige Beteiligung eines Proteins im Scrapieagens durch den neuen Begriff ‚Prion‘ als zentraler Bestandteil der Prion-Protein-only-Hypothese herausgestellt (Prusiner 1982). Als beweisähnlich für die Prionprotein-only-Hypothese gilt die 2010 mit Hilfe der Protein-Misfolding-Cyclic-Amplification-Methode (PMCA) in-vitro induzierte Konversion von rekombinantem murinen PrP^c, gewonnen aus

dem *Escherichia coli*-Bakterium, in ein rekombinantes Prion mit den pathologischen Prioneigenschaften (starke Aggregationstendenz, Proteaseresistenz, Vermehrung durch eigens induzierte Konversion) (Wang et al. 2010). Abschließend kann man sagen, dass es heute die Frage zu klären gilt, ob das PrP^{sc} alleine für die Infektiosität verantwortlich ist oder andere Co-Substanzen notwendig sind und weiterhin, ob diese entweder Teil des PrP^{sc} sind oder als Co-Substanzen außerhalb des PrP^{sc} vorliegen. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob diese Substanzen physiologisch in der Zelle vorhanden sind oder diese nur im Falle der Erkrankung vorliegen (Soto 2011). Angemerkt werden muss jedoch weiterhin, dass das Vorhandensein des physiologischen, membrangebundenen Prionproteins eine grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion mit Scrapie ist (Büeler et al. 1993; Chesebro et al. 2005).

1.4 β -Konversion des physiologischen Prionproteins in die pathologische Isoform

Bei gleicher Primärstruktur (Stahl und Prusiner 1991) unterscheiden sich die beiden Prionproteinisoformen deutlich in ihrer räumlichen Anordnung (Sekundärstruktur) (Pan et al. 1993; Stahl et al. 1993). Aufgrund der starken Aggregationstendenz der pathologischen Isoform ist eine genaue Analyse der Sekundärstruktur erschwert und noch ausstehend. Die Messungen mit Hilfe des Fourier-Transform-Infrarotspektrometers zeigten jedoch, dass das PrP^c in seiner Sekundärstruktur zu 42% aus α -Helices und nur zu 3% aus β -Faltblättern besteht. Wenn jedoch das PrP^{sc} untersucht wird, stellt man hier einen Gehalt an β -Faltblättern von 43% und einen an α -Helices von nur 30% fest (Pan et al. 1993). Hinzukommend ändert sich im Falle einer Prionerkrankung das Gleichgewicht zwischen der physiologischen und der pathologischen Isoform hingehend zur pathologischen Isoform, sodass angenommen wird, dass sich das PK-sensitive, α -Helix-reiche Monomer (PrP^c) in das β -faltblattreiche, aggregierende Multimer (PrP^{sc}) umfaltet (Cohen und Prusiner 1998), was als β -Konversion bezeichnet wird (Honda et al. 2015). Den Beginn der Umwandlung des PrP^c in die pathologische Isoform stellt entweder eine erworbene Prioninfektion (erworbene Prionerkrankungen), eine spontane Konversion (sporadische Prionerkrankungen) oder eine Mutation im *PRNP*-Gen (hereditäre Prionerkrankungen) dar (Stöhr et al. 2008). Diese Konversion von der α -Helix-Struktur in die β -Faltblattstruktur wird als entscheidendes Event in der Pathogenese der Prionerkrankungen angesehen. Um die Entstehungskaskade von einem fehlgefalteten Prionprotein zu der finalen Ablagerung von Prionamyloid und zum Krankheitsausbruch zu erklären, wurde 1993 von Jarrett et al. (Jarrett und Lansbury 1993) das 2008 genauer aufgearbeitete (Stöhr et al. 2008) Nucleation-Seeding-Modell entwickelt. Interessanterweise kann dieses Modell nicht nur auf die TSEs übertragen werden, sondern auch auf andere bereits erwähnte Proteinaggregationskrankheiten, wie die Alzheimer- oder die Parkinson-Erkrankung, da auch hier ein akzeleriertes Seeding gezeigt werden konnte (Soto 2003). Ein entscheidender Unterschied besteht hier jedoch bezüglich der Infektiosität, da bislang weder für den M. Alzheimer

noch für den M. Parkinson oder weitere Proteinaggregationserkrankungen ein Infektionsnachweis gezeigt werden konnte.

1.5 Das PrP^{sc}

Die Abkürzung PrP^{sc} steht für die pathologische, scrapie-like Isoform des Prionproteins (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986), das der Prionhypothese (s. Kapitel 1.3) zufolge Bestandteil, wenn nicht sogar der einzige Bestandteil des Prions sein soll (Prusiner 1982).

1.5.1 Eigenschaften des pathologischen Prionproteins

Das PrP^{sc} unterscheidet sich in seiner Primärstruktur nicht von der physiologischen Isoform (s. Kapitel 1.2.1.1). Es erhält seine pathogenen Eigenschaften, wie die starke extrazelluläre fibrilläre Aggregationsfähigkeit, die Unlöslichkeit in Detergenzien (Meyer et al. 1986) sowie die Proteolyse zu einem PK-resistenten Kern (PrP 27-30) unter Proteinase-K-Verdau (McKinley et al. 1983) vermutlich über die β -Konversion (s. Kapitel 1.4) (Stahl und Prusiner 1991). Im Gegensatz zum PrP^c wird das PrP^{sc} dreifach langsamer (im Mittel 3 Stunden) synthetisiert und degradiert nicht (Borchelt et al. 1990). Die pathologische Isoform kann nun unter zellzerstörenden Bedingungen oder via Endosomen aus der Zelle freigesetzt, jedoch auch via Phagozytose von anderen Zellen aufgenommen werden (zum Vgl. s. Kapitel 1.2) (Safar et al. 1990; Stahl et al. 1990). Posttranslationale Modifikationen werden in vivo an beiden Isoformen vorgenommen (s. Kapitel 1.2.1.2) (Hope et al. 1986; Bolton et al. 1987; Turk et al. 1988). Die für die Charakterisierung des PrP^{sc} entscheidende Modifikation ist die Glykosylierung mit Oligosacchariden der beiden Asparaginresiduen an den Codons 181 und 197 (Bolton et al. 1985; Haraguchi et al. 1989). Das PrP^{sc} kann dann als un-, mono- sowie diglykosylierte Form vorliegen (Stimson et al. 1999) und zeigt anschließend ein unterschiedliches Migrationsverhalten in der SDS-PAGE (Haraguchi et al. 1989). Nach enzymatischer Spaltung der unglykosylierten Form können im Western-Blot zwei Banden mit jeweils unterschiedlicher Fragmentgröße detektiert werden, sodass unterschiedliche PrP^{sc}-Typen voneinander differenziert werden können. Sie werden als Typ 1 (21 kDa) und Typ 2 (19 kDa) bezeichnet (Parchi et al. 1996; Parchi et al. 1997; Parchi et al. 2000; Parchi et al. 2011). Neben der klassischen Form des PrP^{sc} existiert eine heterogene Gruppe an PK-sensitiven oder wasserlöslichen oligomeren Formen (Tzaban et al. 2002; Cronier et al. 2008; Kim et al. 2012; Anaya et al. 2011), die grundlegende strukturelle Ähnlichkeiten mit der pathologischen Isoform aufweisen, obwohl sie die Definition nicht komplett erfüllen (Sajani et al. 2012).

1.5.2 Ablagerungsmuster des PrP^{sc} im ZNS

Die ausgeprägte Tendenz des PrP^{sc} zur Aggregation kann mit Hilfe der Lichtmikroskopie und der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung quantifiziert und analysiert werden. Zu den im ZNS detektierten Gewebsablagerungen gehören die **amyloiden** Plaques oder Kuru-Plaques, welche kompakte, homogene eosinophile PrP^{sc}-Ablagerungen bezeichnen und mit Hilfe der

normalen HE-Färbung bzw. der Periodic-Acid-Schiff(PAS)-Reaktion nachweisbar und typisch für Prionerkrankungen, wie Kuru, sind; **multizentrische** Plaques, die aus einem zentralen, großen Plaque bestehen, der von kleineren, satellitenartigen Plaques umgeben wird und typisch für die GSS sind sowie **floride** Plaques, die einen zentralen Kern zeigen, der von spongiformen Veränderungen umgeben ist. Diese letztgenannte Ablagerungsform findet man vornehmlich bei der vCJD, aber auch bei einer kleinen Zahl von iCJD-Fällen nach Dura-mater-Implantation (Parchi et al. 2011). Zusätzlich zu diesen o. g. Ablagerungsformen gibt es andere, die sich nur mit Hilfe der Immunhistochemie bzw. dem Paraffin-embedded-tissue-blot (PET-Blot) nachweisen lassen (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Dazu gehören erstens die **plaqueähnlichen** Ablagerungen, die aus nur wenigen PrP^{sc}-Ablagerungen bestehen und vornehmlich bei VV2-Fällen der sCJD gesehen werden; zweitens die **synaptische** Anfärbung von PrP^{sc}, die häufig zart und eher schwammig imponiert (Kitamoto et al. 1992) und die am häufigsten vorkommenden MM1/MV1-Fälle der sCJD charakterisiert (Parchi et al. 2011); drittens die **perivakuolische** Anfärbung von PrP^{sc}, die häufig in Kombination mit großen konfluierenden Vakuolen auftritt und viertens die **perineurale** Anfärbung von PrP^{sc}-Ablagerungen (Parchi et al. 2011). Diese unterschiedlichen Ablagerungsmuster der PrP^{sc}-Aggregate sind häufig typisch für die Subtypen der menschlichen Prionerkrankungen. Wie die missgefalteten Proteine und Oligomere die klinisch apparente Neurotoxizität induzieren bleibt jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt (Singh und Udgaonkar 2015).

1.5.3 PrP^{sc} und das lymphatische System

Der Nachweis von PrP^{sc} im lymphatischen System gelang bislang nur für die erworbenen Prionerkrankungen wie der Scrapie, CWD (Jeffrey und González 2004; Beekes und McBride 2007), BSE (Tranulis et al. 2000; Terry et al. 2003; Holznagel et al. 2015) und vCJD (s. Kapitel 1.6.3.10 und 1.6.3.11). Die genaue PrP^{sc}-Verteilung sowie die kritische Betrachtung der PrP^{sc}-Ablagerungen und ihre Ausbreitungsroute nach oraler Aufnahme im LRS werden in den jeweiligen Kapiteln näher beleuchtet.

1.6 Die Prionerkrankungen bei Menschen

Die am längste bekannte humane Prionerkrankung ist das hereditäre Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom. Sie wurde erstmals Ende des 18. Jahrhunderts beschrieben (Hainfellner et al. 1995). Alle weitere humanen Prionerkrankungen wurden erst im Laufe des 20. Jahrhunderts entdeckt und beschrieben, allen voran die nach Hans G. Creutzfeldt und Alfons M. Jakob benannte Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (s. Kapitel 1.6.2.1). Die menschlichen Prionerkrankungen werden in hereditäre, sporadische und erworbene Formen unterteilt (s. Kapitel 1.1). Dies bedeutet, dass eine humane TSE durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden kann: a) verschiedene Punktmutationen im *PRNP*-Gen führen zu einer Fehlfaltung des physiologisch vorkommenden codierten Prionproteins und somit zu dem klinischen Auftreten einer vererbaren Prionerkrankung (**hereditär**) (Goldfarb et al. 1990;

Kretzschmar et al. 1991; Gabizon et al. 1993; Kretzschmar 2001); b) die zentrale (intrazerebral) oder periphere (intravenös, intraperitoneal, subkutan, oral) Aufnahme einer ausreichenden Menge des infektiösen Agens induziert eine Fehlfaltungskaskade des PrP^c in das PrP^{sc} und führt so zum klinischen Auftreten einer Prionerkrankung, ausgelöst durch das aufgenommene PrP^{sc} (**erworben**) (s. Kapitel 1.6.3 und 1.8.2); c) eine zufällig im Leben spontan auftretende Fehlfaltung des physiologisch vorkommenden Prionproteins im ZNS, z. B. im Rahmen einer Überproduktion von PrP^c, induziert eine Kaskade der Fehlfaltung in das PrP^{sc} und führt so zum klinischen Auftreten einer Prionerkrankung, ohne dass vorher eine familiäre oder infektiöse Anamnese positiv gewesen wäre (**sporadisch**) (s. Kapitel 1.6.2). Hieraus wird ersichtlich, dass ein Organismus in der Lage ist mit - aber auch ohne Kontakt zu einem infektiösen Agens - de-novo aus einem in ihm selbst physiologisch vorkommenden Protein einen Prionerreger zu synthetisieren und damit selber an der Prionerkrankung zu erkranken und andere sekundär mit diesem ‚Prion‘ zu infizieren. Die häufigste humane Prionerkrankung ist die sporadische CJD (Masters et al. 1979), gefolgt von den hereditären TSEs (familiäre CJD, GSS und FFI) und letztlich der iatrogenen und varianten CJD (Ladogana et al. 2005).

1.6.1 Überblick über die Diagnostik und Therapie

Die humanen Prionerkrankungen sind insgesamt sehr selten, phänotypisch sehr variabel, meist erst nach Einsetzen der ersten Symptome, somit zu spät und insgesamt schwer zu diagnostizieren, sodass die Diagnose einer Prionerkrankung nur in Kombination der Anamnese mit der Klinik, mit der apparativen Diagnostik und mit den histopathologischen Untersuchungen gestellt werden kann. Die Prionerkrankungen müssen vor allem differentialdiagnostisch berücksichtigt werden.

1.6.1.1 Überblick über die histopathologische Diagnostik im ZNS

Die definitive Diagnose einer TSE kann bislang nur histopathologisch anhand einer Hirngebeuntersuchung (prä- oder postmortal) gestellt werden. Die spezifische Histopathologie des zentralen Nervensystems ist namensgebend für die TSE. Sie umfasst, bei Fehlen einer lokalen und systemischen inflammatorischen Reaktion (Brown und Mastrianni 2010), a) die spongiforme Vakuolisierung der grauen Substanz, v.a. in Neuriten und den Somata, die in jeder Cortexregion im Neuropil auftreten kann und sich bis zu dem sogenannten Status spongiosus entwickeln kann; b) die reaktive Proliferation der Astrozyten und Mikroglia mit einhergehendem Verlust von Neuronen sowie c) die für Prionerkrankungen pathognomonischen Ablagerungen von amyloiden Plaques im ZNS (s. Kapitel 1.5) (Soto 2001; Chiti und Dobson 2006). Neben den kortikalen o. g. Veränderungen findet man diese vor allem auch im Thalamus, den Basalganglien und auch im Cerebellum (Kretzschmar 2001). Der Phänotyp und auch die Neuropathologie sind stark durch das Zusammenspiel aus dem M129V-Polymorphismus des *PRNP*-Gens und dem PrP^{sc}-Typ beeinflusst (Parchi et al. 1996). Diese

genannte Histopathologie wird in den folgenden Kapiteln für die Subtypen der Prionerkrankungen näher beschrieben.

1.6.1.2 Apparative Diagnostik

Diagnostische Hinweise können die Magnetresonanztomographie (MRT), die Elektroenzephalographie (EEG), die Liquorpunktion und –analyse und eventuell die Positronen-Emissionstomographie erbringen. Eine Hilfestellung in der Diagnostik der Prionerkrankungen kann, bei Hinweis auf eine familiäre Genese, die genetische Analyse des *PRNP*-Gens (Hsich et al. 1996; Geschwind et al. 2003; Satoh et al. 2007; Brown und Mastrianni 2010) sowie die PMCA (Saborio et al. 2001; Saá et al. 2006) oder die real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) (Orrù et al. 2012) darstellen.

1.6.1.3 Differentialdiagnostische Überlegungen

Aufgrund der wenigen spezifischen diagnostischen Möglichkeiten, um eine TSE diagnostizieren zu können, müssen dringend häufigere und zum Teil auch behandelbare Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden, bevor die Diagnose einer Prionerkrankung gestellt werden kann. Dazu gehören andere Proteinaggregationskrankheiten wie der M. Alzheimer, die corticobasale Degeneration (CBD), die Lewy-Body-Demenz (DLB) oder neurodegenerative Erkrankungen wie Chorea Huntington, die spinocerebelläre Ataxie, die frontotemporale Demenz (FTD) sowie entzündliche ZNS-Erkrankungen, metabolische Erkrankungen, maligne Erkrankungen wie ZNS-Tumore oder paraneoplastische Syndrome und Autoimmunerkrankungen (Brown und Mastrianni 2010).

1.6.2 Sporadische Prionerkrankungen

Die sporadischen Prionerkrankungen zeichnen sich dadurch aus, dass bis heute keine Infektionsquelle gefunden, keine signifikanten Risikofaktoren für die Entwicklung einer sCJD benannt werden können (van Duijn et al. 1998) und sie weltweit selten aber gleichmäßig auftreten (Hörnlimann 2001a). Sie werden auch als idiopathische Prionerkrankungen bezeichnet.

1.6.2.1 Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung – Geschichte und Epidemiologie

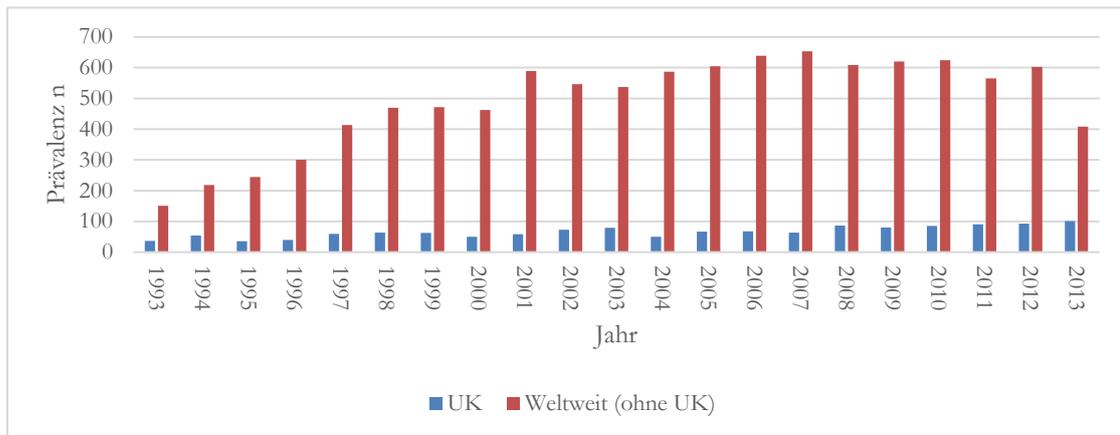


Abbildung 1: sCJD: Definitive und wahrscheinliche Fälle im Zeitraum von 1993 bis 2013 weltweit und in Großbritannien (UK) Surveillance Data - CJD International Surveillance Network).

Die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung wurde erstmals 1921 von Alfons M. Jakob und Hans G. Creutzfeldt beschrieben und unter dem Namen der ‚spastischen Pseudosklerose‘ bekannt (Jakob 1921). Schnell wurde nach der ersten Beschreibung der CJD die phänotypische Variabilität dieser Erkrankung deutlich (Parchi et al. 2011). In den 1960er Jahren konnte die CJD experimentell auf Schimpansen übertragen und unter den TSE subsummiert werden (Gajdusek et al. 1966). Die sporadische CJD macht ca. 85% aller Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen aus (Palmer und Collinge 1992), die weltweite jährliche Inzidenz wird auf 0,3 – 1,3/ 1 Million Einwohner beziffert (Brown et al. 1987; Masters et al. 1979; Alperovitch et al. 1994). Die CJD stellt somit die häufigste Prionenerkrankung dar, ist jedoch mit der oben genannten Inzidenz insgesamt ein sehr seltenes Krankheitsbild (Sturzenegger 2001). Es konnte gezeigt werden, dass weltweit keine lokal gehäuften Prävalenzen der sCJD auftreten und auch kein kausaler Zusammenhang mit sozioökonomischen Faktoren, vorangegangenen Traumata oder Operationen sowie diätischen Faktoren, wie der Exposition gegenüber BSE-kontaminierten Rinderprodukten, hergestellt werden kann (Brown et al. 1987).

1.6.2.2 sCJD - Klinik

Die Patienten sind typischerweise zwischen 45 und 75 Jahren alt, wobei die Mehrheit sich mit einem Erkrankungsalter zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr vorstellt. „[...] In [...] einem Drittel der Fälle [...] [präsentieren sich die Patienten] mit mentalen Störungen wie [einer] Gedächtnisstörung, Verwirrtheit und Verhaltensstörung mit Depression oder Agitation, [in einem Drittel präsentieren die Patienten eher] physisch-neurologische Symptome (zerebellär, okulomotorisch und visuell) und im restlichen Drittel [...eine...] Kombination aus den beiden [Möglichkeiten]“ (Sturzenegger 2001). Diese Symptome entwickeln sich zu

einer rapid progressiven Demenz in Kombination mit Myokloni, die initial selten (in ca. 5% der Fälle), aber im Verlauf häufiger (in 78-89% der Fälle) auftreten (Sturzenegger 2001), und einer Ataxie. Das zentrale Merkmal der sCJD ist die progrediente Demenz, „[...] die Charakteristika eines sog. kortikalen Typs mit Aphasie, Agraphie, Apraxie, Agnosie, Akalkulie [und] Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen [zeigt]“ (Sturzenegger 2001). So verschlechtert sich der klinische Zustand der Patienten über mehrere Wochen über eine Bewusstseinsstrübung, eine Kachexie, Inkontinenz, bis hin zum akinetischen Mutismus und führt in einem Zeitraum von einem bis 130 Monaten, im Durchschnitt in viereinhalb Monaten (Sturzenegger 2001), immer zum Tod der Patienten. Über 70% der Patienten versterben in weniger als sechs Monaten nach Erkrankungsbeginn (Collinge 1997). Weiterhin werden Symptome genannt, die gehäuft in Kombination mit der sCJD auftreten, jedoch nichtspezifisch für diese neurodegenerative Erkrankung sind. Dazu gehören u. a. Erschöpfung oder Fatigue, pyramidale und extrapyramidale Symptome wie eine Spastik oder eine Hyperreflexie bzw. ein Tremor oder Rigor, eine Bradykinesie, Chorea, das Alien-Limb-Symptom oder Verhaltensänderungen (Brown et al. 1986). Neben der oben beschriebenen sCJD, die in 50% aller CJD-Fälle auftritt und als diffus zerebraler CJD-Typ bezeichnet wird (Sturzenegger 2001), existieren noch 5 weitere Subtypen der sCJD: die amaurotische oder Heidenhain-Variante (Kretzschmar 2001), die Brownell- und Oppenheimer-Variante bzw. der zerebelläre Typ, die thalamische Form der sCJD, der Jakob-Typ bzw. der Typ der spastischen Pseudosklerose (Sturzenegger 2001) sowie der seltene amyotrophe Typ (de Silva 1996). Zuletzt kann noch die panenzephalitische japanische Variante genannt werden (Belay 1999; Kretzschmar 2001; Cornelius et al. 2009; Parchi et al. 2011).

1.6.2.3 sCJD - Diagnostik

Auf der Basis der klinischen, elektrophysiologischen und histopathologischen Veränderungen bei den an sCJD-erkrankten Patienten kann die Diagnose der sCJD in unwahrscheinliche, mögliche, wahrscheinliche oder definitive Fälle klassifiziert werden. Da eine endgültige Diagnose nur aufgrund einer neuropathologischen Gehirnuntersuchung, eines immunhistochemischen Nachweises bzw. einer Darstellung des PrP^{sc} im Western-Blot sowie mit Hilfe der PMCA bzw. eines vereinfachten Aggregationsassays (RT-QuIC) gestellt werden kann, ist diese vorgeschlagene Einteilung eine Hilfestellung im klinischen Alltag. Zu den wahrscheinlichen CJD-Diagnosen werden Fälle gezählt, die neben einer progressiven Demenz von weniger als zwei Jahren Dauer charakteristische EEG-Veränderungen und/oder einen Nachweis des Proteins 14-3-3 im Liquor sowie mindestens zwei der folgenden Symptome, wie Myoklonien, visuelle oder zerebelläre Veränderungen, (extra)-pyramidale Veränderungen oder einen akinetischen Mutismus aufweisen. Zu den möglichen Fällen werden Patienten zugeordnet, die sich mit den o. g. Symptomen vorstellen, jedoch keine typischen EEG-Veränderungen oder einen Protein-14-3-3-Nachweis im Liquor aufweisen. Zu den unwahrscheinlichen Fällen werden neurologisch auffällige Patienten zugeordnet, die die genannten Kriterien nicht erfüllen. Die klassische Trias der sCJD, eine Kombination aus Demenz,

Myoklonus und Periodic-Short-Wave-Komplexen (PSWC) im EEG, findet man in 2/3 aller sCJD-Fälle (Masters et al. 1979; Hörnlimann et al. 2001a).

1.6.2.4 sCJD - Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung unter Einfluss des M129V-Polymorphismus des *PRNP*-Gens und Bedeutung von Erregerstämmen

Allen Subtypen der sCJD ist gemein, dass sich histopathologisch im Gehirn ähnliche Veränderungen finden lassen. Neben der definierenden TSE-Pathologie (s. Kapitel 1.6.1.1) lassen sich immunhistochemisch, die für die sCJD pathognomonischen PrP^{sc}-Ablagerungen Typ 1 und Typ 2 detektieren, die in Kombination mit dem M129V-Polymorphismus den Phänotyp inkl. des Erkrankungsalters, der Erkrankungsdauer, der klinischen Ausprägung sowie der neuropathologischen Veränderungen inkl. der PrP^{sc}-Typisierung charakterisieren (Parchi et al. 1999). Sie werden als Erregerstämme bezeichnet. Ein Erregerstamm bezeichnet nach der Definition von Aguzzi et al. ein TSE-Isolat, welches nach Übertragung auf verschiedene Spezies ein gleiches Erkrankungsprofil inklusive der o. g. Faktoren zeigt (Aguzzi et al. 2007) und vornehmlich bei der Scrapie und der sporadischen CJD diskutiert wird (s. Kapitel 1.7.1.5, 1.6.2.4), wohingegen man bei der BSE-Erkrankung sowie der vCJD von einem gemeinsamen Erregerstamm ausgeht (s. Kapitel 1.6.3.8). CJD-Patienten mit dem häufigsten **MM1/MV1-Phänotyp** zeigen neuropathologisch kleine Vakuolen (2–10 µm) und ein feines, retikuläres PrP^{sc}-Ablagerungsmuster, welches einer synaptischen Ablagerung von PrP^{sc}-Aggregaten (Kitamoto und Tateishi 1994; Schulz-Schaeffer et al. 2000b) entspricht. Diese finden sich vornehmlich in der okzipitalen Großhirnrinde, in den Basalganglien, im Thalamus sowie im Cerebellum. Der zweithäufigste **VV2-Phänotyp** zeigt neben einer Spongiformität der Großhirnrinde immunhistochemisch grobgranuläre, plaqueartige und perineuronale PrP^{sc}-Ablagerungen vornehmlich in den subkortikalen Strukturen und im Hirnstamm. Der dritthäufigste **MV2-Phänotyp** weist neben plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen, in 5-10% der Fälle, in der Körnerzellschicht des Cerebellums die so genannten Kuru-Plaques auf (Belay 1999, Kawachi et al. 2006), die bezüglich der sCJD ausschließlich mit diesem Genotyp assoziiert werden (Parchi et al. 1996; Hill et al. 1999b; Kretzschmar 2001). Der vierthäufigste **MM2-Phänotyp** spaltet sich in einen kortikalen und thalamischen Phänotypen, wobei der erstere große konfluierende Vakuolen mit perivakuolären Ablagerungen zeigt und der letztgenannte sich neuropathologisch nicht von der FFI unterscheidet. Der seltenste **VV1-Phänotyp** weist bei sehr schwachem immunhistochemischem synaptischem PrP^{sc}-Nachweis, histopathologisch eine starke Vakuolisierung in der Großhirnrinde sowie im Corpus striatum auf. Durch zentrifugale Ausbreitung aus dem ZNS nach dortiger Akkumulation und Replikation lässt sich auch in allen Genotypen in der Retina von sCJD-Patienten (Head et al. 2003), in der olfaktorischen Mukosa (Zanusso et al. 2003), im Ganglion trigeminale (Guiroy et al. 1989) oder in peripheren Nerven (Ishida et al. 2005) das PrP^{sc} detektieren. Die sensitive PET-Blot-Methode, die auch als Grundlage dieser Arbeit dient, konnte im direkten Vergleich zu konventionellen immunhistochemischen Methoden, wie dem Western-Blot oder Histoblot zeigen, dass auch

bei den VV1-Fällen in den Basalganglien sowie im Cerebellum starke PrP^{sc}-Ablagerungen detektierbar sind (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Dieser Nachweis zeigt, dass die PET-Blot-Methode die aktuell sensitivste Nachweismethode für den Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen im Rahmen der sCJD darstellt, und sollte daher immer für den Nachweis von zentralen aber auch peripheren PrP^{sc}-Ablagerungen genutzt werden. Eine außerhalb des ZNS oder des PNS vorkommende PrP^{sc}-Akkumulation konnte bislang histopathologisch oder immunhistochemisch mit den o. g. konventionellen Methoden nicht gelingen (Hill et al. 1999a; Hilton et al. 2004b; Brandner et al. 2008).

1.6.3 Erworbene Prionerkrankungen

1.6.3.1 Kuru - Geschichte und Epidemiologie

Kuru bedeutet in der Sprache der Einheimischen aus Papua Neuguinea „aufgrund von Kälte oder Fieber zu zittern“ (Gajdusek und Zigas 1961). Sie scheint zum ersten Mal um die Jahrhundertwende zum 20. Jahrhundert aufgetreten zu sein und breitete sich seitdem endemisch über mehrere Orte in der südlichen Fore-Region in Papua Neuguinea aus (Liberski 2013). Für diese Kuru-Endemie ursächlich war die Übertragbarkeit des infektiösen Agens aufgrund kannibalistischer Rituale im Rahmen von Trauerzeremonien (Glasse 1967; Mathews et al. 1968; R. L. Klitzman 1984), während dieser vermutlich ein an der sCJD Verstorbener konsumiert wurde (Alpers und Rail 1971). Es werden diesbezüglich zwei verschiedene Infektionswege diskutiert: parenteral über mukösen Kontakt mit infektiösem Gewebe, z. B. konjunktival oder transdermal (Goodfield 1997; Liberski und Gajdusek 1997) und enteral, wobei der Erste in kürzeren Inkubationszeiten resultieren würde (R. L. Klitzman 1984; Hörnlimann und Alpers 2001). Den Höhepunkt dieser Erkrankung stellten die Jahre zwischen 1957 und 1960 dar, in denen über 200 Personen pro Jahr an dieser Erkrankung verstarben. In der westlichen Fachliteratur wurde die Kuru-Erkrankung 1957 zum ersten Mal beschrieben (Gajdusek und Zigas 1957; Gajdusek und Zigas 1961). 1966 gelang Gajdusek und Gibbs erstmals der Nachweis der Transmissibilität einer humanen Prionerkrankung (30 Jahre zuvor gelang der Nachweis der Scrapie-Übertragbarkeit (Cuillé und Chelle 1936)), indem Kuru experimentell auf Schimpansen übertragen werden konnte, sodass Kuru den TSE untergeordnet wurde (Gajdusek et al. 1966; Gajdusek et al. 1967; Gajdusek und Gibbs 1964). Mitte der 1950iger Jahre wurden auf Druck der australischen Regierung die o. g. kannibalistischen Rituale eingestellt und ein Rückgang der Inzidenz vermerkt (Hörnlimann 2001b). Ende der 1990iger Jahre sank die Inzidenz auf eine neuerkrankte Person pro Jahr und lässt somit den Schluss auf eine mögliche Inkubationszeit von über 40 Jahren zu (Hörnlimann und Alpers 2001; Brandner et al. 2008). Studien an Schimpansen zeigten jedoch durchschnittliche Inkubationszeiten von ca. zwei Jahren (Gajdusek et al. 1966). Heute muss die Kuru-Erkrankung jedoch als ein historisches Beispiel einer humanen Prionerkrankung gewertet werden.

1.6.3.2 Kuru - Klinik

Der Krankheitsverlauf der Kuru-Krankheit wird in drei Stadien eingeteilt, in die ambulante, die sitzende und die terminale Phase. Sie verläuft stark progredient und endet immer tödlich. Die Prodromalphase der Kuru-Krankheit hält für ein paar Monate an und beinhaltet unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Gelenkbeschwerden, Bauchschmerzen sowie einen Gewichtsverlust. In der ambulanten Phase der Erkrankung beginnen die zerebellären Symptome mit einer progredienten Ataxie in den unteren Extremitäten, einem feinschlägigen Ruhetremor mit einer Intentionskomponente, einer Dysmetrie sowie einer Dysarthrie. Zudem wurden ein horizontaler Strabismus, ein Nystagmus, eine posturale Instabilität und auch faziale Hemiparesen sowie supranukleäre faziale Paresen beobachtet. Die dritte und terminale Phase geht mit einer Bettlägerigkeit, Inkontinenz, Dysphasie, primitiven Reflexen, einer Kachexie, muskulären Faszikulationen, Athetosen und einer Chorea einher (Liberski 2013). Im Gegensatz zu der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung kann man eine Demenz nur in sehr wenigen Fällen beobachten (Hörnlimann 2001b). Weiterhin lassen sich über den Krankheitsverlauf parathyme Symptome, wie ein groteskes Lachen oder auch eine Euphorie beobachten (Zigas 1990).

1.6.3.3 Kuru - Histopathologische Veränderungen

Die typische spongiöse Degeneration (s. Kapitel 1.6.1.1) findet sich auch im Rahmen der Kuru-Erkrankung u. a. im Cortex des limbischen Systems, des Striatums, des medialen Thalamus, dem Cerebellum sowie im Hirnstamm. Außerdem findet man die sogenannten Kuru-Plaques aus dem PrP^{sc}-Typ 2 vor allem im Cerebellum, was konkordant zu der klinischen Manifestation der Erkrankung ist sowie eine intrazytoplasmatische Vakuolisierung der Neuronen im Striatum (Adams et al. 1974).

1.6.3.4 Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung – Geschichte und Epidemiologie

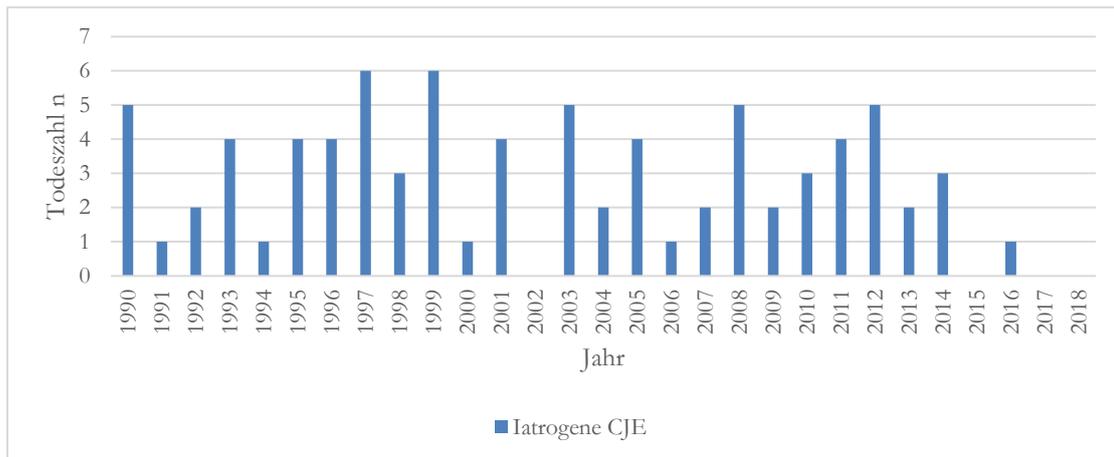


Abbildung 2: iCJD: Todeszahlen definitiver und wahrscheinlicher Fälle im UK zwischen 1990 und 2018 (NCJDRSU 2018)

1974 wurde der erste iatrogen übertragbare CJD-Fall beschrieben, der nach einer Corneatransplantation bei einer weiblichen Patientin diagnostiziert wurde, die ein Transplantat eines an sCJD-verstorbenen Spenders erhielt (Duffy et al. 1974). Doch bereits in den 1950iger Jahren wurde von Nevin et al. über die Möglichkeit der iatrogenen CJD-Übertragung via EEG-Elektroden berichtet (Nevin et al. 1960). Die bis heute am häufigsten aufgetretenen iCJD-Fälle resultieren jedoch aus der Übertragung durch Dura-mater-Transplantationen (Pocchiari et al. 1992; CDC 1997; Thadani et al. 1988; Antoine et al. 1997; Defebvre et al. 1997) – bis 2012 228 beschriebene Fälle (Brown P et al. 2012) - sowie aus Wachstumshormon-Transfusionen (Powell-Jackson et al. 1985) – bis 2012 226 beschriebene Fälle (Brown P et al. 2012). Eine geringe iCJD-Fallzahl wurde durch das Geschlechtshormon Gonadotropin (Cochius et al. 1990), nicht ausreichend desinfiziertes Operationsbesteck (Will und Matthews 1982; Gibbs et al. 1994) - wie o. g. EEG-Elektroden (Bernoulli et al. 1977) -sowie bislang 5 beschriebene Fälle durch Blut- und Blutplasmatransfusionen (s. Kapitel 1.6.3.8) von vCJD-Patienten (Llewelyn et al. 2004; Brown P et al. 2012) verursacht. Der Höhepunkt der iCJD-Inzidenz in Großbritannien kann Mitte der 1990iger Jahre vermerkt werden (außerhalb der UK wird der Höhepunkt wenige Jahre später durch die zeitversetzte Exposition mit BSE-kontaminiertem Fleisch vermerkt). Seitdem wird ein stetiger Rückgang beschrieben (Brown P et al. 2012).

1.6.3.5 iCJD - Phänotypische Ausprägung in Abhängigkeit vom M129V-Polymorphismus des PRNP-Gens

Die Inkubationszeiten der iatrogenen CJD variieren je nach Infektionsdosis, Eintrittspforte sowie Genom des Patienten (Zerr und Poser 2001). Bisher sind nur Patientenfälle bekannt, bei denen die Übertragung aufgrund invasiver Applikation des infektiösen Agens und bei ausreichender Menge von infektiösem Material stattfand. Die dafür notwendige Dosis steigt von intrakraniell, zu intravenös, zu intraperitoneal, zu subkutan und zu oral immer weiter an

(Diringer 1990). Um einen Organismus einer anderen Spezies erfolgreich zu infizieren, sind jeweils noch höhere Konzentrationen notwendig (Hörnlimann et al. 2001b). Bei zentralem Transmissionsweg (direkt in das ZNS bzw. in die Nähe des ZNS appliziert) und ausreichender Konzentration, weist der Patient bereits nach 18 bis 20 Monaten erste klinische Symptome einer iCJD auf, wohingegen die Patienten, bei denen das infektiöse Agens peripher in den Organismus gelangt erst nach durchschnittlich zwölf bis 13 Jahren klinisch auffällig werden (passend zur oben beschriebenen iCJD-Inzidenz). Dieser Infektionsweg ist mit einem 129MM-Genotyp assoziiert (Deslys et al. 1998). Patienten, die über eine periphere Infektionsroute erkranken, zeigen längere Inkubationszeiten und sind mit einem 129MV-Genotyp oder 129VV-Genotyp assoziiert (Deslys et al. 1998; Rudge et al. 2015). Ausnahmen zeigen jedoch, dass auch MM-homozygote Patienten Inkubationszeiten von über 30 Jahren aufweisen können – die längste dokumentierte Inkubationszeit liegt bei 42 Jahren (Brown P et al. 2012). Die Patienten präsentieren sich beim Erstkontakt mit zerebellären Symptomen, Myokloni, einem positiven Pyramidenbahnzeichen und einigermaßen erhaltener kognitiver Funktion und klagen häufig über eine Gangataxie sowie eine Dysästhesie der unteren Extremitäten (Rudge et al. 2015). Die klinischen Symptome zeigen sich stark progredient mit kognitiver Funktionsverschlechterung innerhalb von fünf bis 32 (im Durchschnitt 14) Monaten, sodass die Patienten innerhalb dieser genannten Zeitperiode versterben (Rudge et al. 2015).

1.6.3.6 iCJD - Apparative und histopathologische Diagnostik

Histopathologisch zeigen auch diese Patienten ein typisches Bild einer TSE im ZNS mit synaptischen Ablagerungen des PrP^{sc} sowie plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen in den Basalganglien, im anterioren frontalen und parietalen Kortex, Thalamus, und Cerebellum. Eine Ausnahme stellte der Patient mit der kürzesten Inkubationszeit dar – dieser zeigte eine atypische synaptische Verteilung von abnormalem PrP^{sc} und keine plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen (Rudge et al. 2015). Des Weiteren lässt sich, wie bei der sCJD und vCJD, das PrP^{sc} im Ganglion trigeminale nachweisen (Guiroy et al. 1989; Head et al. 2004). Ein Nachweis von PrP^{sc} in der Peripherie ist mit den bisherigen Methoden noch nicht gelungen (Hill et al. 1999a; Head et al. 2004). Im Rahmen der weiteren Diagnostik zeigt sich in der MRT eine eingeschränkte Diffusion in den Basalganglien, im Thalamus, Hippocampus sowie im frontalen und parazentralen motorischen Kortex und im zerebellären Vermis. Auch das EEG zeigt Auffälligkeiten und eine positive Liquorprobe auf das 14-3-3 Protein (Rudge et al. 2015).

1.6.3.7 Variante Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung – Geschichte und Epidemiologie

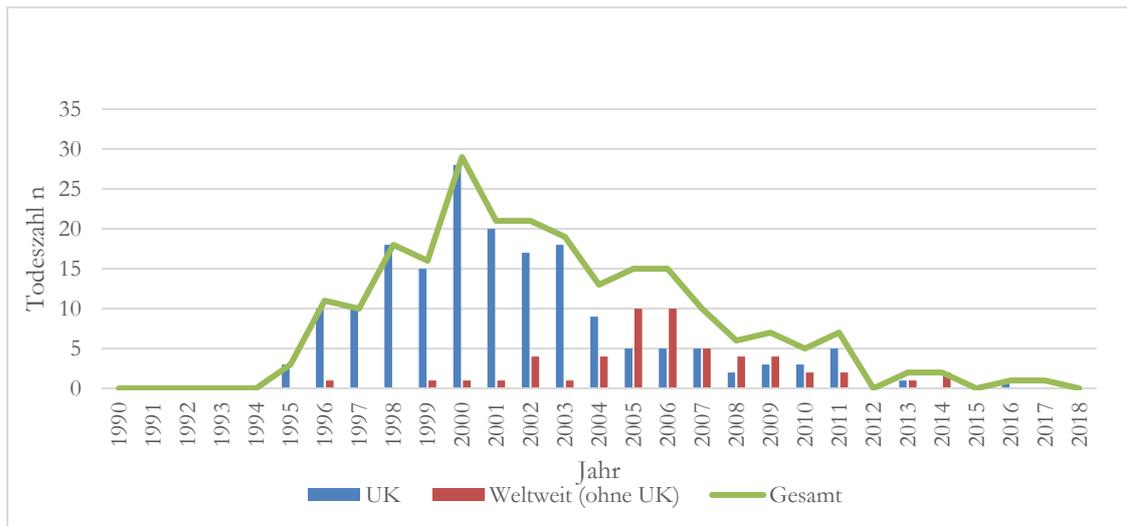


Abbildung 3: vCJD - Todeszahlen zwischen 1990 und 2018 im UK, weltweit und in der Gesamtzahl (NCJDRSU 2017/2018)

In der Gruppe der erworbenen menschlichen Prionerkrankungen existiert seit 1996 neben der Kuru-Krankheit und der iatrogenen Übertragungsmöglichkeit die variante Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. Nachdem 1995 von der bekannten Klinik im Rahmen der humanen Prionerkrankungen abweichende klinische Verläufe beobachtet wurden und sich in diesen Fällen ebenfalls eine abweichende Neuropathologie darstellte, wurden diese als eine neue Variante der CJD bezeichnet (Will et al. 1996). In den folgenden Jahren stieg die Anzahl der vCJD-Todesfälle stetig an und erreichte im Jahr 2000 ihren Höhepunkt mit 28 Toten allein in Großbritannien (NCJDRSU 2018), womit Großbritannien bis heute das europäische Land mit den meisten Todesfällen an vCJD darstellt. Im weiteren Verlauf meldeten elf weitere Länder Todesfälle - führend ist hier Frankreich mit 27 Toten bis zum Jahr 2017. Der Zenit der Todesfälle wurde im UK-Ausland jedoch in den Jahren 2005 und 2006 mit jeweils zehn Toten erreicht. Insgesamt wurden bis zum Jahr 2017 weltweit 228 Todesfälle durch die Variante der CJD gemeldet (NCJDRSU 2017). Erfreulicherweise zeigen die Zahlen jedoch im Verlauf der letzten Jahre einen deutlichen Rückgang mit aktuell nur einem Todesfall in Großbritannien und keinem bekannten Todesfall im Ausland (siehe Grafik Nr.3) (Diack et al. 2014). Die aktuelle Zahl an vCJD-Patienten in Großbritannien wird heute mit 178 Patienten beziffert (Knight 2017).

1.6.3.8 vCJD - Ätiologie

Die zeitversetzten Höhepunkte der Todesfälle in Großbritannien und Frankreich bzw. der anderen Länder konnten mit der Menge an Rinderproduktimporten aus Großbritannien von 1985 bis 1995 korreliert werden (Chadeau-Hyam und Alperovitch 2005) und der pathophysiologische Zusammenhang der vCJD-Entstehung durch Verzehr BSE-kontaminierter

Rinderprodukte durch die erfolgreiche experimentelle Übertragung durch zentrales und peripheres Gewebe von vCJD-Patienten auf Wildtyp- und transgene Mäuse bestätigt werden (Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997b; Ritchie et al. 2009). Sie wurde durch denselben Erregerstamm verursacht, der auch der BSE-Erkrankung in Rindern ursächlich war (Ward et al. 2006; Ritchie et al. 2009; Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997) und konnte klar von der menschlichen sporadischen Form der CJD (Collinge et al. 1996; Head et al. 2004b) und von der tierischen Scrapie-Erkrankung (Stack et al. 2002) abgegrenzt werden. Neben der Ätiopathogenese via BSE-kontaminierter Rinderprodukte wird heute die sekundäre Transmission via Blutprodukten von vCJD-Donoren diskutiert. Bis heute sind drei Fälle einer durch Blutprodukte hervorgerufenen vCJD-Infektionen bekannt (Urwin et al. 2016): (1) nach Erhalt einer Bluttransfusion eines im späteren Verlauf an vCJD-erkrankten Patienten (MM-homozygot), (2) asymptomatischer präklinischer Träger des PrP^{sc} im lymphoretikulären Gewebe (vCJD und MV heterozygot) nach Erhalt einer Bluttransfusion eines ebenfalls präklinischen vCJD-Patienten, der im Verlauf an der vCJD verstarb (Peden et al. 2004) sowie (3) asymptomatischer Patient mit postmortal detektiertem PrP^{sc} in der Milz nach Erhalt von multiplen Blutplasmatransfusionen bei Hämophilie (Peden et al. 2010).

1.6.3.9 vCJD - Klinik im Vergleich zur sCJD

Die an vCJD erkrankten Patienten sind in der Regel jünger als die mit iatrogener, hereditärer oder sporadischer Prionerkrankung und zeigen früh psychische Auffälligkeiten und einen längeren klinischen Verlauf (ca. 14 Monate im Vergleich zur sporadischen CJD mit vier Monaten). Des Weiteren klagte die Hälfte der Patienten über schmerzhaft sensorische Symptome, Chorea, Dystonie und Myoklonien. Alle entwickelten eine Ataxie, progressive Demenz, welche in einem akinetischen Mutismus endet (Will 2001).

1.6.3.10 vCJD - Apparative und histopathologische Diagnostik im Vergleich zur sCJD

Typisch für die vCJD sind im ZNS die sogenannten floriden Plaques, die sich durch einen Kern aus typischen Kuru-Plaques bzw. amyloiden Plaques mit einer Corona von spongiformer Veränderung auszeichnet. In höchster Konzentration findet man diese im Thalamus, jedoch weiterhin auch im gesamten Cortex und Cerebellum. Zudem sind kleinere, plaque-ähnliche PrP^{sc}-Ablagerungen in Form von perizellulären Ablagerungen im gesamten Cortex ebenfalls typisch für die vCJD sowie lineare PrP^{sc}-Ablagerungen in den Basalganglien. Eine definitive Diagnose der vCJD kann auch hier nur histopathologisch und mit Nachweis der Ablagerungen des PrP^{sc}-Typ 2 aus einer Hirnbiopsie bzw. im Rahmen einer postmortalen Autopsie gestellt werden (Hill et al. 1999b; Hill et al. 1999a). Hinweise können das EEG mit dem Fehlen der für die sCJD typischen sharp-wave-Komplexe (Binelli et al. 2006; Diack et al. 2014) oder die cMRT liefern. Hier zeigt sich in der FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) sowie in der DWI (diffusion weighted imaging) ein starkes Signal in der Pulvinarregion des Thalamus, das sogenannte Hockey-Stick-Sign (Zeidler et al. 2000). Die für die sporadische CJD typische Erhöhung des 14-3-3-Proteins im Liquor der Patienten trifft bei

den vCJD-Patienten nur zur Hälfte zu (Zeidler et al. 1997). Weitere, weniger invasive diagnostische Möglichkeiten können jedoch weiterhin in Betracht gezogen werden, z. B. der Nachweis von PrP^{sc} in der olfaktorischen Mukosa mit Hilfe der Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) (Orrú et al. 2014; Bongianni et al. 2017), welcher jedoch auch bei der sporadischen Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung positiv ist oder der Nachweis von PrP^{sc} mit Hilfe einer Tonsillenbiopsie (Hill et al. 1999a), wobei sich das PrP^{sc} aus den Tonsillen von dem im ZNS gefundenen PrP^{sc} unterscheidet (Hill et al. 1999a). Der PrP^{sc}-Nachweis im lymphatischen Gewebe von Tonsillen und Appendixes gelang sogar bereits in einem präklinischen Zustand (Schreuder et al. 1996). Zusätzlich lässt sich das PrP^{sc} bei der vCJD auch in der Retina, dem N. opticus, dem Thymus, der Nebenniere, Rektum und in der olfaktorischen Mukosa (Orrú et al. 2014; Bongianni et al. 2017) detektieren, jedoch nicht im Herzen, der Lunge, Pankreas, Niere, Leber oder Haut (Wadsworth et al. 2001). Desweiteren berichteten 2014 Moda et al. von einem positiven Testergebnis mit Hilfe der PMCA im Urin eines an vCJD erkrankten Patienten (Moda et al. 2014) und es kann vermerkt werden, dass ebenfalls Studien mit Hilfe von Blutuntersuchungen erfolgreich durchgeführt wurden, die über eine hohe Sensitivität und Spezifität berichteten (Edgeworth et al. 2011; Segarra et al. 2013; Jackson et al. 2014). Aus diesen Informationen wird ersichtlich, dass bereits bei klinisch unauffälligen Patienten, die im späteren Verlauf an der vCJD erkranken im peripheren lymphatischen Gewebe bzw. in der Blutbahn die pathologische Isoform des Prionproteins vorhanden sein kann und eine mögliche Infektionsroute auf gesunde Individuen durch sekundäre Übertragung möglich ist, sodass eine frühzeitige Diagnose (Hilton et al. 1998) der Erkrankung einen entscheidenden Schritt in der Unterbindung der Ausbreitung der neuen Variante der CJD darstellt.

1.6.3.11 Vergleich der erworbenen Prionerkrankungen in Bezug auf die PrP^{sc}-Akkumulation im LRS

Als Alleinstellungsmerkmal zeigt die vCJD eine deutliche Verteilung von PrP^{sc}-Ablagerungen im peripheren lymphoretikulären Gewebe (Hill et al. 1997a). Hier findet man das PrP^{sc} mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden, wie u. a. der Western-Blot-Technik in der Milz, in den Lymphknoten (zervikal, mediastinal, paraaortal und mesenterial), in höchster Konzentration in den Tonsillen (Hill et al. 1999a; Wadsworth et al. 2001) und in den Lymphfollikeln der Appendixwand, hier sogar noch vor Eintritt von klinischen Symptomen (Hilton et al. 2002). Das Signal kolokalisiert hier mit den Antikörpern, die CD35 und CD21-Zellen detektieren (Hill et al. 1999a). Eine in Großbritannien großangelegte Studie innerhalb der Geburtskohorte von 1961-1985, ergab eine PrP^{sc}-Prävalenz in Appendixes von 1 von 4000 Personen, jedoch mit einem großen 95%-Konfidenzintervall (Hilton et al. 2004a). Eine ca. zehn Jahre später, an Appendixes verschiedener Geburtskohorten durchgeführte Studie zeigte eine durchschnittliche Prävalenz von PrP^{sc} in 493 pro einer Million Einwohner bzw. in 1 von 2000 Personen (Gill et al. 2013). Im LRS bzw. außerhalb des ZNS oder PNS von Patienten mit sporadischer, iatrogenen, hereditärer CJD, sowie der Kuru-Erkrankung konnte

bislang, mit den konventionellen genannten histopathologischen und immunhistochemischen Methoden kein positiver Nachweis erfolgen (Hill et al. 1999a; Hilton et al. 2004b; Brandner et al. 2008; Collinge et al. 2008; Wadsworth et al. 2008).

1.7 Prionerkrankungen in Tieren

1.7.1 Die klassische Scrapie

1.7.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Die älteste, in Europa bekannte Transmissible Spongiforme Enzephalopathie ist die „Scrapie“ in Schafen, die bereits vor ca. 300 Jahren in Europa beschrieben wurde (McGowan 1922). Schon 1732 wurden Merinoschafe, die in England nach der Einfuhr aus Spanien beheimatet waren, dabei beobachtet, wie sie ein ungewöhnliches Verhalten zeigten. Heute ist die natürlich vorkommende Erkrankung endemisch in vielen Ländern mit Schafhaltung (Parry 1962; Collinge 2001). Eine 1990 erstellte Studie gibt die Prävalenz an Scrapie erkrankten Schafen in Großbritannien mit 2 von 1000 Schafen an (Morgan et al. 1990).

1.7.1.2 Klinik

Die Tiere zeigten einen veränderten, trabenden Gang, exzessives Lecken und intensives Kratzen, was im Reiben an Zäunen resultierte und namensgebend für diese Prionerkrankung „Scrapie“ war (Zabel und Reid 2015). Zusätzlich zeigten sie eine frühzeitige Ermüdbarkeit, eine generelle Kraftminderung bis hin zu der Unmöglichkeit sich wiederaufzurichten. Ebenso wurden eine progrediente Ataxie, eine Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems sowie Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen beobachtet. Diese neurodegenerative Erkrankung bei Schafen tritt gehäuft in einem Lebensalter von zwei bis fünf Jahren auf, wobei männliche und weibliche Tiere gleichmäßig betroffen sind (Dickinson 1976), verläuft immer chronisch, progressiv und führt in der Regel innerhalb von zwei Wochen bis sechs Monaten (Dickinson 1976), maximal innerhalb eines Jahres immer zum Tod der Tiere und so auch zur möglichen Elimination ganzer Herden (Parry 1962).

1.7.1.3 Übertragbarkeit und Ausbreitungswege im Schaf

Schon 1936 konnte gezeigt werden, dass „Scrapie“ zwischen Schafen und auch auf andere Spezies wie Ziegen (Cuillé und Chelle 1936) und Mäuse (Chandler 1961) übertragbar war und somit den TSE untergeordnet werden. Aufgrund der Übertragungsmöglichkeiten auf Mäuse und auch auf Hamster (Zlotnik und Rennie 1965) konnten Tiermodelle genutzt werden, um Vergleichsstudien zwischen Scrapie und der BSE in Rindern durchzuführen (Bruce et al. 2002). Ein mögliches zoonotisches Potential der Scrapie-Erkrankung konnte 2015 durch die Übertragung von Scrapie auf Primaten (Makaken) gezeigt werden (Comoy et al. 2015). Innerhalb der Spezies Schaf werden, wie bei der CWD (Groschup et al. 2001) aber jedoch im Gegensatz zu den humanen erworbenen Prionerkrankungen, sowohl horizontale

als auch vertikale (Pattison et al. 1974) Übertragungsmechanismen beobachtet (Begrifflichkeiten s. Kapitel 4.3.3), wobei bezüglich der horizontalen Übertragungsmöglichkeit verschiedene Eintrittspforten diskutiert werden. Aufgrund der hohen Resistenz und langen Überlebensfähigkeit der Prionen auf z. B. Weideflächen oder Zäunen (Brown und Gajdusek 1991) stellt die orale Aufnahme die primäre Eintrittspforte dar. Neben diesen Quellen wird zusätzlich kontaminiertes Tiermehl (Nathanson et al. 1997; Pattison et al. 1974; Hadlow et al. 1982; Andréoletti et al. 2000; van Keulen et al. 2000) diskutiert. Nach oraler Aufnahme tritt das PrP^{sc} vor allem über die Mukosa des Ileums in das lymphoretikuläre System (LRS) ein. Hier kann es als erstes in den Peyerschen Plaques detektiert werden. Anschließend akkumuliert und repliziert sich das infektiöse Agens in den mesenterialen Lymphknoten, den Tonsillen, den lymphatischen Zellen des GALT sowie der Milz (Andréoletti et al. 2000; Kujala et al. 2011; McCulloch et al. 2011), auch wenn das Tier noch keine klinischen Symptome zeigt (Hadlow et al. 1982; Groschup, et al. 1996; Race et al. 1998). Über parasymphatische und sympathische Nerven des autonomen Nervensystem gelangt es in das Nervensystem (Neuroinvasion) und tritt dann über das thorakale Rückenmark in das ZNS ein und gelangt in das Gehirn, von wo es sich wieder zentrifugal auf unterschiedliche periphere Gewebe, z. B. muskuläres Gewebe (Beekes und McBride 2007), Nebennieren, Pancreas, Herz, Blase, Brustdrüsen, Lunge, Leber und Nieren verteilt. Des Weiteren werden die orale bzw. nasale Aufnahme via der in der Schleimhaut enthaltenen Nervenstrukturen (Brotherston et al. 1968; Dickinson et al. 1974; Brown und Gajdusek 1991; Carp 1982; Taylor et al. 1996) diskutiert. Die Neuroinvasion kann hierbei ohne Beteiligung des LRS erfolgen (Bartz et al. 2003).

1.7.1.4 Histopathologie und immunhistochemischer Nachweis von PrP^{sc} im peripheren Gewebe

Neben klinischen Diagnosekriterien, wie dem Tod des Tieres unter Beobachtung, lassen sich histopathologisch im ZNS typischerweise eine Vakuolisierung der grauen Substanz (Begara-McGorum et al. 2000; Begara-McGorum et al. 2002) sowie immunhistochemisch verschiedene Ablagerungsformen des PrP^{sc}, u. a. Amyloid-Plaques (Miller et al. 1993; van Keulen et al. 1995; Spiropoulos et al. 2007) nachweisen. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden, und hier muss vor allem die sensitive PET-Blot-Methode erwähnt werden, ist es gelungen, auch außerhalb des zentralen Nervensystems das PrP^{sc} zu detektieren. Zu diesen Geweben zählt die Retina, die Plazenta, die Muskulatur, das olfaktorische System, das periphere Nervensystem in Form von peripheren Nerven und Ganglien, die Niere sowie die Haut (Andréoletti et al. 2002; Andréoletti et al. 2004; Corona et al. 2009; Thomzig et al. 2007; Ligios et al. 2007). Im peripheren lymphatischen Gewebe zeigen vor allem die enterischen Nervenplexus in der Wand des Dick- und Dünndarms (van Keulen et al. 2000), das GALT, drainierende Lymphknoten, die Milz sowie die Tonsillen punktförmige, feingranuläre und feinretikuläre PrP^{sc}-Ablagerungen (Andréoletti et al. 2000). Hier kann das PrP^{sc} vor allem in den Keimzentren der Lymphfollikel sowie in Makrophagen detektiert werden (Jeffrey et al. 2001).

1.7.1.5 Genetik

Die Empfänglichkeit sowie die phänotypische Ausprägung werden jedoch stark durch genetische Einflüsse (Moore et al. 1998) modifiziert (Belt et al. 1995; Cloucard et al. 1995). Bislang sind drei Polymorphismen beschrieben, die über verschiedene polymorphe Allele unterschiedliche Genotypen hervorrufen (Belt et al. 1995). Bis heute sind mehr als 15 verschiedene Scrapie-Erregerstämme bekannt (Bruce et al. 1991), die sich in unterschiedlichen Parametern wie u. a. Suszeptibilität, Inkubationszeit, Verteilungsmuster der histopathologischen Veränderungen im ZNS oder Proteinase-K-Sensitivität voneinander unterscheiden (Bruce und Fraser 1982; Bruce et al. 1991). Seit dem Jahr 1998 ist eine atypische Variante der Scrapie-Erkrankung in Schafen, als atypische/Nor98-Scrapie bezeichnet (Benestad et al. 2003), bekannt.

1.7.2 Klassische Bovine Spongiforme Enzephalopathie

1.7.2.1 Geschichte und Epidemiologie

Die ‚Bovine Spongiforme Enzephalopathie‘ (BSE) wurde zum ersten Mal 1986 in Großbritannien beschrieben (Wells et al. 1987). Der Höhepunkt der BSE-Epidemie konnte in Großbritannien 1993 mit einer Jahresinzidenz von rund 1% (Hörnlmann 2001c) vermerkt werden. Seitdem sank die Inzidenz deutlich, sodass Mitte 1996 nur noch ein viertel der maximalen Zahl des Jahres 1993 gezählt wurde (Nathanson et al. 1997). Insgesamt wurden zwischen dem Jahr 1986 und 2000 176069 BSE-Fälle diagnostiziert (Brown N 2000), was 97,65% aller diagnostizierten BSE-Fälle global ausmacht (Hörnlmann 2001c). Die BSE-Erkrankung konnte durch epidemiologische Studien auf die Zufütterung eines mit dem Scrapie-Agens aus infizierten Schafskadavern verseuchten diätischen Proteinzusatzes (Meat and bone meal (MBM)) bei abgestillten Kälbern ab 1980/81 zurückgeführt werden (Wilesmith et al. 1991; Wilesmith et al. 1991, Wilesmith et al. 1988, Taylor 1989; Ernst und Race 1993). Diese Entstehungstheorie wird auch als Scrapie-Hypothese bezeichnet (Hörnlmann 2001c). Als neue Entstehungstheorie werden die kürzlich entdeckte atypische, und wahrscheinlich genetische oder sporadische Variante der BSE (H-BSE oder L-BSE als BASE) diskutiert, die dann den Eintritt in die Nahrungskette fand (Capobianco et al. 2007). Die Epidemie wurde vermutlich durch die Verfütterung von rezykliertem BSE-kontaminiertem Fleisch an andere Tiere verstärkt, bevor die BSE-Erkrankung bekannt und die erkrankten Tiere klinisch auffällig wurden (Nathanson et al. 1997). Auch in anderen europäischen Ländern wurden BSE-Fälle gemeldet, doch die Inzidenz ist im Vergleich mit Großbritannien sehr gering (Nathanson et al. 1997) und stieg erst an, nachdem das kontaminierte MBM importiert wurde, sodass diese Zunahme vermutlich auch auf die gleichen, o. g. Gründe zurückzuführen ist (Nathanson et al. 1997). Im Jahr 2000 wurden in Großbritannien nur noch 1201 Fälle gemeldet.

1.7.2.2 Klinik

Bei den Rindern fallen zum einen klinische Symptome wie eine Verhaltensänderung, im Sinne eines nervösen, ängstlichen oder selten auch aggressiven Verhaltens, eine Ataxie, Fallneigung, Tremor sowie eine Dysästhesie (Wilesmith et al. 1988) auf. Das Manifestationsalter der Rinder liegt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 4,5 Jahren (Hörnlimann 2001c). Der Verlauf der Erkrankung erstreckt sich über Wochen bis Monate mit progredienten Symptomen, was zur Tötung der Tiere innerhalb von wenigen Monaten führt (Wilesmith et al. 1988).

1.7.2.3 Histopathologie und immunhistochemischer Nachweis von PrP^{sc} im peripheren Gewebe

Für die TSE typisch lässt sich auch hier die spongiöse Degeneration (s. Kapitel 1.6.1) (Wells et al. 1987) histopathologisch detektieren. Immunhistochemisch lassen sich unterschiedliche feine Ablagerungsmuster des PrP^{sc}, z. B. glial, granulär, linear, intraneuronal, perineuronal, intragial oder verschmelzend, detektieren. Typischerweise findet man auch hier, wie in der Scrapie-Erkrankung die plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen (Corona et al. 2017). Als erstes muss festgestellt werden, dass der PrP^{sc}-Nachweis zwischen experimentell und natürlich infizierten Tieren variiert (Terry et al. 2003; Iwata et al. 2006). In natürlich erkrankten Tieren gelingt der Nachweis mit Methoden wie der Immunhistochemie, dem Western-Blot oder PMCA im peripheren Nervensystem im Plexus myentericus des distalen Ileums (Iwata et al. 2006), in peripheren Nerven (Masujin et al. 2007), der Nebenniere (Iwata et al. 2006; Masujin et al. 2007), in den Peyerschen Plaques des distalen Ileums, die als Eintrittspforte diskutiert werden sowie in den Tonsillen (Wells et al. 2005; Iwata et al. 2006; Espinosa et al. 2007) und unterscheidet sich diesbezüglich durch einen geringeren Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen von Scrapie-Schafen sowie von vCJD-Patienten. Auch die nasale Mukosa wird verdächtigt, das PrP^{sc} aufzuweisen (Balkema-Buschmann et al. 2011). In experimentell infizierten Schafen, Hamstern und Mäusen gelingt zusätzlich zu den oben genannten Geweben der Nachweis in der Muskulatur, der Retina und in der Milz (Lezmi et al. 2006a). Im lymphatischen Gewebe wird das PrP^{sc} vornehmlich in den Keimzentren der Lymphfollikel, in den FDCs und in den Makrophagen detektiert.

1.7.2.4 Übertragbarkeit

Im Vergleich zu anderen tierischen Prionerkrankungen, wie der Scrapie und der CWD (s. Kapitel 1.7.1.3) ist bislang nur der orale und somit horizontale Infektionsweg gesichert. Weitere horizontale und auch vertikale Übertragungsmechanismen werden jedoch aktuell diskutiert (Foster 2004; Jeffrey et al. 2015). Weiterhin scheinen, im Gegensatz zu anderen tierischen und menschlichen Prionerkrankungen, keine genetischen Faktoren zu existieren, die die BSE-Empfindlichkeit, wie bei der Scrapie bzw. den humanen Prionerkrankungen erhöhen (Wijeratne und Curnow 1990; Donnelly et al. 1997). 1988 konnte zum ersten Mal die BSE auf eine andere Spezies, Mäuse, experimentell übertragen werden (Fraser et al. 1988).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Übertragung des BSE-Agens die feline spongiforme Enzephalopathie verursachte (Fraser et al. 1994; Collinge et al. 1996), in Huftier und anderen Säugetieren eine TSE auslöste (Sigurdson und Miller 2003) und ursächlich für die vCJD ist (Will et al. 1996) (s. Kapitel 1.6.3.8). In der jeweiligen neuen Wirtsspezies zeigt sich bei ähnlicher Neuropathologie und ähnlichem PrP^{sc}-Typ (Bruce et al. 1997) eine differierende Ablagerung von PrP^{sc} in peripheren Geweben (s. Kapitel 1.7.2.3, 1.6.3.10).

1.7.2.5 Ausbreitungswege

Das Wissen über die Ausbreitungs- und Übertragungsmechanismen nach oraler Aufnahme entstammt aufgrund der epidemiologischen und phänotypischen Eigenschaften der BSE-Erkrankung vornehmlich experimentellen Erkenntnissen (Corona et al. 2017). Hier zeigt sich ein Scrapie- und vCJD-ähnlicher Verlauf mit Akkumulation und Replikation im LRS über M-Zellen, Peyerschen Plaques im distalen Ileum und Jejunum (GALT), in follikulären dendritischen Zellen und Makrophagen, Akkumulation in den Tonsillen (Terry et al. 2003; Hoffmann et al. 2011) und schließlich die Neuroinvasion über das enterische (mesenterialer und coeliacaler Ganglienkomplex, Nn. Splanchnici), sympathische (lumbales/thorakales Rückenmark) und parasymphatische (N. vagus) Nervensystem. Zentrifugal breitet sich das PrP^{sc} nach Replikation im ZNS über das periphere Nervensystem (z. B. hintere spinale Nervenwurzel und den N. ischiadicus) retrograd aus (Hoffmann et al. 2007).

1.7.2.6 Erregerstämme

Die Übertragung der BSE auf verschiedene Spezies führte nach experimentellem Beweis durch Mausmodelle zu der Vermutung, dass die BSE, im Gegensatz zur Scrapie und humanen Prionerkrankungen (Bruce et al. 2002), nur durch einen Erregerstamm ausgelöst wird (Bruce et al. 1994). Das für den BSE-Erregerstamm charakterisierende PrP^{sc} ist der Typ-2 mit stark diglykosyliertem Anteil, welcher sich auch in der vCJD findet (Hill et al. 1997b).

1.8 Ausbreitungswege nach sekundärem Kontakt mit humanen Prionerkrankungen auf Grundlage verschiedener Scrapie-Maus-Modelle

1.8.1 Sekundäre Übertragungsmöglichkeiten und Eintrittspforten

Eine sekundäre Übertragung ist bislang durch eine iatrogene Infektion (zentral oder peripher) (s. Kapitel 1.6.3.4 – 1.6.3.6), eine orale PrP^{sc}-Aufnahme (Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997; Ward et al. 2006; Ritchie et al. 2009) oder durch Blut- und Plasmatransfusionen von vCJD-Patienten beschrieben worden (Urwin et al. 2016). Als weitere mögliche Infektionswege werden der transdermale und konjunktivale Weg (z. B. im Rahmen der Kuru-Epidemie) diskutiert. Das infektiöse Gewebe muss kein zentralnervöses Gewebe sein, sondern ist sehr divers und umfasst auch das lymphatisches Gewebe, Haut und Körperflüssigkeiten wie

Speichel (Beekes und McBride 2007). Eine erfolgreiche Neuroinvasion kann entweder über die Akkumulation und Replikation im LRS führen (Beekes und McBride 2007; Marín-Moreno et al. 2017) oder direkt, ohne die Beteiligung des LRS (Baldauf et al. 1997; Beekes und McBride 2007).

1.8.2 Von der oralen PrP^{sc}-Aufnahme bis zur Neuroinvasion

1.8.2.1 PrP^{sc}-Akkumulation und Replikation im lymphatisch-retikulären System (LRS)

Schon wenige Wochen nach peripherem Kontakt mit dem pathologischen Prionprotein misst man in den sekundären lymphatischen Organen (SLOs), wie in der Milz, Lymphknoten, MALT, Appendix und in den Tonsillen hohe Konzentrationen der pathologischen Isoform, die schnell ein Plateau erreichen, welches über die gesamte Krankheitsdauer hinaus bestehen bleiben kann (Mabbott et al. 2000; Brown KL et al. 1999). Ein Beispiel aus dem Bereich der tierischen Prionerkrankungen, der Chronic Wasting Disease zeigt, dass bereits nach einem bis zwei Monaten nach Prionexposition erste PrP^{sc}-Konzentrationen im oropharyngealen lymphatischen Gewebe detektiert werden können und sich das PrP^{sc} nach drei Monaten systemisch in jedem lymphatischen Gewebe ausgebreitet hat. Nach vier Monaten erreicht das PrP^{sc} eine Konzentration, die normalerweise bei terminal erkrankten Tieren im lymphatischen Gewebe gefunden wurde, jedoch ohne, dass das Tier eine klinische Symptomatik zeigt (Hoover et al. 2017). Zu den sekundären lymphatischen Organen des Magen-Darm-Traktes gehören u.a. - als Teil des GALT - die Peyerschen Plaques sowie die isolierten Lymphfollikel, die aus einem Keimzentrum mit spezifischen B-Zellen und einem Netzwerk aus FDC bestehen (Glaysher und Mabbott 2007). Hier kann man schon wenige Tage nach der Prioninfektion das PrP^{sc} in follikulären dendritischen Zellen detektieren (Kujala et al. 2011; Donaldson et al. 2015; Prinz et al. 2003). Um in dieses lymphatische Gewebe aus dem Darmlumen zu gelangen, muss das PrP^{sc} das über tight-junctions verbundene, aus Epithelzellen bestehende einschichtige Follikel-assoziierte Epithel intakt und in für eine Infektion ausreichender Menge überwinden (Mabbott 2012). In diesem FAE finden sich die sogenannten transzytotischen M-Zellen (Microfold-Cells) (Mabbott 2012), die in ihrer physiologischen Funktion Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen, diese transepithelial transportieren und dann dem Immunsystem über die Weitergabe an antigenpräsentierende Zellen (APC) präsentieren, und so, wenn nötig, eine Immunreaktion initiieren können (Knoop et al. 2009). Für die intestinale Aufnahme des PrP^{sc} zeigt sich, dass vor allem die Peyerschen Plaques im Dünndarm entscheidend für die Aufnahme des PrP^{sc} aus dem Darmlumen sind (Donaldson et al. 2015). Zwei mögliche Wege werden aktuell diskutiert, wie das PrP^{sc} aus dem Darmlumen in das GALT gelangen könnte, und es wird spekuliert, dass diese unterschiedlichen Möglichkeiten auch zwei unterschiedliche Immunreaktionen des Organismus hervorrufen können (Mabbott 2012). Der Erste führt das PrP^{sc} - wie länger angenommen - über die o. g. M-Zellen im FAE, dann a) zur basolateralen Membran nahe des subepithelialen Doms, wo sie in Kontakt mit den FDC treten, in denen sie sich für

eine erfolgreiche Neuroinvasion ungestört replizieren können, oder b) nach Kontakt der M-Zellen mit den FDC über diese mobilen FDC in die B-Zell-Follikel im GALT bzw. weiter u.a. via B-Zellen in die mesenterialen Lymphknoten (Banchereau et al. 2000; Liu et al. 2001) zur Präsentation der Antigene an die T- und B-Zellen (Delamarre et al. 2005; Bergtold et al. 2005) oder c) über sogenannte TNTs (tunnelling nanotubes) (Gousset et al. 2009) - die sich an der Kontaktstelle der Dendriten der MNPs zu den M-Zellen im Bereich der basolateralen Membran ebendieser befinden und hier fast eins zu eins verschaltet sind (Wang et al. 2011) - zu Lymphozyten und/oder mononukleären Phagozyten (MNP = Makrophagen und klassische dendritische Zellen (DC)), wo sie weiter prozessiert werden (Neutra et al. 1996). Der zweite, von den M-Zellen unabhängige Weg führt über die im FAE-angesiedelten Enterozyten, die dann im subepithelialen Bereich eher mit MNP-ähnlichen Makrophagen in Kontakt treten, was folglich zur Phagozytose des PrP^{sc}, zu dessen Zerstörung und konsekutiv zu einer Verzögerung einer erfolgreichen Neuroinvasion führt (Carp und Callahan 1982; Maignien et al. 2005; Kujala et al. 2011; Mabbott 2012). Eine entscheidende Eigenschaft der FDC im Rahmen des erstgenannten Ausbreitungsweges ist, dass sie die Antigene unprozessiert und somit funktionsfähig internalisieren (Wykes et al. 1998; Macpherson und Uhr 2004) und auch als ein Reservoir für Komplementopsonierte prionhaltige Proteinkomplexe fungieren können (Klein et al. 2001; Mabbott 2012). So agieren sie als eine Art "Trojanisches Pferd" (Beekes und McBride 2007), in dem sich das PrP^{sc} ungestört replizieren und akkumulieren kann. Diese Replikation ist ein entscheidender Schritt bezüglich einer effizienten Neuroinvasion des PrP^{sc} (Mabbott et al. 2003; Prinz et al. 2003; McCulloch et al. 2011). Eine Akkumulation des PrP^{sc} lässt sich jedoch nur auf der Zelloberfläche im Bereich der Dendriten nachweisen, was zu der Annahme führt, dass die Akkumulation sowie die de-novo-Konversion der pathologischen Isoform hier stattfindet, was durch die Zunahme der Densität im Bereich der Dendriten bei Fortschreiten der Erkrankung bestätigt wird (Kujala et al. 2011; Mabbott 2012). Eine erfolgreiche Neuroinvasion modulierende Faktoren bezüglich der FDC stellen der tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) und lymphotoxin beta receptor (LTbetaR) dar. Vor allem der LTbetaR-Faktor induziert die Differenzierung von hochendothelialen Venolen, über die vermutlich das pathologische Prionprotein aus dem Lymphknoten in die Blutbahn gelangen kann (Mabbott et al. 2003; Beekes und McBride 2007; O'Connor und Aguzzi 2013). Noch bevor das infektiöse Agens vom GALT dann das enterische Nervensystem erreicht, kann ein positives Signal in der Milz detektiert werden (van Keulen et al. 2002). Es ist sogar möglich, dass eine maximale Konzentration des PrP^{sc} in der Milz eines klinisch unauffälligen Patienten über Jahrzehnte hinweg bestehen bleibt, obwohl dieses PrP^{sc} bei Übertragung auf gesunde Individuen zu 100% in einem tödlichen Verlauf der vCJD endet (Béringue et al. 2008). Jedoch muss angemerkt werden, dass eine Splenektomie bei mit CJD intragastral infizierten Mäusen keinen Effekt auf die Inkubationszeit zeigte (Mohri et al. 1987; Beekes und McBride 2007), sodass die Rolle der Milz weiterhin bezüglich des Prozesses der Neuroinvasion nach oraler Infektion untersucht werden muss (Beekes und McBride 2007). Doch wie das PrP^{sc} dann von den SLO in das ZNS gelangt, ist nach wie vor unklar. Es wird

angenommen, dass dieser Eintritt in das ZNS über das Rückenmark bzw. den N. vagus (Baldauf et al. 1998) entlang von sympathischen und parasympathischen Nervenfasern ausgehend vom enterischen Nervensystem geschieht (Kimberlin und Walker 1979; McBride und Beekes 1999; Kujala et al. 2011).

1.9 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen in postmortal gewonnenem, humanem, lymphatischem Gewebe von Patienten, die an der sporadischen Form der CJD verstorben waren. Diese Untersuchung wurde vor dem Hintergrund des positiven Nachweises von PrP^{sc}-Ablagerungen bei der varianten Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) in peripherem lymphatischem Gewebe durchgeführt, dessen Nachweis prä mortal genutzt werden kann, um stille Träger der vCJD frühzeitig zu diagnostizieren. Bisherlang konnte mit herkömmlichen Methoden, wie dem Western-Blot oder der Immunhistochemie kein Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen in den o. g. Gewebe erbracht werden (Hill et al. 1999a). Doch wiesen diese angewandten Methoden eine ausreichende Sensitivität auf, um die erbrachten negativen Ergebnisse sicher als negativ werten zu können? War die Detektionsschwelle der genannten Methoden gering genug? Die zurzeit sensitivste Methode zum Nachweis von abgelagerten Proteinaggregaten ist die PET-Blot-Methode (Schulz-Schaeffer et al. 2000b), mit der jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine systematische Analyse des humanen, peripheren lymphatischen Gewebes auf PrP^{sc}-Ablagerungen erfolgt ist. Somit ist die Annahme nach Durchführung der anderen, weniger sensitiven Methoden, dass das periphere, lymphatische Gewebe bei der sCJD frei von PrP^{sc}-Ablagerungen ist, nur eingeschränkt verifiziert und nicht ausreichend gesichert, insbesondere vor dem Hintergrund möglicher positiver Nachweise von PrP^{sc} im Blutplasma von Patienten, die nachweislich an der sporadischen Form der CJD erkrankt sind (Douet et al. 2014). Diesbezüglich inkludierte ich in unsere Studie auch die Untersuchung von Krur von sCJD-Patienten. Um einen möglichst validen diagnostischen Test zur Früherkennung der vCJD bei klinisch noch asymptomatischen Patienten entwickeln zu können, muss gewährleistet sein, dass ein positives Testergebnis tatsächlich nur für die vCJD spricht und andere Prionerkrankungen, vor allem die sporadische CJD aber auch hereditäre Prionerkrankungen (FFI, GSS) und die iatrogene Form der CJD sowie andere neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung, als negatives Testergebnis gewertet werden können. Ebenfalls können mit einem möglichen diagnostischen Testverfahren über die Analyse des peripheren lymphatischen Gewebes, z.B. via einer Tonsillenbiopsie, wichtige epidemiologische Fakten erhoben werden, z. B. die Prävalenz sowie die Inzidenz der vCJD innerhalb eines Landes. Um dieses Ziel erreichen zu können, muss jedoch vorerst sichergestellt werden, dass andere o.g. Prion- und neurodegenerative Erkrankungen, keine PrP^{sc}-Ablagerungen im peripheren, lymphatischen Gewebe aufweisen bzw. nicht mit den heute möglichen laborchemischen Methoden detektierbar sind. Ziel der hier vorgestellten Studie war es somit im peripheren, lymphatischen Gewebe an sCJD-verstorbener Patienten und in anderen Geweben, in denen

vormals bei an vCJD-verstorbenen Patienten PrP^{sc}-Ablagerungen detektiert wurden (z.B. Lamina propria der Riechschleimhaut, Blut, lymphatisches Gewebe), mittels der aktuell sensitivsten PET-Blot-Methode PrP^{sc}-Ablagerungen zu detektieren. Ein negatives Ergebnis legt nahe, dass mit den heute vorhandenen laborchemischen Methoden, kein PrP^{sc}-Nachweis in peripherem, lymphatischem Gewebe bei sCJD-Patienten erbracht werden kann, sondern nur in entsprechendem Gewebe von vCJD-Patienten, was auch bezüglich der verschiedenen diskutierten Ausbreitungsmechanismen in humanen Prionerkrankungen eine entscheidende Erkenntnis darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Gewebeproben

2.1.1.1 Sporadische CJD-Fälle

Die hier verwendeten Gewebeproben von 18 sporadischen CJD-Fällen entstammten dankenswerterweise der Gewebebank der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Institut für Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Straße 40 (UBFT-Gebäude), 37099 Göttingen). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde in Paraffin eingebettetes peripheres Gewebe verwendet, welches im Rahmen von Sektionen in den Jahren zwischen 2011 bis 2014 gewonnen und für die histologische Aufarbeitung eingebettet werden konnte, sodass der Erwerb des sCJD-Probenmaterials inklusive ihrer anatomischen und histologischen Präparation von Mitarbeitern dieser o. g. Abteilung durchgeführt wurde und ich dieses ab 2015 freundlicherweise für diese Arbeit nutzen durfte. Letzlich konnten nur Gewebeproben von 17 sCJD-Fällen verwendet werden, da bei Fall-Nr. elf ein Fehler im Rahmen des Einbettungsvorgangs das Gewebe porös werden und sich dieses konsekutiv nicht mehr adäquat mit dem Mikrotom schneiden ließ. Den Überblick über die verwendeten peripheren Gewebe, ihre Anzahl ($n=x$ zeigt die insgesamt für die Auswertung verwendete Gesamtanzahl; x zeigt die Anzahl inkl. des o. g. fehlerhaften Gewebes) sowie ihre Zuordnung zum jeweiligen Geno- und Priontyp zeigt die Tabelle 1. Einen Überblick über die Anzahl, den 129M/V-Polymorphismus des PRNP-Gens sowie über den Priontyp der hier verwendeten Gewebe zeigt die Tabelle 2. Die Diagnose, der Priontyp und Genotyp wurden für jeden hier verwendeten sCJD-Fall als erhaltene Fremddienstleistung in der o. g. Abteilung ermittelt.

Tabelle 1: Auflistung und Anzahl der verwendeten sCJD-Fälle (inkl. des 129M/V-Polymorphismus des *PRNP*-Gens und Priontyps), deren in Paraffin-eingebettetes Gewebe verwendet wurde.

Fallnummer	Genotyp	Priontyp	Lymphknoten	Tonsille	Appendix	GALT†	Milz	Olfakt. Mukosa‡	Kruor	Schilddrüse	Peripheres NS† +	Vesica	Haut	Parotis	Nebenniere	Pankreas
1	MV	2	1	-	-	4	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1
2	MM	1	2	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3	MM	1	3	-	-	3	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-
4	MM	1	4	1	-	7	2	1	1	-	3	1	1	-	-	-
5	MM	1	4	-	1	3	1	1	-	-	1	-	1	1	-	-
6	MM	1	4	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
7	VV	2	8	1	-	2	1	1	1	-	-	-	1	2	-	-
8	MM	1	5	2	1	2	1	1	1	-	-	-	1	1	-	-
9	VV	2	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-
10	MV	2	3	1	1	4	1	1	1	-	1	-	1	-	-	-
[11]	VV	2	5	1	1	2	1	1	1	-	-	-	1	1 ¹	1	-]
12	MM	-	2	1	1	4	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
13	MV	2	3	1	1	4	1	1	1	-	-	-	1	1	-	-
14	VV	2	4	1	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
15	MM	1	2	1	-	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
16	MV	2	2	1	1	1	1	1	1 ²	-	-	-	-	-	-	-
17	MM	1	1	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
18	MM	1	3	-	1	2	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Gesamt			n=52(57)	n=12(13)	n=10(11)	n=42(44)	N=17(18)	N=16(17)	N=12(13)	n=1	n=6	n=1	n=9(10)	n=6	n=0(1)	n=1

† Fall-Nr. 18: Jejunum 1/2, Ileum 1/2; 17: term. Ileum 1/1; 16: term. Ileum 1/1; 15: Duodenum 1/2, term. Ileum 1/2; 14: Duodenum 1/2, term. Ileum 1/4; 13: Duodenum 1/4, Jejunum 1/4, term. Ileum 1/4, Kolon 1/4; 12: Magen 1/4, Duodenum 1/4, term. Ileum 1/4, Rektum 1/4; [11]; 10: Duodenum 1/4, Ileum 2/4, Kolon 1/4; 8: Ileum 2/2; 7: Darm, nicht näher bezeichnet 2/2; 5: Magen 1/3, Duodenum 1/3, Ileum 1/3; 4: Ösophagus 1/7, Magen 2/7; term. Ileum 2/7, Rektum 2/7; 3: Magen 1/3, Duodenum 1/3, term. Ileum 1/3; 2: term. Ileum 1/1; 1: Magen 1/4, Duodenum 1/4, Jejunum 1/4, Ileum 1/4

‡ + Concha nasalis n=1: Fall-Nr.: 8, 9 und 10 †† Fall-Nr. 10: N. vagus links; Fall-Nr. 18: N. ischiadicus

¹ (Gl. submandibularis)

² (+ venöser Thrombus n =1)

Tabelle 2: Anzahl, Genotyp (M/V-Polymorphismus an Codon 129 des PRNP-Gens) und Priortyp der hier verwendeten sCJD-Gewebetypen

129M/V-Polymorphismus des <i>PRNP</i> -Gens	Priortyp	Anzahl n
MM	1	8
MM	2	0
MM	x	1
MV	1	0
MV	2	4
VV	1	0
VV	2	4(5)

2.1.1.2 Humane Gewebeproben als Negativkontrollkollektiv

Die hier verwendeten sechs Gewebeproben erhielt ich ebenfalls dankenswerterweise aus der Gewebebank der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Institut für Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Straße 40 (UBFT-Gebäude), 37099 Göttingen). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde in Paraffin eingebettetes peripheres Gewebe verwendet, welches im Rahmen von Sektionen in den Jahren zwischen 2011 bis 2013 gewonnen und für die histologische Aufarbeitung eingebettet werden konnte. Die gestellte und hier angegebene Diagnose der Patienten, deren Gewebe hier verwendet wurde, der angegebene Polymorphismus an Codon 129 des PRNP-Gens sowie die vorangestellte anatomische und histologische Präparation erhielt ich somit freundlicherweise als Fremddienstleistung aus der o. g. Abteilung. Einen Überblick über die Diagnose, den Genotyp und die Anzahl sowie den Typ des verwendeten Gewebes gibt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Überblick über Diagnose (AD; iCJD; Entz. = entzündliche ZNS-Erkrankung; FTD, DLB), Genotyp (M/V-Polymorphismus an Codon 129 des *PRNP*-Gens) und Anzahl der Gewebearten (LK=Lymphknoten) der verwendeten humanen Negativkontrollfälle

Fallnummer	Diagnose	Genotyp	LK	Tonsille	Appendix	GALT†	Milz	Olfakt. Mukosa ‡	Kruor	Schilddrüse	Peripheres NST †	Vesica	Haut	Parotis	Nebenniere	Pankreas
1	AD	VV	4	-	-	6	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-
2	AD	MV	1	1	1	4	1	-	1	-	-	-	1	1	-	-
3	iCJD	MM	2	1	-	6	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
4	Entz	-	2	-	-	2	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
5	FTD	MV	5	1	-	5	2	1	1	-	-	-	1	-	-	-
6	DLB	MV	6	1	-	3	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-

†Fall-Nr. 1: Magen 1/6, Duodenum 1/6, Jejunum 1/6, Ileum 1/6, Kolon 1/6, Rektum 1/6; 2: Duodenum 2/4, distales Ileum 2/4; 3: Ösophagus 1/6, Magen 1/6, Duodenum 1/6, Jejunum 1/6, Ileum 1/6, Rektum 1/6; 4: Magen 1/5, Duodenum 2/5, terminales Ileum 2/5; 5: Magen 1/3, terminales Ileum 1/3, Kolon 1/3; 6: unbekannt (Darm) ‡ + Concha nasalis n=1: Fall-Nr.: 4, 5 und 6 †† Fall-Nr. 3: N. brachialis; Fall-Nr. 6: N. radialis

2.1.1.3 Klassische Scrapie-Gewebeproben als Positivkontrollkollektiv

Die hier verwendeten Positivkontrollgewebe entstammen dem lymphatischen System von Schafen, die an der klassischen Form der Scrapie erkrankt waren. Ich erhielt das Gewebe auf Nitrozellulosemembranen bereits, nach publiziertem Protokoll auf Grundlage der PET-Blot-Methode zwischen 2007 und 2011 gefärbt (oviner PrP-Primärantikörper P4, monoklonal, Epitop 89–104 (Hardt et al. 2000); verwendete Verdünnung: 1:5000), dankenswerterweise als Fremddienstleistung von Dr. med. vet. Wiebke Wemheuer (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, 66421 Homburg/Saar) (Wemheuer et al. 2009a; Wemheuer et al. 2009b). Somit stellen die hier genannten Gewebetypen inklusive ihrer anatomischen und histologischen Präparation, der o. g. PET-Blot-Färbung sowie die Bestimmung ihrer Geno- und Priontypen einen großen Teil der für diese Arbeit erhaltenen Fremddienstleistungen dar. Einen Überblick über die verwendeten Gewebe, die Fallnummer, das Geschlecht sowie den Genotyp gibt die Tabelle 4.

Tabelle 4: Überblick über Anzahl, Genotyp, Geschlecht und Gewebetypen, der hier verwendeten klassischen Scrapie-Gewebe

Fallnummer	Genotyp/Geschlecht	Lymphknoten	Milz	Appendix/term. Ileum	GALT†	Tonsille
1	ARQ/VRQ/männlich	1	1	1	2	1
2	ARQ/ARQ/weiblich	2	1	1	2	1
3	ARQ/ARQ/männlich	1	1	1	1	-
4	ARQ/ARQ/weiblich	2	1	1	1	1
5	ARQ/ARQ/weiblich	1	-	-	-	1
Gesamt		n=7	n=4	n=4	n=6	n=4

† Fall-Nr. 1: Duodenum 1/2, Kolon ascendens 1/2; 2: Duodenum 1/2, Kolon 1/2; 3: Kolon; 4: Kolon ascendens 1/1.

2.1.2 Verwendete Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und ihre Herkunft zeigt die folgende Tabelle 5

Tabelle 5: Verwendete Substanzen und ihre Herkunft

Substanz	Hersteller
Aceton	Baker, Deventer, Niederlande
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC-Stammlösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brij 35	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roche, Mannheim, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Caseinblock	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagenase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Substanz	Hersteller
Depex	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylformamid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig (Lösung A)	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Extravidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Guanidinthiocyanat (GdnSCN)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat (Lösung B)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraplast	McCormick Scientific/ Leica Microsystems Inc, Illinois, USA
Phosphate buffered Saline (PBS)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteinase K (PK)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Substanz	Hersteller
Streptavidin-Peroxidase (POX)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Baker, Deventer, Niederlande

2.1.3 Verwendete Geräte und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien inklusive ihres Modelltyps und ihrer Herkunft zeigt die folgende Tabelle 6.

Tabelle 6: Verwendete(s) Geräte/Material inkl. Hersteller

Geräte/Material	Hersteller	Modell
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland	A200S
Ausgießstation	Medite, Burdorf, Deutschland	TES Valida
Deckgläschen	G. Menzel, Braunschweig, Deutschland	
Einbettautomat	Thermo Scientific, Waltham, USA	Shandon Citadel 2000
Filterpapier	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK	Folded Filters 595 1/2
Gefrierschrank	Liebherr, Kirchdorf a.d. Iller, Deutschland	Premium
Gefrierschrank	Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan	Ultra Low -80°C
Kühlplatte	Medite, Burdorf, Deutschland	COP 30
Auflichtmikroskop mit und ohne externe Lichtquelle (Auswertung)	Olympus, Tokyo, Japan	SZ-PT BX41
Externe Lichtquelle d. Auflichtmikroskops Olympus SZ-PT	Olympus, Europe	Highlight 3100

Geräte/Material	Hersteller	Modell
Mikroskop zur Fotodokumentation	Olympus, Tokyo, Japan	BX51M
Durchlichtmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan	BX40
Mikrotom	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland	
Mikrotomklingen	Feather Razor, Osaka, Japan	A35
Mikrowelle	Bauknecht, Schorndorf, Deutschland	750 Watt
Nitrozellulosemembran	BioRad Laboratories, Hercules, USA	0,45 µm Porengröße
Objektträger	G. Menzel, Braunschweig, Deutschland	Superfrost Plus
Objektträger	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Bielefeld, Deutschland	Objektträger geschnitten
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland	
Schwenktisch	Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwalbach, Deutschland	Duomax 1030
Trennpapier	BioRad Laboratories, Hercules, USA	
Wärmeplatte	Thermo Scientific, Waltham, USA	3120061
Wärmeschrank	Thermo Electron LED GmbH, Langenshold, DE	Heratherm OGH60-S
Zelluloseeinlage	TEMCA GmbH, Pölzig, Deutschland	Profix Vispo Art.Nr. 066533

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Rezepte für die PET-Blot-Methode sowie für den immunhistochemischen Nachweis

Die im Folgenden in der Tabelle 7 angegebenen Rezepte werden für die Gewebefixierung, die HE-Übersichtsfärbung, die PET-Blot-Methode sowie für die Immunhistochemie benötigt und werden im jeweiligen Methodenkapitel bei ihrer Verwendung angegeben.

Tabelle 7: Allgemeine Rezepte

Lösung	Rezept
Formaldehyd zur Gewebefixierung	4% Formalin = 5000 ml 37% Formalin + Puffer (440 g NaCl + 120 g Na ₂ HPO ₄ + 13,5 g K ₂ HPO ₄ + 2000 ml Aqua dest.) mischen; auffüllen auf 50 l mit Aqua dest.
Paraformaldehyd (PAF) zur Gewebefixierung	4% PFA = 160 g PFA + 9,6 g PBS + 1000 ml Wasser; unter Rühren erhitzen, bis Lösung klar, pH 7,4 einstellen
PK-Verdaupuffer	10 mM TrisHCl pH 7,8 + 100 mM NaCl + 0,1% Brij 35 + 50 mM CaCl ₂ + 50 mM MgCl ₂ (mit Aqua bidest auf gewünschte Menge auffüllen)
„Tris buffered saline“ (TBS) als Puffer	10 mM TrisHCl + 100 mM NaCl; pH 7,8
„Tris buffered saline“ + Tween (TBST) als Puffer	10 mM TrisHCl pH 7,8 + 100 mM NaCl + 0,05% Tween 20
„Phosphate buffered saline“ (PBS) als Puffer	9,6 g PBS mit 1000 ml Aqua dest. auffüllen und schütteln, bis die Salze gelöst sind
Natrium-Tris-Magnesium-Puffer (NTM)	100 mM TrisHCl pH 9,5 + 100 mM NaCl + 50 mM MgCl ₂ (+ nicht-entmineralisiertes Wasser, auf gewünschte Menge auffüllen).
Casein 0,2% als unspezifischer Proteinblock	2 g I-Block auf 1000 ml PBS (rühren), dann 1-2 Min. in Mikrowelle bei 50°C (Stufe 4; nicht kochen), zum Lösen rühren, herunterkühlen, dann + 1 ml 100% Tween 20
PET-Blot-Färbelösung	45 µl NBT (75 mg/ml NBT in 70% DMFA) + 33 µl BCIP (50 mg/ml BCIP in 100% DMFA) + 10 ml NTM
AEC-Chromogen	<u>Stammlösung:</u> 2 g 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 500 ml DMFA lösen, dunkel verwahren. <u>Gebrauchslösung:</u> 4 ml AEC-Stammlösung + 56 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2); dann 2x Filtrieren; Zugabe von 20 µl 30% H ₂ O ₂
0,5 M EDTA-Puffer (pH 8,0)	146,12 g EDTA + 1000 ml Aqua bidest + HCl bzw. NaOH (zum Lösen) mit Ziel-pH 8,0
Eosin	1% Eosin G in 70% Isopropanol lösen, rühren, anschließend filtrieren; vor Gebrauch mit etwas Eisessig ansäuern (wird etwas grünlich)
Mayers Hämalaun	Gebrauchsfertig.

Lösung	Rezept
Lösung A	5,75 ml 1 M Essigsäure auf 1 l mit Aqua dest.
Lösung B	13,61 g 0,1M Natriumacetat-Trihydrat auf 1 l mit Aqua dest
Stammlösung	1 g 3-Amino-9 Ethylcarbazol + 250 ml Dimethylformamid

2.2.2 Dekontamination, Formalinfixierung und Paraffineinbettung des sCJD- und iCJD-Gewebes als erhaltene Fremddienstleistung

Vor der Paraffineinbettung erfolgte die Dekontamination des entnommenen Gewebes für mindestens eine Stunde in 99%iger Ameisensäure. Im Anschluss erfolgte die Neutralisation sowie die Nachfixierung in 4%igem Formalin. Die Gewebeprobe wurde daraufhin für mindestens drei Stunden, mit dem Ziel das Formalin auszuwaschen und so Formalinpräzitate zu vermeiden, gewässert. Hierauf erfolgte dann schließlich die Paraffineinbettung in der alkoholischen Einbettungsreihe mit den folgenden Schritten:

50% Isopropanol (5 h) → 70% Isopropanol (5 h) → 90% Isopropanol (5 h) → 90% Isopropanol (5 h) → 90% Isopropanol (5 h) → 100% Isopropanol (5 h) → 100% Isopropanol (5 h) → 100% Isopropanol (5 h) → Xylol (3 h) → Xylol (3 h) → Paraplast (5 h) bei 62 °C → Paraplast (5 h) bei 62 °C [Gesamtdauer: 56 h]

Abbildung 4: Paraffineinbettung

Anschließend folgte das Ausgießen an der Ausgießstation des Instituts (s. Tabelle 6). Hierfür wurden die Gewebelöcher so in die Metallförmchen ausgegossen, dass die in der Kassette unterliegende Gewebeseite die Anschnittfläche für die später am Mikrotom erstellten Paraffinschnitte bildete. Die Ausführung der Erstellung der Paraffinschnitte wird bei den jeweiligen Färbemethoden beschrieben.

2.2.3 Enzymfärbungen/Histochemische Färbungen

2.2.3.1 Übersichtsfärbung Hämatoxylin/Eosin (HE)

Die Färbereaktion wurde an den ca. 0,5 µm bis 1 µm dicken Schnittpräparaten von einem in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Die am Mikrotom (s. Tabelle 6) gewonnenen Präparate wurden auf einen Glasobjektträger aufgezogen, anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C getrocknet und der nachfolgend beschriebenen Färbereaktion unterzogen. Die aufsteigende bzw. absteigende Alkoholreihe umfasste Isopropanol in den Konzentrationen 50%, 70%, 90%, 2x100%, Isoxylol (Isopropanol und Xylol 1:1 gemischt) und 3x Xylol.

In der absteigenden Reihe wurden die Schnitte entparaffiniert und gegenüber dem Xylol für jeweils fünf Minuten, dem Isoxylol eine Minute und den absteigenden Alkoholschritten gegenüber jeweils zwei Minuten exponiert. Hieran schloss sich nun die eigentliche Färbereaktion - Übersichtsfärbung Hämatoxylin / Eosin (HE) - an:

8 min. Mayers Hämalaun → Schnitte kurz in Aqua dest spülen → in 1% HCl-Alkohol differenzieren (3x eintauchen) → 10 min. unter fließendem Leitungswasser bläuen → 5 min. Eosinlösung → Abspülen der Färbelösung in entmineralisiertem Wasser (3-4x eintauchen)

Abbildung 5: Übersichtsfärbung Hämatoxylin/ Eosin

Nun wurden die Glasobjektträger mit den Gewebeschnitten durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt. Zu Beginn wurden die Schnitte dem 50%-, 70%- und 90%igem Isopropanol nur durch mehrmaliges kurzes Eintauchen ausgesetzt. Im Anschluss daran standen sie für jeweils eine Minute im 100%igen Alkohol, woran sich jeweils fünf Minuten im Xylolbad anschlossen. Im letzten Xylolschritt konnten die Schnitte dem Xylol auch länger als fünf Minuten ausgesetzt sein. Es folgte die Eindeckelung des Gewebes mit Depex.

2.2.4 PET-Blot-Methode

2.2.4.1 Einleitung zur Methode

Für die Diskriminierung der pathologischen von der physiologischen Isoform des Prionproteins mit höchster Sensitivität und zur Detektion der PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster wendete ich die von Schulz-Schaeffer et al. im Jahr 2000 entwickelte PET-Blot-Methode (Paraffin-embedded-tissue-blot) an in Paraffin-eingebettetem peripherem Gewebe an (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Einen Überblick über die verwendeten Antikörper geben die Tabellen Nr. 8 und 9.

Tabelle 8: Im Rahmen der PET-Blot-Methode verwendete Primärantikörper zum humanen PrP-Nachweis.

Pri-märanti-körper	Spezies	Klon	Quelle	Ver-dün-nung	Epitopdema-s-kierung	Zielstruk-tur/Epitop
12F10 mono- klonal	Maus	12F10	Deutsches Primaten-zentrum (DPZ), Göttingen, Deutsch-land	1:500	GdSCN 15 ^c	153-163 (Krase-mann et al. 1996)
3F4 mono- klonal	Maus	3F4	Signet laboratories Inc., Hayward, CA, USA	1:2000	GdSCN 15 ^c	109-112 (Krase-mann et al. 1996)
ICSM 18 mono- klonal	Maus	ICSM 18	Institute of Neurol- ogy, national Hospi- tal for Neurology & Neurosurgery, Lon- don, UK	1:10000		146-156 (Be-ringue et al. 2003)

Tabelle 9: Im Rahmen der PET-Blot-Methode verwendeter Sekundärantikörper.

Sekundäranti-körper	Spezies	Konjugation	Quelle	Verdün-nung	Chromo-gen
Anti-Maus	Ziege	Alkalische Phos- phatase	Dako, Glostrup, Dä- nemark	1:1000	NBT/BCJP

2.2.4.2 Färbeprotokoll

In einem ersten Schritt wurden ca. 1 µm bis 3 µm dicke Schnittpräparate von einem in Pa-
raffin eingebettetem Gewebe an einem Mikrotom (s. Tabelle 6) geschnitten. Die gewonne-
nen Präparate wurden dann in einem Becken mit kaltem Aqua bidest aufgefangen und auf

eine Nitrozellulosemembran aufgezogen. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe eines Glasobjektträgers stabilisiert. Nun wurde das Präparat mit Hilfe dieser Konstruktion in einem Becken mit warmem Wasser gestreckt. Diese Dreierkombination wurde dann auf der Wärmeplatte platziert und so die feuchte Nitrozellulosemembran mit dem Schnittpräparat getrocknet. Dieser Vorgang dauerte ca. zehn Minuten und im Folgenden wurden die Membranen mit Hilfe von Trennpapieren separiert, gestapelt und zur Stabilisierung zwischen zwei Glasobjektträgern platziert. Zum Beschweren kann auch noch hinzukommend ein schwerer Stein verwendet werden. Dieses Paket wurde dann über zwei Nächte in einem Wärmeschrank bei 55-60 °C gepresst. Nach diesem Vorgang ist es möglich, die Membranen abgedunkelt über Jahre hinweg aufzubewahren. Um mit der Färbung zu beginnen, mussten die Membranen wie auch die Objektträger entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Membranen in Histo-schaukeln zwischen Platzhalter aus Glasobjektträgern einsortiert. Sie durchliefen daraufhin für jeweils zehn Minuten eine Reihe aus drei Xylolbecken, um daraufhin in einem Becken aus Isoxylol (gleichteiliges Gemisch aus Xylol und 100%igem Isopropanolol) für fünf Minuten einzutauchen. Das Ziel der Rehydrierung wurde erreicht, indem die Membranen nun einzeln in Schaukeln mit 100%, 100%, 90%, 70%, 50% und 25% Isopropanolol weiter per Hand einsortiert wurden. Die Einwirkungszeit betrug hier jeweils fünf Minuten. In einem letzten Schritt wurden die Membranen nun wieder für fünf Minuten in PBS gestellt, welches mit 0,1% Tween als Detergenz versetzt wurde. Der Entparaffinierungsvorgang war damit beendet und die Membranen wurden zwischen Papierhandtüchern vorsichtig trocken getupft und anschließend zwischen zwei Streifen aus Fleecepapier eingeklemmt. Über Nacht wurden diese Membranen mit einer Glasplatte beschwert und abgedunkelt trocknen gelassen. Am nächsten Tag standen die Membranen dann für die jeweilige Färbung bereit. Damit die Membranen möglichst glatt für die Färbung verwendet werden konnten, war es außerdem ratsam, am nächsten Morgen die Fleecestreifen zu entfernen und nur die Membranen weiterhin abgedunkelt zwischen den Glasplatten beschwert für wenige Stunden ruhen zu lassen. Der folgende Färbeablauf war in der Regel immer gleich, jedoch konnte er bezüglich der vorangeschalteten Verdauschritte sowie in der Verwendung des jeweiligen Antikörpers variieren. Der Proteinase-K-Verdau ist der in der Mehrheit durchgeführte Verdauschritt und als klassisch anzusehen.

Das Ziel dieses Verdaus war die Elimination des physiologischen Prionproteins, mit der Annahme, dass folglich nur die pathologische Isoform auf die Membran transferiert wurde und auch nur diese mittels Epitopdetektion durch Prionantikörper in der sich anschließenden Färbereaktion dargestellt werden konnte. Der große Vorteil der PET-Blot-Methode im Gegensatz zu Verfahren wie dem Western-Blot, bei dem auch Proteine auf Membranen transferiert werden, ist die Möglichkeit der morphologisch-topographischen Zuordnung des Ergebnisses (Schulz-Schaeffer et al. 2000a; Wrede 2011). Anstelle des Gewebehomogenats, welches beim Western-Blot verwendet wird, wurden hier nur die Schnittpräparate verwendet. Hieraus ergibt sich jedoch auch, dass ein *Poolen* mehrerer Gewebe bei der PET-Blot-Methode nicht möglich ist (Wrede 2011). Neben dem Proteinase-K-Verdau gibt es noch

weitere Möglichkeiten der Freilegung von Epitopen - zum Beispiel durch eine thermische (Autoklavieren) sowie chemische (pH-Wert-Änderung) Manipulation (Wrede 2011), die ich jedoch nicht anwendete. Bezüglich der Detektion der pathologischen Isoform des Prionproteins verwendete ich drei unterschiedliche Antikörper gegen das Prionprotein (12F10, 3F4, ICSM-18). Die Unterschiede im Färbeprotokoll zwischen den einzelnen Prionantikörpern werden im folgenden Fließtext erwähnt. Bezüglich des Nachweises von PrP^{sc} im Lymphgewebe war die Vorbehandlung mit Kollagenase-A notwendig. Dieser Schritt musste bei Verwendung von Organgewebe durchgeführt werden, denn diese enthalten im Gegensatz zu Hirngewebe Bindegewebe, welches durch diese Vorbehandlung eliminiert wurde. Somit wurden mögliche unspezifische Bindungsreaktionen der Antikörper mit bindegewebigen Strukturen minimiert. Bei der Verwendung des Primärantikörpers ICSM-18 wurde auf den Kollagenase-A-Verdau verzichtet, da ich bei diesem Antikörper davon ausgehen konnte, dass die unspezifischen Bindungsreaktionen gering genug ausfallen würden. Hierzu wurden die Membranen über 40 Minuten auf einer von Kollagenase-A-Puffer (Stammlösung 1,5 mg Kollagenase-A/1 ml PK-Verdaupuffer) durchtränkten Zelluloseeinlage in einer geschlossenen Box („Kissentechnik“) (Wrede 2011) im Wärmeschrank bei ca. 55-60 °C inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Membranen alle gleichmäßig blasenfrei benetzt waren, aber nicht zu viel Flüssigkeit auf diesen stand, sodass die Befeuchtung von unten, nämlich von der Zelluloseeinlage auf die Membranen erfolgte. Es wurden hierfür ungefähr 13 ml in die Boxen pipettiert, wobei jedoch im Nachhinein häufig der Überstand abgegossen werden konnte. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte eine dreimalige Waschung der Membranen ohne Zelluloseeinlage in TBST auf dem Tischschüttler. Nun schloss sich der Proteinase-K-Verdau an. Hierfür wurden ca. 12,5 ml der PK-Verdau-Puffer (Stocklösung 50 mg/ml; verdünnt wird der PK-Verdaupuffer auf eine Konzentration von 250 µg/ml; entspricht 1:200) mit der PK-Lösung in die Boxen pipettiert. Diese enthielten wie im vorangegangenen Schritt ebenfalls eine Zelluloseeinlage, die durch die Flüssigkeitszugabe befeuchtet wurde und auf der die Membranen blasenfrei zu liegen kamen. Auch hier durfte der Überstand abgegossen werden, damit die Befeuchtung von der Zelluloseeinlage auf die Membranen von unten erfolgte. Unter mehrmaligem Schwenken wurden die Membranen dann über Nacht in einem Wärmeschrank bei 55-60 °C inkubiert. Hierfür wurden nach dem letzten Schwenken die Boxen luftdicht in eine Plastiktüte verpackt, sodass die Verdunstung des PK-Verdaupuffers so gering wie möglich gehalten werden konnte. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Membranen ohne Zelluloseeinlage 3x5 min in TBST gewaschen und anschließend für 15 Minuten in Guanidiniumthiocyanat denaturiert. Hieran schloss sich wieder ein Waschvorgang von 3x5 min mit TBST an. Der Proteinblock erfolgte in 0,2% Casein in PBST. Dieser wurde bei der Verwendung des Primärantikörpers ICSM-18 nicht angewendet. Pro Box wurden hierfür 20 ml benötigt. Die Membranen wurden in den Boxen mit Brackets befestigt, sodass ein Übereinanderliegen der Membranen verhindert wurde. Das Blocken erfolgte für 45 Minuten auf dem Tischschüttler. Nach Abgießen des Blocks wurde der Primärantikörper in die Boxen pipettiert (10 ml/Box). Ich wählte die Antikörper aus, mit denen man das

Prionprotein PrP nachweisen kann (12F10: Verdünnung 1:500 und 3F4: Verdünnung 1:2000; s. Tabelle 8). Nach 90 Minuten Inkubationszeit auf dem Tischschüttler wurde der Primärantikörper abgegossen und es schloss sich ein Waschvorgang mit TBST für 5x10 min auf dem Tischschüttler an. Die Membranen wurden während dieser gesamten Vorgänge wieder mit Brackets in den Boxen befestigt. Der sekundäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung mit TBST von 1:1000 in die Boxen (10 ml/Box) pipettiert und für 60 Minuten auf dem Tischschüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper war in diesem Fall ein goat-anti-mouse-AK, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, da es sich in der anschließenden Farbreaktion um eine Formazanreaktion handelt (Schulz-Schaeffer et al. 2000a; Schulz-Schaeffer et al. 2000b; Wrede 2011). Auch hieran schloss sich wieder ein Waschschriff mit TBST von 5x10 min, sowie ein inkubieren mit NTM für 2x5 min an, mit dem Ziel der Einstellung eines alkalischen pH-Wertes (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die Farbstoffe NBT und BCIP verwendet, die in NTM verdünnt wurden. Die Färbelösung ist lichtempfindlich und musste daher vor jeder Benutzung frisch angesetzt und dementsprechend in einem dunklen Raum aufbewahrt werden. Es werden 20 ml/Box benötigt und die Boxen wurden nun für die Farbreaktion von dem Tischschüttler genommen. Die Dauer der Farbreaktion konnte variieren, sollte jedoch nicht länger als 25 Minuten dauern, damit eine Hintergrundfärbung vermieden werden kann. Gestoppt werden sollte sie jedoch sofort, sobald ein adäquates Signal der Positivkontrolle erkennbar war. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Membranen in Aqua bidest, welches mit EDTA versetzt war, für mindestens 30 Minuten auf dem Tischschüttler gewaschen. Das Ergebnis konnte während dieses Vorgangs nachdunkeln. Anschließend wurden die Membranen zwischen Papierhandtüchern vorsichtig getrocknet, zwischen stabile, saugfähige Platten gelegt und über Nacht beschwert. Von nun an können die gefärbten Membranen jahrelang in Diahüllen, lichtgeschützt aufbewahrt werden (Schutz vor Nachdunkeln) und mit Hilfe eines Auflichtmikroskops ausgewertet werden.

2.2.4.3 Auswertung mit Hilfe der Auflichtmikroskopie

Die Auswertung der PET-Blots wurde mit Hilfe des Auflichtmikroskops (s. Tabelle 6) durchgeführt und für die abgebildeten photographischen Darstellungen wurde das Olympus BX51M verwendet. Ein mögliches Farbsignal teilte ich in Anlehnung an die Publikation von Gill et al (Gill et al. 2013) in ein positives, suspektes, nichtspezifisches oder negatives Signal ein. Ein **positives** Signal zeigte das charakteristische Farbsignal in den follikulären dendritischen Zellen innerhalb des Keimzentrums eines Lymphfollikels bzw. in eindeutig vorliegenden histologischen Strukturen. Ein als positives Farbsignal gewertetes Ergebnis wurde dann weiter semiquantitativ in Anlehnung an die Auswertung der Scrapie-Gewebeproben mit Hilfe der PET-Blot-Methode von Wemheuer et al (Wemheuer et al. 2009a) nach vier verschiedenen Abstufungen (sehr gering aber eindeutig; mäßig mit guter Abgrenzbarkeit der Ablagerungsmuster; ausgeprägt mit guter Abgrenzbarkeit der Ablagerungsmuster; maximal mit Überlagerung der Ablagerungsmuster) bewertet. Ein **suspektes** Farbsignal zeigte ein

schwächeres Farbsignal, welches sich nicht in den o.g. charakteristischen Bereichen des Lymphfollikels nachweisen ließ, jedoch vermutlich anatomischen bzw. histologischen Strukturen zuzuordnen war. Ein **nichtspezifisches** Farbsignal sprach für eine Antikörperbindung, die sich nicht an anatomischen bzw. histologischen Strukturen orientierte (z. B. Kreuzreaktion als Hintergrundreaktion) und ein **negatives** Farbsignal bedeutete, dass keine Antikörperbindung vorlag und somit ein Farbsignal nicht detektiert werden konnte. Einen Überblick über die genannten Einteilungen zeigen die Tabelle 10 und 11.

Tabelle 10: Quantitative Auswertung der PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS bzw. außerhalb des LRS mit Hilfe der PET-Blot-Methode.

Signalstärke d. Farbsignals	LRS	Gewebe außerhalb des LRS
Positiv	Starkes punktförmiges, dunkellila Farbsignal in follikulären dendritischen Zellen innerhalb des Keimzentrums der LF	Starkes punktförmiges, dunkellila Farbsignal mit Zuordnung zu vorliegenden histologischen Strukturen
Suspekt	Schwächeres o. g. Farbsignal, vermutlich histologischen Strukturen zuordbar, aber nicht den FDCs im Keimzentrum der LFs	Schwächeres o. g. Farbsignal, vermutlich histologischen Strukturen zuordbar
Nichtspezifisch	Antikörperbindung, die sich nicht an anatomischen bzw. histologischen Strukturen des LRS orientiert (z. B. Kreuzreaktion als Hintergrundreaktion)	Antikörperbindung, die sich nicht an anatomischen bzw. histologischen Strukturen orientiert (z. B. Kreuzreaktion als Hintergrundreaktion)
Negativ	keine Antikörperbindung = kein Farbsignal	keine Antikörperbindung = kein Farbsignal

Tabelle 11: Semiquantitative Auswertung der als positiv gewerteten PrP^{sc}-Ablagerungen mit Hilfe der PET-Blot-Methode.

Bewertung	Bedeutung
+	sehr geringe, aber eindeutige PrP ^{sc} -Ablagerungen
++	Mäßige PrP ^{sc} -Ablagerungen, jedoch mit guter Abgrenzbarkeit der Ablagerungsmuster
+++	Ausgeprägte PrP ^{sc} -Ablagerungen, jedoch mit guter Abgrenzbarkeit der Ablagerungsmuster
++++	Maximale PrP ^{sc} -Ablagerungen, jedoch mit Überlagerung der Ablagerungsmuster

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 Einleitung zur Methode

Diese Detektionsmethode wurde im Anschluss an die PET-Blot-Methode an einem ausgewählten Gewebepräparat durchgeführt (s Kapitel 3.2.3.1), um das Vorhandensein nervalen Gewebes in diesem ausgewählten Gewebeschnitt nachzuweisen. Einen Überblick über die hierfür verwendeten Antikörper geben Tabelle Nr. 12 und 13.

Tabelle 12: Für den immunhistochemischen Nachweis verwendeter humaner Primärantikörper.

Primärantikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung	Zielstruktur/Epitop
S100 polyklonal	Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark	1.400	S100B, S100A1, S100A6

Tabelle 13: Für den immunhistochemischen Nachweis verwendeter Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Spezies	Konjugation	Quelle	Verdünnung	Chromogen
Anti-Maus	Schaf	Biotin	GE Healthcare, Chalfont St. Giles; Großbritannien	1:200	Detektion mit Extravidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich, 1:1.000) und DAB oder AEC

2.2.5.2 Färbeprotokoll

In einem ersten Schritt wurden ca. 1 µm bis 3 µm dicke Schnittpräparate von einem in Paraffin eingebettetem Gewebe an dem Mikotrom (s. Tabelle 6) geschnitten. Die gewonnenen Präparate wurden dann in einem Becken mit kaltem Aqua bidest aufgefangen und dann auf einen Glasobjektträger transferiert und getrocknet. Die immunhistochemische Färbung begann, wie auch die enzymatische Hämatoxylin/Eosin-Färbung, mit der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Diese umfasste Isopropanol in den Konzentrationen 50%, 70%, 90%, 2x100%, Isoxylol (Isopropanol und Xylol 1:1 gemischt) und 3x Xylol. In der absteigenden Reihe wurden die Schnitte entparaffiniert und gegenüber dem Xylol für jeweils fünf Minuten, dem Isoxylol eine Minute und den absteigenden Alkoholschritten gegenüber jeweils für 2 Minuten exponiert. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte zweimal in TBS gewaschen und dann in TBST gestellt. Hieran schloss sich der Peroxidaseblock an, um die gewebeeigenen Peroxidasen zu blockieren. Hierfür wurde das Wasserstoffperoxid zuerst mit TBS auf 3% verdünnt. In dieser Lösung wurden anschließend die Paraffinschnitte für 20 Minuten auf dem Tischschüttler inkubiert. Hiernach folgte eine zehnminütige Spülung der Paraffinschnitte in TBS und ein anschließender 20minütiger Caseinblock. Ab diesem Zeitpunkt sollten die Paraffinschnitte durchgängig in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Es folgte daraufhin die Zugabe des Primärantikörpers. In diesem Fall verwendete ich den primären Antikörper S100 gegen Gliazellen in einer Verdünnung von 1:400 in 10%igem Casein. Die Paraffinschnitte sollten von dieser Flüssigkeit bedeckt sein und über Nacht bei 4 °C inkubieren. Die über Nacht inkubierten Paraffinschnitte wurden dann 2-3x mit TBS gewaschen und anschließend der Primärantikörper einmalig mit TBST weggespült. Als Sekundärantikörper verwendete ich den bi-Anti-mouse-Antikörper, der gegen die Spezies gerichtet ist, mit der der Primärantikörper erzeugt wurde. Dieser war bereits in einem Verhältnis von 1:2 in Glycerin verdünnt und wurde mit dem TBST/TBS von 1:100 auf 1:200 verdünnt. Die Paraffinschnitte wurden mit jeweils 100 µl für eine Stunde bedeckt. Parallel dazu sollten die Lösungen A, B und AEC aus dem Kühlschrank geholt und auf Raumtemperatur erwärmt werden. Nach einer Stunde Inkubation der Paraffinschnitte mit dem Sekundärantikörper wurden die Proben dreimal mit TBS und einmal mit TBST gewaschen. Die Gewebeproben durften dieser Waschlösung auch länger ohne Ergebnisverlust exponiert werden. Die Streptavidin-Peroxidase (POX = Extravidin) von Sigma wurde in TBS auf ein Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mit jeweils 100 µl für 45-60 Minuten bedeckt. In der Zwischenzeit wurde die Färbelösung mit dem AEC-Chromogen angesetzt. Hierfür wurden zwei Küvetten der Färbelösung mit insgesamt 150 ml benötigt [45 ml Lösung A (= Essigsäure) + 105 ml Lösung B → einen pH-Wert von 5,2 bei Raumtemperatur mit 1 M NaOH oder Essigsäure (=Lösung A) einstellen]. Diese Lösung wurde auf zwei Küvetten (ca. 60 ml pro Küvette) verteilt und es wurden pro Küvette jeweils 4 ml der AEC-Stammlösung zugefügt. Diese Lösung wurde zweimal durch den Faltenfilter gefiltert. Es folgte die Zugabe von 20 µl 30% H₂O₂. Es schloss sich dann der eigentliche Färbevorgang an. Hierfür wurden die Paraffinschnitte in die vorbereiteten Küvetten (56 ml/Küvette)

gegeben. Die Küvetten mit den Gewebeproben wurden für maximal 30 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle auf den Schüttler gestellt. Bei einer ausreichenden Farbtintensität wurden die Schnitte in eine mit Aqua dest gefüllte Küvette überführt. Dieser Schritt beendete die Färbereaktion. Eine Antrocknung der Schnitte sollte vermieden werden. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Hierfür wurden die Paraffinschnitte für zehn Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend für fünf Minuten unter fließendes, warmes Leitungswasser gestellt und anschließend mit Aquatex eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbereitung der PET-Blot-Auswertung mit Hilfe der HE-Übersichtsfärbung

Jede Gewebeprobe, die mit Hilfe der PET-Blot-Methode auf das Vorliegen von PrP^{sc}-Ablagerungen untersucht wurde, wurde ebenfalls im Vorfeld an einem vorangegangenen Gewebeschnitt mit Hilfe der Übersichtsfärbung Hämatoxylin/Eosin (s. Kapitel 2.2.3) gefärbt, mit dem Ziel die Anzahl und die Konfiguration des vorliegenden peripheren lymphatischen Gewebes zu quantifizieren, ein histologisches Korrelat zu einem möglichen positiven Ergebnis erzielen zu können sowie den Grad einer möglichen vorliegenden granulozytären inflammatorischen Reaktion bestimmen zu können. Die für die Auswertung benötigten HE-Präparate der untersuchten Scrapie-Fälle erhielt ich ebenfalls freundlicherweise als Fremddienstleitung von Frau Dr. med. vet. Wiebke Wemheuer (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, 66421 Homburg/Saar).

3.1.1 Auswertung mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie

Die Auswertung der HE-Übersichtsfärbung wurde mit Hilfe des Durchlichtmikroskops (s. Tabelle 6) durchgeführt. Die Anzahl des peripheren lymphatischen Gewebes in den untersuchten Gewebeproben teilte ich, in Anlehnung an die Publikation von Gill et al (Gill et al. 2013), nach Anzahl der in der HE-Färbung erkennbaren Lymphfollikel (\geq oder \leq fünf Lymphfollikel) ein. Waren keine Lymphfollikel in dem zu untersuchenden Gewebe vorhanden, bezeichnete ich es als n. e. (nicht erkennbar). Lag ein diffuses Muster an lymphatischen Zellen vor, bezeichnete ich es im Verlauf als „diffus“.

Um eine mögliche inflammatorische Reaktion ausschließen zu können, untersuchte ich das Gewebe weiterhin auf vorhandene granulozytäre Entzündungszellen. Eine Zerstörung der follikulären Architektur durch eine Granulozyten-Invasion würde im Verlauf ein negatives Ergebnis bei der Detektion von PrP^{sc} mit den entsprechenden Anti-Prionantikörpern bedingen, sodass diese Gewebeproben damit von der Testreihe ausgeschlossen werden müssten, was jedoch in keiner Gewebeprobe der Fall war. Eine mögliche inflammatorische Reaktion teilte ich von nicht vorhanden über leicht, mäßig bis stark mit Auflösung der Lymphfollikelarchitektur ein.

3.2 Detektion der PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS und in ausgewähltem peripherem Gewebe von sCJD-Fällen mit Hilfe der PET-Blot-Methode

3.2.1 Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers

Die in Tabelle 1 angegebenen Gewebeproben (n=133) der 18 sCJD-Fälle wurden zu Beginn nach dem in Kapitel 2.2.4 angegebenen PET-Blot-Protokoll mit Hilfe des Prionantikörpers 12F10 auf PrP^{sc}-Ablagerungen untersucht. Diese Untersuchung zeigte bezüglich des LRS nichtdistinkte und nicht feinpunktierte helllila Farbsignale deren Ablagerungsmuster keinen vorhandenen anatomischen Strukturen zuordbar waren, sodass das Farbsignal in 12 von 12 untersuchten Tonsillen-, 17 von 17 untersuchten Milz-, 52 von 52 untersuchten Lymphknoten-, 10 von 10 untersuchten Appendix-, 42 von 42 untersuchten GALT-Gewebeproben mit Hilfe der PET-Blot-Methode als nichtspezifische PrP^{sc}-Ablagerungen (für die Graduierung s. Kapitel 2.2.4.3) gewertet wurden (für die Hintergrundreaktionen des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode siehe Kapitel 3.3).

3.2.2 Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen in peripheren organischen Strukturen von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers

Die in Tabelle 1 angegebenen Gewebeproben (n=30) der 18 sCJD-Fälle wurden zu Beginn ebenfalls nach dem in Kapitel 2.2.4 angegebenen PET-Blot-Protokoll mit Hilfe des Prionantikörpers 12F10 auf PrP^{sc}-Ablagerungen untersucht. Diese Untersuchung zeigte bezüglich der untersuchten peripheren organischen Strukturen ein, wie in Kapitel 3.2.1 beschriebenes nichtdistinktes, helllila und ebenfalls nicht feinpunktiertes Farbsignal in nicht anatomisch zuordbaren Ablagerungsmustern, sodass das Farbsignal in zwölf von zwölf untersuchten Kruor-, in einer von einer untersuchten Schilddrüsen-, in einer von einer untersuchten Harnblasen-, in neun von neun untersuchten Haut-, in sechs von sechs untersuchten Parotis- und in einer von einer untersuchten Pancreas-Gewebeprobe(n) mit Hilfe der PET-Blot-Methode als nichtspezifische PrP^{sc}-Ablagerungen (für die Graduierung s. Kapitel 2.2.4.3) gewertet wurden.

3.2.3 Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen in der olfaktorischen Mukosa sowie in peripheren Nerven von sCJD-Fällen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers

Die in Tabelle 1 angegebenen Gewebeproben (olfaktorische Mukosa n=16; periphere Nerven n=6) der 18 sCJD-Fälle wurden zu Beginn ebenfalls nach dem in Kapitel 2.2.4 angegebenen PET-Blot-Protokoll mit Hilfe des Prionantikörpers 12F10 auf PrP^{sc}-Ablagerungen untersucht. Diese Untersuchung zeigte bezüglich der untersuchten Gewebetypen in 20 von 22 sCJD-Fällen (periphere Nerven: 5 von 6 sCJD-Fällen; olfaktorische Mukosa: 15 von 16 sCJD-Fällen) ein nichtdistinktes, helllila und ebenfalls nicht feinpunktiertes Farbsignal in

nicht anatomisch zuordbaren Ablagerungsmustern, sodass das Farbsignal in 5 von 6 untersuchten Gewebeproben der olfaktorischen Mukosa sowie in 15 von 16 untersuchten Gewebeproben der peripheren Nerven als nichtspezifische PrP^{sc}-Ablagerungen (für die Graduierung s. Kapitel 2.2.4.3) gewertet wurden.

Im Fall von zwei sCJD-Gewebeproben ((1) N. Ischiadicus n=1; (2) Riechschleimhaut n= 1) zeigten sich jedoch im Rahmen der PET-Blot-Färbung positive PrP^{sc}-Ablagerungen, deren dunkelviolettes Farbsignal ein längliches, perlschnurartiges und feingepunktetes Ablagerungsmuster präsentierte (s. Abb. 6). In der ersten Gewebeprobe konnte dieser positive PrP^{sc}-Nachweis in Korrelation mit dem entsprechend HE-gefärbten Gewebeschnitt dem nervalen Gewebe des N. ischiadicus zugeordnet werden. Da das PrP^{sc}-Farbsignal in der zweiten Gewebeprobe das gleiche PrP^{sc}-Ablagerungsmuster aufwies wie im ersten Fall, wurde auch hier der Verdacht auf nervale PrP^{sc}-Ablagerungen geäußert, sodass ein angrenzender Gewebeschnitt dieses ausgewählten sCJD-Falles mittels Immunhistochemie mit Hilfe des Antikörpers S100B auf das Vorliegen von Gliazellen und konsekutiv auf das Vorliegen von neuronalen Axonen untersucht wurde.

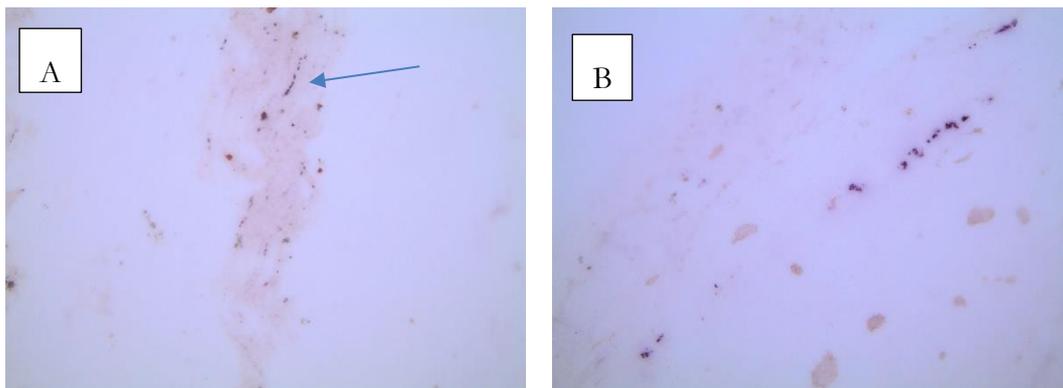


Abbildung 6: Positiver PrP^{sc}-Nachweis mittels der PET-Blot-Methode und dem 12F10-Prionantikörper in den Axonen des N. ischiadicus (A Pfeil) und nervalen Strukturen der olfaktorischen Mukosa (B) von sCJD-Fällen.

3.2.3.1 Detektion neuronaler Strukturen an einem ausgewählten sCJD-Fall mit Hilfe des S100-Antikörpers im Rahmen der Immunhistochemie

Um eine histologische Zuordnung des im Rahmen der PET-Blot-Methode detektierten positiven Farbsignals treffen zu können, wurde bezüglich des o. g. Gewebes der Riechschleimhaut eine immunhistochemische Färbung mit dem S100B-Antikörper angeschlossen. Dieser Antikörper detektiert Calciumbindende S100-Proteine in peripheren glialen Zellen und deutet konsekutiv auf neuronale Strukturen in der unmittelbaren Umgebung hin. Die zweite o. g. Gewebeprobe wurde nicht mitgeführt, da in der HE-Färbung die nervale Struktur, der N. ischiadicus, bereits erkennbar und so die Zuordnung des positiven Farbsignals aus der PET-Blot-Methode zu den nervalen Strukturen bereits möglich war. Im Gewebeschnitt der

Riechschleimhaut konnte ein positives Farbsignal der immunhistochemischen Färbung mit dem S100B-Antikörper vermerkt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in dieser untersuchten Gewebeprobe gliale und konsekutiv auch nervale Strukturen vorlagen, die jedoch nicht mit dem positiven Farbsignal aus der PET-Blot-Methode in ihrer Lokalisation korrelierbar waren.

3.2.3.2 Sekundärkontrolle via Re-Färbung der ausgewählten PrP^{sc}-positiven

Gewebeproben mittels PET-Blot und der Prionantikörper 3F4 und ICSM-18

Die zwei o. g. ausgewählten sCJD-Fälle wurden einer erneuten PET-Blot-Färbung mit weiteren Prionantikörpern, dem 3F4 und anschließend dem ICSM-18, nach identischem Protokoll einer Sekundärkontrolle unterzogen, um die Validität dieses vormals positiven Ergebnisses der PET-Blot-Methode mit Hilfe anderer etablierter Prionantikörper im Rahmen dieser Nachweismethode zu überprüfen. Hier zeigte sich jedoch bezüglich der olfaktorischen Mukosa (n=1) und des N. ischiadicus (n=1) bei Verwendung der o. g. Prionantikörper in allen Fällen ein sehr schwaches, diffuses bis nichtdetektierbares Farbsignal, welches nicht anatomisch korreliert werden konnte und welches ebenfalls keine Übereinstimmung mit dem 12F10-Farbsignal aufwies, sodass das 3F4- und das ICSM-18-Farbsignal als nichtspezifisch klassifiziert wurde (s. Abbildungen 7 und 8). Einen Überblick über die an den positiven Geweben durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle 14.

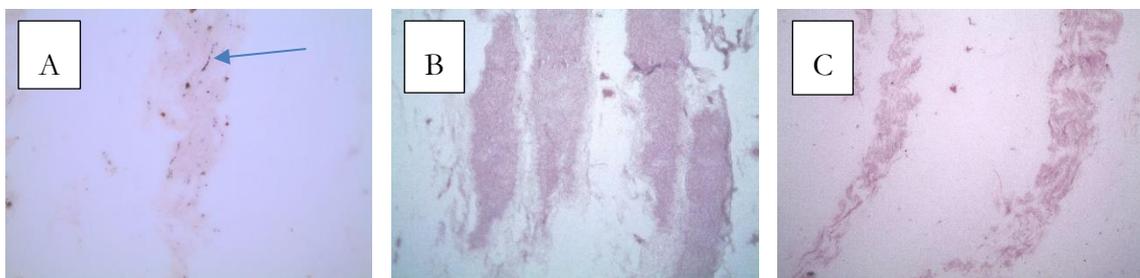


Abbildung 7: Vergleich der PET-Blot-Färbungen des N. ischiadicus mit dem 12F10-Antikörper (A), dem 3F4-Antikörper (B) und dem ICSM-18-Antikörper (C)

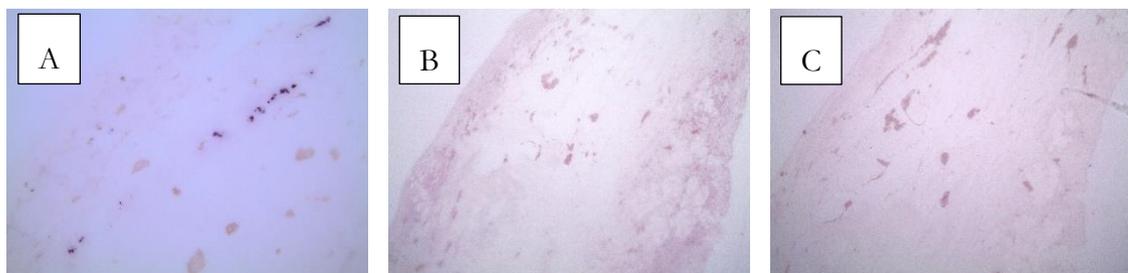


Abbildung 8: Vergleich der PET-Blot-Färbungen der olfaktorischen Mukosa mit dem 12F10-Antikörper (A), dem 3F4-Antikörper (B) und dem ICSM-18-Antikörper (C)

Tabelle 14: Überblick über die mittels der PET-Blot-Methode als positiv gewerteten sCJD-Fälle und ihre Ergebnisse.

Fall-Nr. Gewebe Genotyp Priontyp	Follikel- anzahl†	Gran. Infl.‡	PET-Blot 12F10	PET- Blot 3F4	PET- Blot ICSM- 18	Immunhis- toch. S100	Ergebnis
(1) Nervus ischiadi- cus VV2	Diffus bis ≥ 5	-	<i>Positives</i> punktförmiges, dunkellila Farbsignal in einem perlschnurartigen PrP ^{sc} -Ablagerungsmuster	N-Sp.	N-Sp.	Nicht gefärbt, da durch die HE-Färbung das PrP ^{sc} -Farbsignal der PET-Blot-Färbung bereits histologisch dem N. ischiadicus zuordbar	Mit Hilfe des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode für periphere nervale PrP ^{sc} -Ablagerungen <i>positiv</i>
(2) Olf. Mu- kosa MM1	n. e.	-	<i>Positives</i> punktförmiges, dunkellila Farbsignal in einem perlschnurartigen PrP ^{sc} -Ablagerungsmuster	N-Sp.	N-Sp.	Positiv für Schwann'sche Zellen und konsekutiv für neuronale Axone	Mit Hilfe des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode für periphere nervale PrP ^{sc} -Ablagerungen <i>positiv</i>

† (diffus/ ≥ 5 / ≤ 5 / n.e.); ‡ Gran. Infl. = Granulozytäre Inflammation (- bis +++); N-Sp. = Nichtspezifisch

3.2.4 Zusammenfassung der Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen im peripheren Gewebe der sCJD-Fälle mittels der PET-Blot-Methode

Zusammenfassend zeigten 0 von 12 untersuchten Tonsillen-, 0 von 17 untersuchten Milz-, 0 von 52 untersuchten Lymphknoten-, 0 von 10 untersuchten Appendix-, 0 von 42 untersuchten GALT-Gewebeproben mit Hilfe der PET-Blot-Methode einen positiven Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen. Die Untersuchung anderer peripherer organischer Strukturen (s. Tabelle 1) zeigte in 0 von 30 sCJD-Fällen einen positiven Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen. Die Untersuchung des olfaktorischen Gewebes ergab in 1 von 16 Gewebeproben und die Untersuchung peripherer nervaler Strukturen ergab in 1 von 6 Gewebeproben einen positiven Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen mit Hilfe des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode. Auch wenn die o. g. positiven Farbsignale in weiteren Gewebeschnitten mit Hilfe anderer Prionantikörper im Rahmen der PET-Blot-Methode nicht reproduzierbar waren, entsprachen sie aufgrund ihres distinkten punktförmigen, dunkellila Farbsignals sowie ihres histologisch eindeutig anatomischen Strukturen zuordbarem Ablagerungsmusters der

Definition eines positiven Farbsignals mittels der PET-Blot-Methode (s. Kapitel 2.2.4.3). Abschließend zeigte diese Untersuchung, dass die PET-Blot-Färbungen der unterschiedlichen Gewebetypen des LRS von sCJD-Fällen mit den o. g. PrP-Antikörpern nicht distinkt, nicht reproduzierbar, nicht zuordbar zu histologischen Strukturen und somit als nichtspezifisch bis negativ zu werten waren. Somit ist der Nachweis von PrP^{sc}-Ablagerungen im peripheren lymphatischen retikulären Gewebe inkl. des GALT sowie peripherer organischer Strukturen bezüglich des sCJD-Patientenkollektives mit Hilfe der PET-Blot-Methode als negativ (n=164) zu werten. Bezüglich des peripheren nervalen Gewebes der olfaktorischen Mukosa sowie peripherer nervaler Strukturen (N. ischiadicus) gelang mit Hilfe der PET-Blot-Methode und dem 12F10-Antikörper, in Konkordanz mit der Fachliteratur, in 2 von 22 sCJD-Fällen ein positiver PrP^{sc}-Nachweis mit einem distinkten feinen punktförmigen dunkellila Farbsignal in einem perlschnurartigen PrP^{sc}-Ablagerungsmuster.

3.3 Differenzierung von Hintergrundreaktionen im Rahmen der PET-Blot-Methode von spezifischen PrP^{sc}-Ablagerungsmustern bei sCJD-Patienten

Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, zeigten 0 von 133 Gewebeproben des LRS, 1 von 16 Gewebeproben der olfaktorischen Mukosa, 0 von 30 peripheren organischen Gewebeproben sowie 1 von 6 Gewebeproben peripherer Nerven der 18 sCJD-Fälle einen positiven PrP^{sc}-Nachweis, doch fielen im Rahmen der PET-Blot-Untersuchungen mit dem 12F10-Antikörper rezidivierend diffuse und nichtspezifische Farbsignale auf. Um diese im Folgenden beschriebenen Farbsignale tatsächlich als Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers klassifizieren zu können und nicht ein mögliches positives, distinktes Farbsignal fälschlicherweise zu übersehen, wurden ausgewählte Gewebeproben daraufhin mit dem Prionantikörper 3F4 als Sekundärkontrolle gefärbt. In einer folgenden, noch nicht veröffentlichten Promotionsarbeit von Frau Anna Hoffmann (Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen) werden die Kreuzreaktionen des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode näher analysiert und charakterisiert, sodass im Folgenden an entsprechender Stelle nur verkürzt erwähnt wird, welche histologische Struktur die Antikörperbindung und somit die Hintergrundfarbsignale bedingt.

3.3.1 Differenzierung der „Sternenhimmel“-Hintergrundreaktion des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode bei sCJD-Patienten

Rezidivierend fiel im Rahmen der PET-Blot-Untersuchung mit dem 12F10-Antikörper ein über den gesamten Gewebeschnitt hinweg verteiltes, stark diffuses, hellila und grob punktiertes nichtspezifisches Farbsignal auf, das in vielen Gewebeproben rezidivierend detektierbar war. Dieses Farbsignal wies jedoch nie ein in der Fachliteratur vorbeschriebenes bzw. ein zu der positiven Kontrollkohorte vergleichbares (positives oder suspektes) Ablagerungsmuster auf (Gill et al. 2013), noch orientierte sich dieses an eindeutigen histologisch zuordbaren

Strukturen. Dieses Ablagerungsmuster erinnerte an einen „Sternenhimmel“, sodass dieser Begriff im weiteren Verlauf verwendet wird, um dieses wiederkehrende, diffuse Signalmuster zu beschreiben. Um eine Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers nachzuweisen (s. Abbildung 9A), wurde hierfür exemplarisch aus jedem Gewebetypus eine Gewebeprobe mit dem besagten diffusen Signalmuster ausgewählt und einer Sekundärkontrolle mit dem 3F4-Antikörper nach dem o. g. PET-Blot-Protokoll unterzogen. Es zeigte sich jedoch im Rahmen dieser Sekundärkontrolle bezüglich jeder Gewebeprobe ein negatives Farbsignal (exemplarisch am Tonsillengewebe s. Abbildung 9B), sodass von einer unspezifischen Kreuzreaktion des 12F10-Prionantikörpers, a. e. gegen die endogene Peroxidase in Makrophagen, ausgegangen werden kann. Einen Überblick über die ausgewählten Gewebetypen sowie die Ergebnisse der PET-Blot-Färbungen zeigt die Tabelle 15.

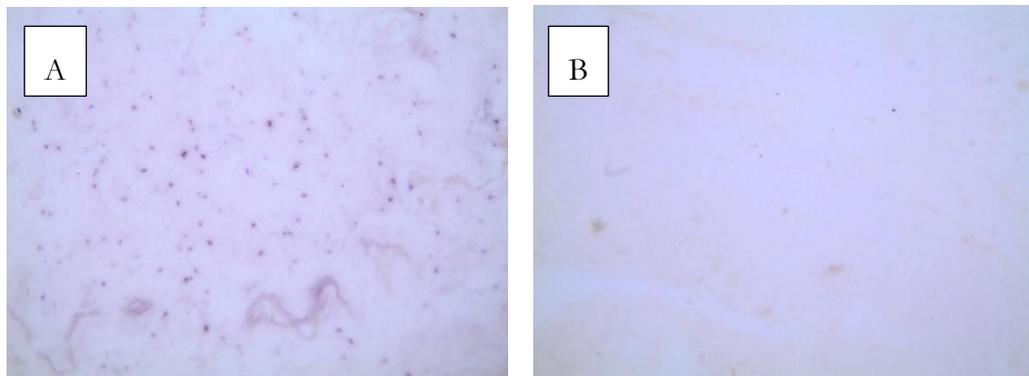


Abbildung 9: Exemplarisch am Tonsillengewebe eines sCJD-Falles: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode (A) im Vergleich zur negativ ausfallenden Re-Färbung des gleichen Gewebes mit dem Prionantikörper 3F4 nach dem gleichen PET-Blot-Protokoll (B).

Tabelle 15: Überblick über die ausgewählten Gewebetypen zur Untersuchung der Kreuzreaktion des 12F10-Prionantikörpers inkl. Ergebnis und Schlussfolgerung

Fallnummer	12F10	3F4	Schlussfolgerung
1 / Tonsille	Sternenhimmel	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10.
2 / Lymphknoten	Sternenhimmel	Negativ; zusätzlich Pigmentdarstellung.	Kreuzreaktion des 12F10.
3 / Kolon	Sternenhimmel	Nichtspezifisch und nicht korrelierend wiederholbar.	Kreuzreaktion des 12F10.
4 / Appendix	Sternenhimmel	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10.
5 / Riechschleimhaut	Sternenhimmel	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10.
6 / Milz	Sternenhimmel	Negativ; zusätzlich Pigmentdarstellung.	Kreuzreaktion des 12F10.
7 / Duodenum	Sternenhimmel	Negativ; zusätzlich Pigmentdarstellung.	Kreuzreaktion des 12F10.

3.3.2 Bestätigung weiterer nichtspezifischer Farbsignale mittels des 12F10-Prionantikörpers durch den 3F4-Prionantikörper im Rahmen der PET-Blot-Methode

Nicht nur das in Kapitel 3.3.1 beschriebene nichtspezifische Farbsignalmuster des 12F10-Prionantikörpers wurde durch die Utilisation des 3F4-Prionantikörpers verifiziert, sondern auch weitere nichtspezifische Farbsignale des 12F10, sodass diese nichtspezifischen Farbsignale als nichtspezifisch validiert werden konnten. So wurden mit Hilfe des 3F4 auch die Gewebeproben nachuntersucht, die in der Färbung mit 12F10 ein nichtspezifisches Farbsignal im Lymphfollikel aufwiesen, welches jedoch vornehmlich dem Signal glich, das bei Formalinpräzipitation durch fehlende Auswaschung entstand. Dieses präsentierte sich als schwarzes grobgepunktetes Farbsignalmuster innerhalb des Lymphfollikels (s. Abbildung 10 A). Doch um dieses Ergebnis tatsächlich als negativ werten zu können, wurden diese Gewebeproben - jeweils eine Probe stellvertretend für ein nichtspezifisches Farbsignal pro Gewebetypus - mit dem 3F4-Antikörper untersucht. Diese Untersuchung zeigte überwiegend ein negatives Farbsignal und somit keine Antikörperbindung, sondern nur noch ein pigmenttypisches schwarz/braunes Farbsignal als typische Darstellung von Formalinpräzipitaten bzw. ein weiteres nichtspezifisches Farbsignal, welches konsekutiv keinen histologischen Strukturen zugeordnet werden konnte, sodass diese Sekundärkontrollen mittels des 3F4-Antikörpers insgesamt als nichtspezifisch bis negativ gewertet werden konnten (s. Abbildung 10B). Einen Überblick über die ausgewählten Gewebetypen sowie der Färbungen inklusive ihrer Ergebnisse zeigt die folgenden Tabelle 16.

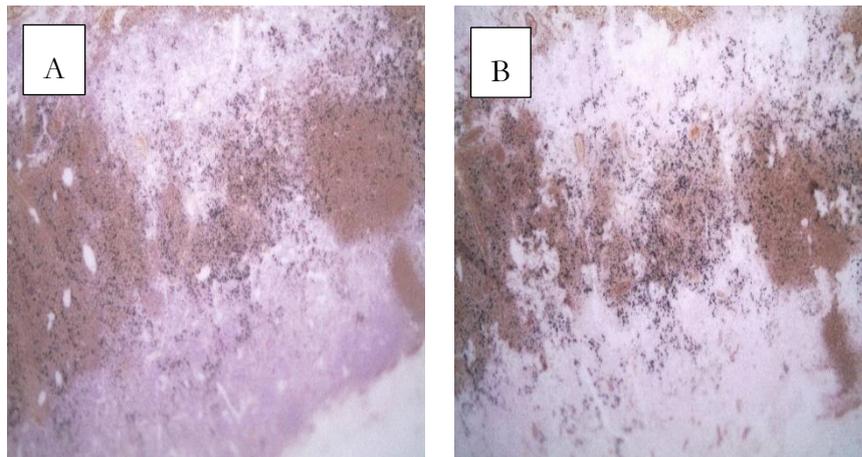


Abbildung 10: Exemplarisch am Lymphknotengewebe eines sCJD-Falles: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers (A) sowie des 3F4-Antikörpers (B) mit im Gewebe verbliebenen Formalinpigmenten (bräunliches Farbsignal)

Tabelle 16: Vergleich der Sekundärkontrolle mittels des 3F4-Antikörpers zu ausgewählten nichtspezifischen Farbsignalen im Lymphfollikel mittels des 12F10-Antikörpers.

Fallnummer	12F10	3F4	Schlussfolgerung
1 – LK (hilär)	Diffuses, schwarzes grobpunktiertes Farbsignal im Lymphfollikel	Nichtspezifisch mit schwarzem Farbsignal i. S. einer Pigmentdarstellung.	Nichtspezifisch bei Kreuzreaktion mit Formalin und Pigment
2 - Milz	Diffuses, schwarzes grobpunktiertes Farbsignal im Lymphfollikel	Nichtspezifisch mit schwarzem Farbsignal i. S. einer Pigmentdarstellung.	Nichtspezifisch bei Kreuzreaktion mit Formalin und Pigment
3 - Tonsille	Diffuses, schwarzes grobpunktiertes Farbsignal im Lymphfollikel	Nichtspezifisch mit schwarzem Farbsignal i. S. einer Pigmentdarstellung.	Nichtspezifisch bei Kreuzreaktion mit Formalin und Pigment

Weiterhin zeigte sich in verschiedenen Gewebeschnitten des peripheren sCJD-Gewebes unter Utilisation des 12F10-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode ein grobpunktiertes, unscharf begrenztes helllila Farbsignal, welches sich diffus im bindegewebigen Stroma über den gesamten Gewebeschnitt verteilte (s. Abbildung 11A). Auch hier wurden wieder, pro Gewebetypus dieses Farbsignal zeigende Gewebeproben ausgewählt und der Sekundärkontrolle mit dem 3F4-Antikörper unterzogen. Diese zeigte in der Gesamtheit ein negatives Ergebnis (s. Abbildung 11B), sodass das vormals nichtspezifische Farbsignal als Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers, a. e. mit Fibrozyten des bindegewebigen Stromas, gewertet werden konnte. Einen Überblick über diese Ergebnisse zeigt die folgenden Tabelle 17.

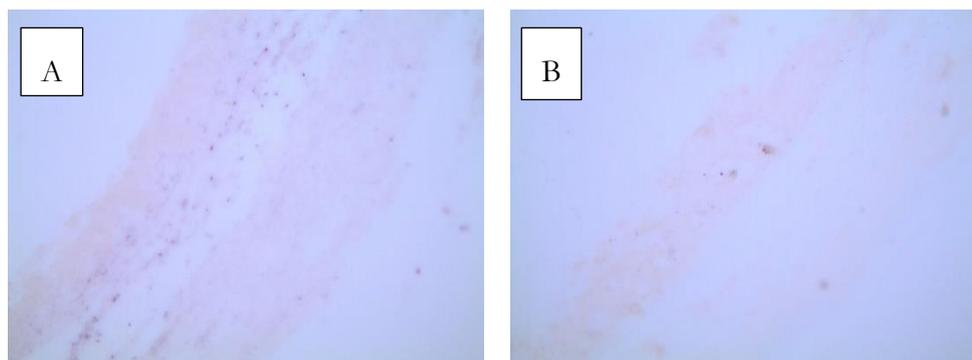


Abbildung 11: Exemplarisch an dem Appendixgewebe eines sCJD-Falles: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers (A) im Vergleich zum negativen Ergebnis der Re-Färbung des gleichen Gewebes mit dem 3F4-Antikörper (B).

Tabelle 17: Überblick über die Sekundärkontrolle mittels des 3F4 ausgewählter nichtspezifischer Farbsignale mittels des 12F10 innerhalb eines Lymphfollikels, welche als Kreuzreaktion gewertet wurden.

Fallnummer	12F10	3F4	Schlussfolgerung
1 - terminales Ileum	Diffus über den Gewebeschnitt verteiltes, unscharf begrenztes hellila Farbsignal im bindegewebigen Stroma	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10, a.e. mit Fibrozyten des bindegewebigen Stromas.
2 - Appendix	Diffus über den Gewebeschnitt verteiltes, unscharf begrenztes hellila Farbsignal im bindegewebigen Stroma	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10, a.e. mit Fibrozyten des bindegewebigen Stromas.
3 - Magen	Diffus über den Gewebeschnitt verteiltes, unscharf begrenztes hellila Farbsignal im bindegewebigen Stroma	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10, a.e. mit Fibrozyten des bindegewebigen Stromas.
4 - Duodenum	Diffus über den Gewebeschnitt verteiltes, unscharf begrenztes hellila Farbsignal im bindegewebigen Stroma	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10, a.e. mit Fibrozyten des bindegewebigen Stromas.

Abschließend wurden weitere nichtspezifische Farbsignale des 12F10 mit Hilfe des 3F4-Antikörpers kontrolliert, die ebenfalls dann als nichtspezifisch oder sogar als negativ gewertet werden konnten, sodass auch hier das vormals nichtspezifische Ergebnis validiert und somit bestätigt werden konnte, dass keine PrP^{sc}-Ablagerungen innerhalb dieser Gewebeschnitte

detektierbar waren. Einen Überblick über diese Gewebetypen, die nichtspezifischen Farbsignale und die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle 18.

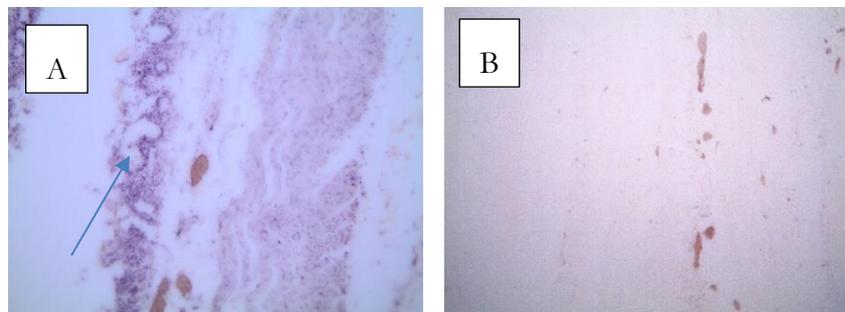


Abbildung 12: Exemplarisch am GALT-Gewebe des terminalen Ileums eines sCJD-Falles: Kreuzreaktion des 12F10-Antikörpers mit dem Drüsenepithel (A Pfeil) im Vergleich zum negativen Ergebnis nach Re-Färbung des gleichen Gewebes mit dem 3F4-Antikörper (B).

Tabelle 18: Kontrolle weiterer nichtspezifischer Farbsignale des 12F10 mittels des 3F4, welche als nichtspezifisch bzw. negativ gewertet wurden

Fallnummer	12F10	3F4	Schlussfolgerung
1 - N. trigeminus/LK axillär	Nichtspezifisch: Grobpunktierte, dunkelviolette Signale mit hellem Hof	Negativ.	Nichtspezifisch: Kreuzreaktion des 12F10 und 3F4
2 - Rektum	Nichtspezifisch: Grobpunktierte, helllila Farbsignale am Kryptengrund	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10.
3 - terminales Ileum	Nichtspezifisch: Grobpunktiert helllila Farbsignale ausgehend von Becherzellen und Drüsenstrukturen (s. Abbildung 12 A)	Negativ (s. Abbildung 12 B)	Kreuzreaktion des 12F10, a. e. mit Drüsenepithel
4 - Magen	Nichtspezifisch: Grobpunktierte helllila Farbsignale aus dem Lumen	Negativ.	Kreuzreaktion des 12F10 und 3F4

3.3.2.1 Zusammenfassung der Sekundärkontrolle nichtspezifischer Farbsignale des 12F10-Antikörpers mittels des 3F4-Antikörpers im Rahmen der PET-Blot-Methode

Die nichtspezifischen Farbsignale des 12F10-Prionantikörpers können insgesamt durch die mittels der PET-Blot-Methode durchgeführten Sekundärkontrollen unter Utilisation des 3F4-Prionantikörpers als nichtspezifische Farbsignale bestätigt werden. In Zusammenschau bedeutet dieses Ergebnis, dass mit Hilfe dieser Prionantikörper PrP^{sc}-Ablagerungen

innerhalb des LRS inklusive des GALT und in dem überwiegenden Anteil der peripheren nervalen Strukturen nicht nachgewiesen werden können und die hier beschriebenen Signalmuster als Kreuzreaktion des 12F10 bzw. des 3F4 und somit als Hintergrundreaktion gewertet werden können.

3.4 Detektion der PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS und in weiteren peripheren Geweben mit Hilfe der PET-Blot-Methode im Kontrollgewebe

3.4.1 PrP^{sc}-Detektion in humanen Gewebeproben als Negativkontrollkollektiv

Die in Kapitel 2.1.1.2 aufgelisteten Gewebetypen der neurodegenerativen Erkrankungen (s. Tabelle 3) wurden nach dem gleichen PET-Blot-Protokoll behandelt, gefärbt und die detektierten Farbsignale nach der gleichen Systematik (s. Kapitel 2.2.4.3) klassifiziert, sodass die Vergleichbarkeit zu den untersuchten Gewebeschnitten der sCJD-Fälle gewährleistet war. Bei herabgesetzter Färbungsintensität, jedoch durchgängig eindeutig positiv ausfallender mitgeführter Positivkontrolle in Form von PrP^{sc}-positivem Hirngewebe, fiel die Mehrheit der Gewebeproben eindeutig negativ aus. Bei insgesamt herabgesetzter Färbungsintensität fiel auch die Hintergrundreaktion schwächer aus und nur vereinzelt auf. So wurde jedoch auch hier bei nichtspezifischem Farbsignal beziehungsweise dem Nachweis des als Kreuzreaktion klassifizierten „Sternenhimmels“ an ausgewählten Fällen eine Sekundärkontrolle mit dem 3F4-Prionantikörper durchgeführt, die jedoch in allen Fällen eindeutig als negativ zu werten war. Zusammenfassend konnten keine PrP^{sc}-Ablagerungen in den Gewebeproben der hier untersuchten neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden (exemplarisch für die Negativ-Kontrollgewebe s. Abbildung 13). Außerdem zeigte dieses Ergebnis in Zusammenschau mit der mitgeführten Positivkontrolle, dass nur die PrP^{sc}-Ablagerungen und keine anderen amyloiden Ablagerungen, wie sie z. B. im Falle der Alzheimer-Erkrankung bzw. anderen Proteinaggregationserkrankungen vorliegen, als Farbsignal angezeigt wurden.

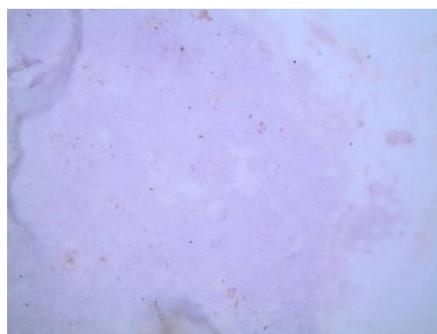


Abbildung 13: Negatives Ergebnis der PET-Blot-Färbung mit dem 12F10-Antikörper des Lymphknotengewebes eines Alzheimer-Patienten

3.4.2 PrP^{sc}-Detektion in klassischen Scrapie-Gewebeproben als Positivkontrollkollektiv

Einen Überblick über die hier verwendeten Gewebetypen, ihren Genotyp sowie ihr Geschlecht gibt die Tabelle 4. Ich erhielt dieses Gewebe bereits nach publiziertem PET-Blot-Protokoll gefärbt auf Nitrozellulosemembranen (s. Kapitel 2.1.1.3), sodass diese mit Hilfe des Auflichtmikroskops (s. Tabelle 6) ausgewertet werden konnten (s. Kapitel 2.2.4.3 und Tabelle 10 und 11). Die hier untersuchten peripheren Gewebe blieben auf das lymphatische Gewebe der klassischen Form der Scrapie-Schafe beschränkt, da dies als die benötigte Positivkontrolle für die initiale Zielsetzung - der Detektion von PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS von sCJD Fällen mit Hilfe der PET-Blot-Methode - diente. Aus der Literatur war bekannt, dass sich PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS von diesen Tieren mit Hilfe der PET-Blot-Methode sehr sensitiv detektieren ließen (s. Kapitel 1.7.1.4), sodass ich an fünf ausgewählten Scrapie-Fällen das Milz-, Tonsillen-, Lymphknoten-, Appendix-/terminales Ileum- und GALT-Gewebe auf diese Ablagerungen, mit Hilfe des gleichen PET-Blot-Protokolls wie in Kapitel 2.2.4.2 angegeben, auswertete. Bei diesen als Fremddienstleistung erhaltenen Gewebeproben konnte nicht näher zwischen solitärem Appendixgewebe und Appendixgewebe inklusive Gewebe des terminalen Ileums unterschieden werden, sodass diese bezüglich der Auswertung gleichgesetzt wurden. Auch hier konnten die ebenfalls als Fremddienstleistung erhaltenen HE-Präparate der untersuchten Gewebe zum strukturellen Vergleich, zur Quantifizierung des vorhandenen lymphatischen Gewebes sowie zum Ausschluss einer granulozytären inflammatorischen Reaktion herangezogen werden, wobei auch hier eine Inflammation des vorhandenen Gewebes in jedem Fall ausgeschlossen werden konnte. Zusätzlich muss angemerkt werden, dass nicht alle Gewebetypen des LRS im Falle einer Scrapie-Infektion parallel einen positiven PrP^{sc}-Nachweis erbringen mussten, was in dieser Untersuchung ebenfalls der Fall war. Die hier untersuchten Gewebetypen des LRS zeigten die typischen, in der Literatur vorbeschriebenen (s. Kapitel 1.7.1.4) feingepunkteten PrP^{sc}-Ablagerungen mit einem distinkten dunkellila Farbsignal (s. Abbildung 14), wobei diese bezüglich des Tonsillen- und Lymphknotengewebes i. d. R. auf das Keimzentrum der Sekundärfollikel beschränkt waren. Im Milzgewebe fanden sich diese Ablagerungen ebenfalls zentral im, aber auch ringförmig um das Keimzentrum der Follikel. Eine Besonderheit stellte das GALT des Duodenums, Jejunums, Ileums und des Kolons dar. Hier zeigten sich die PrP^{sc}-Ablagerungen nicht nur in den Keimzentren der Lymphfollikel, sondern auch vereinzelt im lymphatischen Gewebe des subepithelialen Doms, jedoch in der Mehrheit in den enterischen Nervenplexus der Darmwand (Pl. Myentericus=Auerbach-Plexus/ Pl. Submukosus=Meissner-Plexus), wobei der Meissner-Plexus zwischen der Tunica mukosa und der Tunica muscularis und der Auerbach-Plexus innerhalb der Tunica muscularis, zwischen der longitudinalen und zirkulären Muskulatur zu finden war. Die oval geformten PrP^{sc}-Ablagerungen des Auerbach-Plexus zeigten typischerweise feingepunktete bis feinretikulierte längliche Ablagerungsmuster innerhalb der Tunica muscularis. Einen Überblick über die hier beschriebenen PrP^{sc}-Ablagerungen der jeweiligen Gewebetypen zeigt die Tabelle 19.

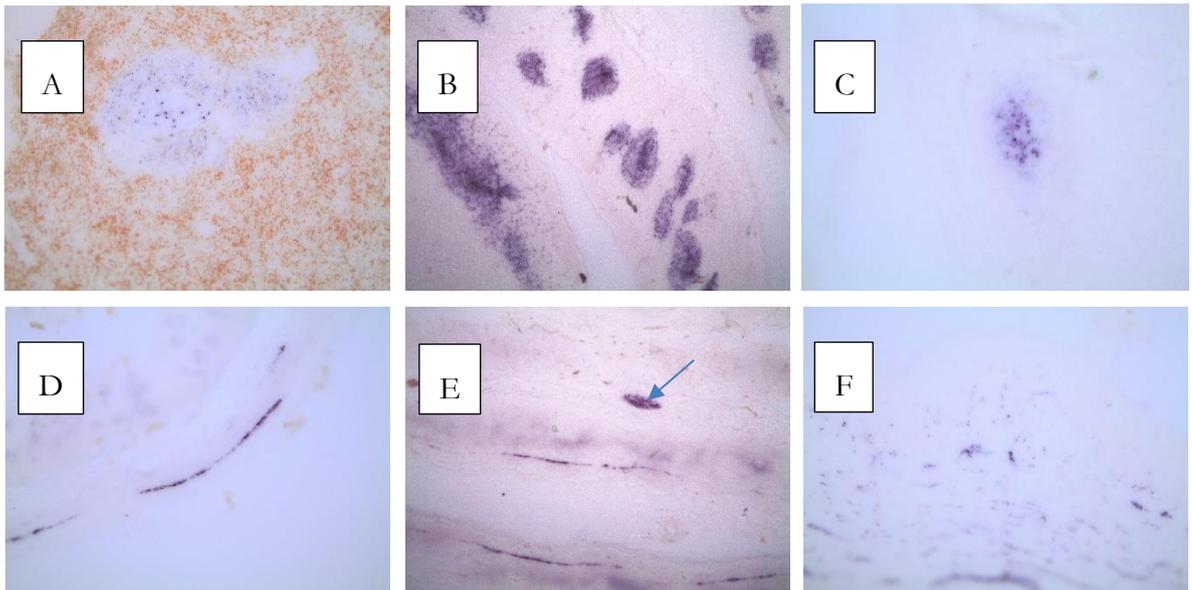


Abbildung 14: Positiver PrP^{sc}-Nachweis im LRS von klassischer Scrapie-Schafen: A: PrP^{sc}-Nachweis im Zentrum des Lymphfollikels der Milz; B: PrP^{sc}-Nachweis im Keimzentrum der Lymphfollikel der Tonsille; C: PrP^{sc}-Nachweis im Keimzentrum des Lymphfollikels im Lymphknoten; D: PrP^{sc}-Nachweis im Auerbach-Plexus des terminalen Ileums; E: PrP^{sc}-Nachweis im Auerbach-Plexus und im Meissner-Plexus (Pfeil) im Kolon; F: PrP^{sc}-Nachweis im diffusen lymphatischen Gewebe subepithelial im Dom des Duodenums gelegen.

Tabelle 19: Überblick über die verwendeten Gewebetypen der klassischen Scrapie in Schafen und die semiquantitative Auswertung der PrP^{sc}-Ablagerungen.

Fall-Nr.	Genotyp/Geschlecht	Lymphknoten	Milz	Appendix/term. Ileum	GALT	Tonsille
1	ARQ/VRQ/männlich	+++	++	+++	+++ (Duodenum) ++ (Kolon asc.)	++++
2	ARQ/ARQ/weiblich	+++ +++	+++	+	+ (Duodenum) + (Kolon)	negativ
3	ARQ/ARQ/männlich	+++	+++	+++	+++	-
4	ARQ/ARQ/weiblich	++++ ++++	++	+++	++++	negativ
5	ARQ/ARQ/weiblich	+++	-	-	-	++
Gesamt		n=7 (+++ bis ++++)	n=4 (++ bis +++)	n=4 (+ bis +++)	n=6 (+ bis ++++)	n=4 (negativ bis ++++)

3.5 Zusammenfassung der PrP^{sc}-Detektion im LRS von sCJD-Fällen im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen und der klassischen Scrapie mit Hilfe der PET-Blot-Methode

In Gesamtschau der o. g. Ergebnisse bezüglich der PrP^{sc}-Detektion im LRS von sCJD-Fällen im Vergleich zu anderen humanen neurodegenerativen Erkrankungen sowie der iCJD und der klassischen Scrapie in Schafen, konnte die bisherige in der Literatur vorherrschende Annahme bestätigt werden, dass mit Hilfe heutiger PrP^{sc}-Detektionsmethoden inkl. der PET-Blot-Methode keine PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS von sCJD-Fällen detektiert werden können, obwohl diese Methode in Anbetracht der Ergebnisse bezüglich der LRS-Gewebetypen der klassischen Scrapie in Schafen sehr distinkt die PrP^{sc}-Ablagerungen detektierte. Bezüglich der LRS-Gewebetypen von klassischer Scrapie in Schafen zeigten die Farbsignale der PET-Blot-Methode ein feingepunktetes bis feinretikuliertes, dunkellila PrP^{sc}-Ablagerungsmuster in den Keimzentren der Sekundärfollikel in Tonsille, Lymphknoten, im PALS der Milz, dem enterischem Nervenplexus sowie vereinzelt im GALT inklusive des diffusen lymphatischen Gewebes im subepitheliale Dom. Weiterhin konnte in einer Linie mit der Fachliteratur gezeigt werden, dass ein PrP^{sc}-Nachweis in nervalen Strukturen in peripheren Nerven (N. ischiadicus) sowie in der olfaktorischen Mukosa in sCJD-Gewebeproben mit Hilfe der PET-Blot-Methode unter Utilisation des 12F10-Antikörpers erfolgreich gelang. Ein Nachweis von anderen Proteinaggregaten, z. B. im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung bzw. eine

Fehldiagnose bezüglich anderer humaner neurodegenerativer Erkrankungen ist mit Hilfe der PET-Blot-Methode nicht möglich, da der PrP^{sc}-Nachweis mit dieser Methode eindeutig negativ ausfiel. Einen zusammenfassenden Überblick über die in dieser Untersuchung erhobenen Befunde zeigt die Tabelle 20.

Tabelle 20: PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS und in weiteren ausgewählten peripheren Geweben in sCJD-Fällen im Vgl. zur klassischen Scrapie, iatrogener sCJD, neurodegenerativen Erkrankungen mit Hilfe der PET-Blot-Methode (Prionantikörper 12F10, 3F4, ICSM-18)

Diagnose	Tonsille	Milz	Lymphknoten	Appendix	GALT	Riechschleimhaut	Periphere Nerven
Klassische Scrapie	2/4	4/4	7/7	4/4†	6/6	0/0	0/0
Iatrogene CJD	0/1	0/1	0/3	0/0	0/6*	0/0	0/0
Sporadische CJD ¹	0/12	0/17	0/52	0/10	0/42**	1/16	1/6
Hereditäre CJD	-	-	-	-	-	-	-
M. Alzheimer ²	0/1	0/2	0/5	0/1	0/10***	0/1	0/0
Andere neurologische Erkrankungen ³	0/3	0/3	0/13	0/0	0/10	0/6	0/0

¹ Schilddrüse:0/1; N. ischiadicus:0/1; N. vagus: 0/1; N. trigeminus: 0/1; Ggl. Pelvicum: 0/1; Ggl. Coelicaum: 0/1; N. laryngeus recurrens: 0/1; Vesica: 0/1; Haut: 0/9; Parotis: 0/6; Nebenniere: 0/1; Pancreas: 0/1

² Parotis: 0/1; Haut:0/2;

³ Haut: 0/3; N. radialis: 0/1

† Klassische Scrapie: Appendix und terminales Ileum

* Duodenum: 0/1; Magen: 0/1; Ösophagus: 0/1; Jejunum: 0/1; Ileum: 0/1; Rektum: 0/1

** Jejunum: 0/3; Ileum: 0/17; Duodenum: 0/8; Kolon: 0/4; Rektum: 0/1; Magen: 0/6; Ösophagus: 0/1

*** Duodenum: 0/3; Ileum: 0/3; Jejunum: 0/1; Rektum: 0/1; Kolon: 0/1; Magen: 0/1

4 Diskussion

4.1 Die Gründe für die Durchführung der vorliegenden Untersuchung

„We found that if, in the appropriate clinical context, a tonsil biopsy sample was positive for PrP^{sc}, variant CJD could be diagnosed, which obviates the need for a brain biopsy sample to be taken. Our results also show that variant CJD has a different pathogenesis to sporadic“ (Hill et al. 1999).

Dieses Zitat entstammt der Veröffentlichung von Hill et al. aus dem Jahre 1999, nachdem intensiv nach einer Möglichkeit gesucht wurde, die 1996 zum ersten Mal detektierte Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen anders als durch Western-Blot oder immunhistochemische Methoden anhand einer Hirnbiopsie diagnostizieren zu können (Collinge et al. 1996). Bisher galt, dass die menschlichen Prionerkrankungen nur durch eine histologische Analyse einer Hirnbiopsie sicher diagnostiziert werden konnten. Bei der sporadischen und damit klassischen Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen kam helfend hinzu, dass das EEG ein für die Erkrankung distinktes Signalmuster ergab, dass die Liquoruntersuchung auf das 14-3-3-Protein einen entscheidenden Hinweis lieferte oder dass das MRT hyperintense Signale in spezifischen Hirnbereichen lieferte. Diese entscheidenden Hinweise fehlten jedoch bei der vCJD, genauso wie eine eindeutige, sich von psychiatrischen Erkrankungen unterscheidende Klinik. Aus den Erkenntnissen der Scrapie-Forschung wusste man, dass man in experimentell mit dem Scrapie-Agens infizierten Schafen bereits präklinisch in den Tonsillen PrP^{sc} nachweisen konnte (Fraser und Dickinson 1970; Schreuder et al. 1996). Hill et al. führten im Jahr 1997 eine immunhistochemische Untersuchung von Tonsillengewebe einer 35-jährigen verstorbenen Patientin durch, die sich anfangs mit einer Depression vorstellte und im Verlauf eine Ataxie, Hyperreflexie, einen Gedächtnisverlust bis hin zur Demenz entwickelte und nach einem 14-monatigen Krankheitsverlauf verstarb (Hill et al. 1997). Hier zeigte sich ein immunhistochemischer Nachweis von PrP^{sc} mit Hilfe des Prionantikörpers 3F4 im Keimzentrum subepithelial gelegenen Lymphgewebes. Die angefärbten Zellen zeigten die typische Konformation von folliculären Zellen und auch der PrP^{sc}-Nachweis mit Hilfe des Western-Blots fiel positiv aus (Hill et al. 1997). Zwei Jahre später führten Hill et al. eine auf Tonsillen, Milz und Lymphknoten ausgeweitete und mit deutlich mehr Gewebeproben ausgestattete Untersuchung von vCJD-Patienten durch (Hill et al. 1999a). Hier konnte das PrP^{sc} mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden mit den Antikörpern 3F4, 12F10 und KG9 nach entsprechender Vorbehandlung vornehmlich in den Keimzentren des lymphatischen Gewebes detektiert und die PrP^{sc}-enthaltenden Zellen durch Korrelation mit den HE-Präparaten bestimmt bzw. mit entsprechenden Antikörpern (z.B. S100 zur Detektion Schwann'scher Zellen im Rahmen der IHC) näher charakterisiert werden. Hier zeigte sich zu dem Ergebnis aus dem Jahr 1997 (s. oben) ein konkordantes Ergebnis bezüglich der Lokalisation des PrP^{sc} in folliculären Zellen. Mit Hilfe der Western-Blot-Methode (Prionantikörper 6H4) konnte

das detektierte PrP^{sc} dann charakterisiert werden. Zusätzlich konnten Hilton et al. 1998 das PrP^{sc} ebenfalls im Keimzentrum lymphatischen Gewebes im Appendix eines im Verlauf an vCJD verstorbenen Patienten nachweisen. Auch hier kolokalisierte das PrP^{sc} mit den folliculären dendritischen Zellen (Hilton et al. 1998) und steht somit wieder in einer Reihe mit den o. g. Ergebnissen von Hill et al.. Eine andere Studie von Kawashima et al. aus dem Jahre 1997 (Kawashima et al. 1997) unterstützt das Ergebnis von Hill et al. (Hill et al. 1999), die vCJD anhand des immunhistochemischen Nachweises von PrP^{sc} im Tonsillengewebe diagnostizieren und hierdurch klar von der sporadischen Form abgrenzen zu können. Im Gegensatz hierzu konnte von beiden Arbeitsgruppen kein PrP^{sc} in dem entsprechenden Gewebe von Patienten mit sCJD, iCJD, hereditären Prionerkrankungen oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen detektiert werden (Hill et al. 1999), sodass als Schlussfolgerung das o. g. Zitat niedergeschrieben wurde. Hieraus schlussfolgern Hill et al., dass sich diese beiden genannten humanen Prionerkrankungen entscheidend in ihrer Pathogenese und damit der Rolle des lymphatischen Gewebes voneinander unterscheiden (Hill et al. 1999). Der Grund für diesen entscheidenden Unterschied ist bislang unklar – als Gründe werden Unterschiede durch Prionstämme, durch den First-Pass-Mechanismus bei oraler Aufnahme (ein Nachweis von PrP^{sc} in lymphatischem Gewebe bei iCJD fehlt bislang) und somit aufgrund unterschiedlicher Transmissionsrouten oder durch Änderungen aufgrund der Speziesbarriere vorgeschlagen (Hill et al. 1999). Interessanterweise konnten Studien von Wells et al. aus dem Jahr 1994 zeigen, dass Rinder, die oral BSE-Erreger aufnahmen, sechs Monate nach Exposition im distalen Ileum bereits einen positiven Nachweis für PrP^{sc} in den Peyerschen Plaques zeigten, obwohl klinisch noch keine Krankheitssymptome vorlagen. Dies steht in einer Linie mit dem Nachweis von PrP^{sc} von Hilton et al. im GALT des Appendix eines später an vCJD verstorbenen Patienten. Dieser ließ zwei Jahre vor Einsetzen klinischer Symptome eine Appendektomie durchführen. Anhand dieses Gewebes ließ sich nach postmortaler Diagnosesicherung mit Hilfe der Prionantikörper 3F4 und KG9 das PrP^{sc} hier nachweisen (Hilton et al. 1998). Daraus schlossen Hill et al. 1999, dass es durch den immunhistochemischen Nachweis sowie mit Hilfe der Western-Blot-Methode möglich war, potentielle Organspender, Stammzellenspender oder Blutspender auf das Vorliegen von PrP^{sc} zu *screenen* und somit von diesen Spenden auszuschließen (Hill et al. 1999), da diese Produkte von vCJD-Patienten, im Gegensatz zu sCJD-Patienten, ein hohes Risiko trugen, diese Prionerkrankung weiter zu übertragen. Sie räumten jedoch ein, dass dies bislang nur für die vCJD angenommen wird, da ein Nachweis von PrP^{sc} im lymphatischen Gewebe für die sCJD mit den bisherigen Methoden noch nicht gelungen war (Hill et al. 1999). Eine Untersuchung dieses sCJD-Gewebes mit der PET-Blot-Methode, die ebenfalls einen positiven Nachweis für PrP^{sc} in vCJD erbringt sowie im lymphatischen Gewebe von Scrapie oder BSE, und die die sensitivste Methode für die Detektion von PrP^{sc} aktuell darstellt, fehlt bislang, sodass sich diese Arbeit diesem Ziel widmet.

4.2 Kritische Auseinandersetzung mit Untersuchungsmaterial und Untersuchungsmethoden dieser Arbeit

4.2.1 Untersuchungsmaterial

4.2.1.1 sCJD-Gewebe

Das für diese Untersuchungen verwendete humane Gewebe entstammt der Gewebekbank der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen mit gesicherter Diagnose einer sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. In den 18 hier verwendeten Gewebeproben werden insgesamt drei Genotypen der möglichen sechs der sCJD erfasst (129MM Typ 1 n=9; 129MV Typ 2 n=4; 129VV Typ 2 n=5), sodass kein Anspruch auf Vollständigkeit in dieser Studie aufgrund der genotypischen Variabilität innerhalb der sCJD erhoben werden kann. Jedoch darf behauptet werden, dass die häufigsten Genotypen in ausreichender Anzahl präsentiert und untersucht worden sind. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass aufgrund der erhaltenen Dienstleistung die Behandlung der Gewebe variierte, sodass z. T. starke Formalinpräzipitate im Gewebeschnitt bei geringer Auswaschung nach Fixierung imponieren, die mit dem Farbsignal der PET-Blot-Methode interferieren. Hier darf jedoch angemerkt werden, dass dieses Farbsignal bräunlich flächig erscheint, wohingegen das PrP^{sc}-Farbsignal gut durch seine distinkte dunkellila Farbgebung in verschiedenen Ablagerungsmustern abgegrenzt werden kann.

4.2.1.2 LRS-Gewebe klassischer Scrapie als Positivkontrolle

Die für diese Untersuchung verwendeten Gewebeschnitte aus Schafen mit der klassischen Scrapie-Erkrankung erhielt ich dankenswerterweise von Frau Dr. med. vet. Wiebke Wemheuer. Diese waren bereits mit der PET-Blot-Methode und dem Prionantikörper P4 in dem Zeitraum zwischen 2007 und 2011 gefärbt. Die zeitliche Differenz vom Färbevorgang bis zur aktuellen Auswertung kann in einigen Fällen zum Nachtdunkeln des Farbsignals geführt haben, was jedoch die Auswertung nicht gestört oder erschwert hat. Aufgrund der bekannten starken PrP^{sc}-Ablagerung im LRS, ihrer sehr guten Detektierbarkeit mit Hilfe der PET-Blot-Methode sowie der Ähnlichkeit bezüglich der Prionablagerungen der klassischen Scrapie mit dem sCJD-Typen 2 (v.a. VV2 und MV2 eher als MM2) (Wemheuer et al. 2009b) konnte dieses Gewebe sehr gut als Positivkontrolle herangezogen werden. Ich verzichtete auf die Verwendung von atypischen/Nor98-Scrapie-Fällen, da nicht der genaue Vergleich dieser Variante mit der sCJD-Typ 1 das Ziel dieser Arbeit war, sondern das Scrapie-Gewebe lediglich als Positiv-Kontrolle der Detektierbarkeit von PrP^{sc} im LRS mit Hilfe der PET-Blot-Methode diente. Deswegen zeigt diese Arbeit auch nicht die ganze Bandbreite der genotypischen und phänotypischen Variabilität der Scrapie-Erkrankung, sondern fünf ausgewählte Fälle mit dem häufigen Genotyp ARQ/ARQ (n=4) sowie ARQ/VRQ (n=1).

4.2.1.3 Negativkontrollgewebe

Die für diese Untersuchung als Negativkontrollgewebe verwendeten Gewebeschnitte entstammen, wie die sCJD-Fälle, der Gewebebank der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen mit gesicherter Diagnose der jeweiligen Erkrankung. Ziel der Arbeit war die Bestätigung bzw. Widerlegung der in der Fachliteratur bestehenden Annahme des Fehlens von PrP^{sc} im LRS in sCJD-Fällen im Vergleich zu vCJD-Fällen mit Hilfe der sensitiven PET-Blot-Methode, sodass auf die Inklusion von hereditären Prionerkrankungen verzichtet wurde. Aufgrund der Subsummierung in die gleiche Kategorie der erworbenen Prionerkrankungen wurde ein Fall der iatrogenen CJD miteingeschlossen, der ebenfalls, konkordant zu den publizierten Ergebnissen in der Literatur (s. Kapitel 1.6.3.6), negativ ausfiel.

4.2.2 Untersuchungsmethode

4.2.2.1 PET-Blot-Methode

Im Vergleich zu den bisher zum PrP^{sc}-Nachweis bei sCJD-Fällen angewendeten konventionellen immunhistochemischen Methoden wie dem Western-Blot zeigte die PET-Blot-Methode eine erhöhte Sensitivität des PrP^{sc}-Nachweises, was aus Studien bezüglich der BSE oder experimentell infizierter Mäuse ersichtlich wurde (Taraboulos et al. 1992; Schulz-Schaeffer et al. 2000a; Ritchie et al. 2004; Lezmi et al. 2006b). Ein weiterer Beleg hierfür entstammt dem Bereich der humanen Prionerkrankungen - die PET-Blot-Methode detektierte PrP^{sc} im ZNS von sCJD-Patienten (129VV-Typ 1) in der Großhirnrinde, dem Corpus striatum sowie im Cerebellum im Gegensatz zu konventionellen immunhistochemischen Nachweismethoden, die diesen VV1-Fall vormals als negativ deklariert hatten (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Hieraus wird ersichtlich, dass die PET-Blot-Methode bezüglich des Gewebes von sCJD-Fällen eine niedrigere Detektionsschwelle aufweist als die übrigen Methoden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die bessere Detaildarstellung, wohingegen jedoch die zelluläre Zuordnung der detektierten Ablagerungen erschwert ist, sodass immer ein HE-Präparat oder ein immunhistochemischer Nachweis mit spezifischen, gegen das verdächtige Gewebe gerichteten Antikörpern (z. B. S100 gegen Schwann'sche Zellen) mit angefertigt werden muss, was im Rahmen dieser Untersuchung erfolgt ist. Das HE-Präparat wird außerdem benötigt, um plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen tatsächlich als Plaques einzustufen, um lymphatische Strukturen erkennen und quantifizieren und eine Entzündungsreaktion im Gewebe ausschließen zu können. Hinzukommend muss bei den Gewebeproben auf den Nitrozellulosemembranen auf die sachgemäße Aufbewahrung geachtet werden, damit kein Nachdunkeln des Farbsignals oder eine mechanische Schädigung auftritt.

4.2.2.2 PET-Blot-Methode und der PrP^{sc}-Nachweis im lymphatischen Gewebe

Die PET-Blot-Methode zeigt bei klassischen Scrapie-Fällen, die auch hier als Positivkontrollgewebe verwendet wurden, einen deutlichen PrP^{sc}-Nachweis im peripheren Gewebe (Lymphknoten, Milz, Tonsillen, GALT) (Wemheuer et al. 2009a). Wie bereits in Kapitel

4.2.2.1 angemerkt, sollte die PET-Blot-Methode angewendet werden, um das ZNS-Gewebe von sCJD-Patienten auf PrP^{sc}-Ablagerungen zu untersuchen, zu quantifizieren und zu charakterisieren. Hiernach kann angenommen werden, dass auch im peripheren Gewebe die PET-Blot-Methode eine niedrigere Detektionsschwelle aufweist als konventionelle immunhistochemische Methoden und somit besser geeignet ist, um dieses Gewebe, insbesondere das LRS, auf PrP^{sc} zu untersuchen, was jedoch bislang ausgeblieben ist.

4.2.2.3 Bestätigung und Einordnung der PrP^{sc}-Negativität im LRS von sCJD-Fällen

Aufgrund des negativen PrP^{sc}-Nachweises im LRS-Gewebe von sCJD-Fällen in der Literatur mit Hilfe konventioneller immunhistochemischer Methoden (s. Kapitel 1.6.2.4, 1.9) - sowie in dieser Studie präsentiert - muss angenommen werden, dass tatsächlich kein PrP^{sc} im LRS von sCJD-Fällen vorhanden ist oder dieses unterhalb der Detektionsschwelle der aktuell existierenden Nachweismethoden vorliegt. Passend zu letzterer These muss angemerkt werden, dass die PET-Blot-Methode bei der atypischen/Nor98-Scrapie ebenfalls keinen PrP^{sc}-Nachweis im LRS (Tonsillen, Lymphknoten, Milz) erbringen konnte (Wemheuer et al. 2009a), obwohl ein Bioassay dieses als positiv deklarierte (Andreoletti et al. 2008). Somit scheint die Detektionsschwelle der Bioassay-Methode niedriger als die der PET-Blot-Methode auszufallen und es wäre interessant, die im LRS als negativ gewerteten sCJD-Fälle nochmals mit Hilfe der Bioassay untersuchen zu lassen.

4.2.2.4 Einordnung der positiven Farbsignale der olfaktorischen Mukosa bzw. peripherer nervaler Strukturen

Die in Kapitel 3.2.3 beschriebenen positiven Farbsignale in der olfaktorischen Mukosa bzw. im N. ischiadicus, wiesen eindeutige morphologische Parallelen zu den faden- oder perl-schnurartigen PrP^c-Ablagerungen, die von Ford et al. 2002 in Axonen und ihrer angegliederten Schwanzzellen des N. ischiadicus von adulten Mäusen beschrieben und publiziert worden waren (Ford et al. 2002) bzw. zu den immunhistochemisch detektierten PrP^{sc}-Ablagerungen im enterischen Nervensystem oral mit Scrapie infizierter Hamster (Beekes und McBride 2000) auf. Und tatsächlich konnten mit Hilfe der Immunhistochemie und dem Antikörper S100B Schwann'sche Zellen in den im Kapitel 3.2.3 genannten positiven Geweben nachgewiesen werden, sodass die in Kapitel 3.2.3 detektierten Farbsignale in Konkordanz mit der publizierten Fachliteratur als positiv gewertet werden konnten, obwohl diese positiven Ergebnisse in angeschlossenen Untersuchungen mit Hilfe etablierter Prionantikörper nicht wiederholt werden konnten. Dies kann vermutlich auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass diese Ablagerungen so gering ausgeprägt waren, dass sie in den nächsten Gewebeschnitten nicht mehr vorhanden waren bzw. unterhalb der Detektionsschwelle lagen oder, dass die als Kontrollschnitt gefärbte Nitrozellulosemembran den nächstfolgenden Gewebeschnitt nicht enthielt. Letzteres könnte auch für die nicht korrelierende immunhistochemische Kontrolle ursächlich sein. Somit wären bezüglich dieser vereinzelt Farbsignale in der olfaktorischen Mukosa bzw. in peripheren nervalen Strukturen der sCJD-Fälle, weiterführende

und auf diese Frage ausgerichtete Untersuchungen mit Hilfe der PET-Blot-Methode interessant.

4.2.2.5 Einordnung der als Hintergrundreaktion gewerteten Farbsignale des 12F10-Prionantikörpers in Gewebeproben der sCJD-Fälle sowie im Gewebe der humanen Kontrollfälle

Der Vergleich der Hintergrundreaktionen des 12F10-Prionantikörpers bezüglich der sCJD-Fälle und der humanen Kontrollfälle bei gleichem hier durchgeführtem Behandlungs- und Färbeprotokoll (s. Kapitel 2.2) und gleichem ausgewähltem Gewebetypus zeigt, dass die Hintergrundreaktionen im Falle des humanen negativen Kontrollkollektivs insgesamt schwächer ausfällt, obwohl die gleichen Epitope präsentiert werden. Dies wird vornehmlich der insgesamt herabgesetzten Färbungsintensität des Kontrollgewebes geschuldet sein, was vermutlich auf die hier nicht indizierte Dekontamination der Gewebe mit Ameisensäure zurückzuführen ist. Dieser bei Prioninfiziertem Gewebe indizierte Dekontaminationsschritt erhöht vermutlich durch die Proteinalteration die unspezifischen Bindungsreaktionen. Zu dieser Vermutung passend zeigt das humane negative Kontrollgewebe der iatrogenen CJD ein im Vergleich zu den anderen neurodegenerativen Erkrankungen stärker ausfallendes Farbsignal und stärkere Hintergrundreaktionen.

4.3 Einordnung in die inhaltliche Diskussion

4.3.1 Die humanen Prionerkrankungen und das lymphatische System

Die mögliche Beteiligung des lymphoretikulären Systems im Rahmen von TSEs wurde erstmals durch Studien im Rahmen der Scrapie-Erkrankung bekannt, in denen eine Tonsillenbiopsie als frühes, entscheidendes diagnostisches Tool proklamiert wurde (Fraser und Dickinson 1970; Schreuder et al. 1996). Im Jahr 1999 führten Hill et al. aufgrund dieser Erkenntnis und der gemeinsamen Pathogenese der humanen und tierischen Prionerkrankungen eine systematische Untersuchung des lymphatischen Gewebes von vCJD, sCJD, iCJD, hereditären Prion- und anderen neurodegenerativen Erkrankungen durch. Hier zeigte sich, dass mit Hilfe des Western Blot- und immunhistochemischen Verfahrens das PrP^{sc} in 9/9 Tonsillen, in 10/10 Milz und 8/8 Lymphknoten (cervical, mediastinal, paraaortal, and mesenterial) von vCJD-Patienten positiv war. Die größte Konzentration an PrP^{sc} konnte in den Tonsillen verzeichnet werden (Hill et al. 1997a; Hill et al. 1999a; Wadsworth et al. 2001). 2002 konnte sogar gezeigt werden, dass ein positiver PrP^{sc}-Nachweis in den Lymphfollikeln der Appendixwand (GALT) vor Einsetzen klinischer Symptome und somit noch vor dem Krankheitsausbruch möglich war (Hilton et al. 1998; Hilton et al. 2002). Die in Kapitel 1.6.3.11 genannten Studien in Großbritannien ergaben eine PrP^{sc}-Prävalenz in Appendizes von 1 zu 4000 (Hilton et al. 2004a) bzw. von 1 zu 2000 Personen (Gill et al. 2013). Die PrP^{sc}-Ablagerungen im lymphatischen Gewebe sind somit ein Alleinstellungsmerkmal der oral erworbenen Prionerkrankungen (Scrapie, BSE, CWD und vCJD) und somit solitär für die vCJD unter den

humanen Prionerkrankungen (Mabbott 2017), denn bislang konnte hier mit den konventionellen genannten histopathologischen und immunhistochemischen Methoden in Patienten mit sporadischer, iatrogener und hereditärer CJD sowie der Kuru-Erkrankung kein Prionnachweis gezeigt werden (Hill et al. 1999a; Hilton et al. 2004b; Brandner et al. 2008; Collinge et al. 2008; Wadsworth et al. 2008a). Ein 2003 publizierter Nachweis von PrP^{sc} in der Milz von sCJD-Patienten von Glatzel et al. (Glatzel et al. 2003) muss kritisch hinterfragt werden, denn dieses Ergebnis ist bislang in keiner weiteren Arbeitsgruppe replizierbar gewesen; im Gegenteil, bislang fielen alle darauf ausgelegten Studien negativ aus. Ab welchem Krankheitsstadium dieses lymphatische Gewebe einen positiven PrP^{sc}-Nachweis erbringt, ist bislang unbekannt. Beispiele aus der Tierwelt zeigen bereits früh im Krankheitsverlauf PrP^{sc}-Ablagerungen im LRS. Rinder, die experimentell mit BSE infiziert wurden, zeigten im distalen Ileum (Peyer Plaques/MALT) sechs Monate nach Infektion einen positiven Nachweis von PrP^{sc} (Hill et al. 1999a). Die Chronic Wasting Disease zeigt, dass bereits nach ein bis zwei Monaten nach Prionexposition erste PrP^{sc}-Konzentration im oropharyngealen lymphatischen Gewebe detektiert werden können und sich das PrP^{sc} nach drei Monaten systemisch in jedem lymphatischen Gewebe ausgebreitet hat. Nach vier Monaten erreicht das PrP^{sc} eine Konzentration, die normalerweise bei terminal erkrankten Tieren im lymphatischen Gewebe gefunden wurde, jedoch ohne dass das Tier eine klinische Symptomatik zeigt (Hoover et al. 2017). Aus Studien mit Scrapie-infizierten Schafen weiß man des Weiteren, dass die PrP^{sc}-Konzentration im peripheren lymphatischen Gewebe erst ein Plateau erreichen muss, bevor es zu einer messbaren Neuroinvasion und somit zu einer klinischen Ausprägung der Erkrankung kommen kann (Hill et al. 1999a). Weitere Studien propagieren, dass aufgrund der Replikation und Akkumulation im LRS eine schnellere und effektivere Neuroinvasion möglich ist als ohne diese (Fraser und Dickinson 1970; Fraser und Dickinson 1978; Prinz et al. 2003b; Glaysher und Mabbott 2007; Donaldson et al. 2015). Doch was bedeutet der PrP^{sc}-Nachweis im LRS überhaupt? Die o. g. Studien von Hilton et al. und Gill et al. aus den Jahren 2004 und 2013 implizieren eine PrP^{sc}-Prävalenz von 1 zu 4000 oder von 1 zu 2000 Appendizes in der britischen Bevölkerung, was als Schlussfolgerung zulässt, dass diese Menschen in ihrem Leben mit BSE-kontaminierten Rinderprodukten in Berührung gekommen sein müssten und somit im weiteren Verlauf ihres Lebens an der vCJD erkranken könnten und bis dahin potentielle Überträger dieser humanen TSE darstellen. Erstaunlicherweise zeigen aber nicht nur Menschen aus der Geburtskohorte während der BSE-Epidemie, sondern auch Menschen vor und nach der Epidemie einen positiven PrP^{sc}-Nachweis im GALT des Appendix (Mackenzie und Will 2017). Diese Studie lässt nun drei mögliche Schlussfolgerungen zu – a) entweder muss die Annahme von der Anzahl der Menschen, die in Kontakt mit BSE-kontaminierten Produkten gekommen war, in Frage gestellt werden oder b) von einer weiterhin existierenden Übertragungsrouten oder c) von einem PrP^{sc}-Nachweis ohne Krankheitswert ausgegangen werden (Knight 2017; Mackenzie und Will 2017). Die letztere Vermutung wird durch den Fakt untermauert, dass bislang kein klinischer vCJD-Fall bei einem Patienten aufgetreten ist, der nach 1989 geboren worden ist (Knight 2017). Um die vCJD verstehen und

die Bedeutung des PrP^{sc}-Nachweises interpretieren zu können, gilt es weiterhin die Pathogenese der vCJD besser verstehen zu lernen. Entscheidende Zwischenschritte der Prionpathogenese und ihre zellulären Mitspieler werden im Folgenden beleuchtet, kritisch hinterfragt und in die aktuelle inhaltliche Diskussion eingeordnet.

4.3.1.1 Die Bedeutung der M-Zellen im Rahmen der PrP^{sc}-Aufnahme aus dem Darmlumen bei oral erworbener Prionerkrankung

Wie in dem Kapitel 1.8.2 erwähnt, wird angenommen, dass die M-Zellen im FAE einen entscheidenden Zwischenschritt in der Prionaufnahme aus dem Darmlumen in das GALT darstellen. Es ist bekannt, dass sie im Rahmen ihrer physiologischen Funktion Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen, diese transepithelial transportieren und dann dem Immunsystem über die Weitergabe an APC präsentieren und so, wenn nötig, eine Immunreaktion initiieren können (Knoop et al. 2009). Dieser physiologische Vorgang legt nahe, dass im Rahmen einer Prionerkrankung ebenfalls das PrP^{sc} aus dem Darmlumen über diesen Weg das FAE überwinden könnte. Jedoch ist bislang unklar, ob das pathologische Prionprotein speziell über diese M-Zellen des FAE oder über transzytotische Enterozyten in das GALT gelangt. (Kujala et al. 2011). Sicher ist jedoch, dass diese M-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der erworbenen Prionerkrankungen (Mabbott 2012) spielen, da im Fall einer M-Zell-Depletion die Neuroinvasion geblockt ist (Donaldson et al. 2012). Ob die M-Zellen das PrP^{sc} aus dem Lumen über das in hoher Konzentration auf ihrer luminalen apikalen Membran exprimierte PrP^c aufnehmen oder über andere auf der Zelloberfläche exprimierte Proteine, bleibt unklar (Mabbott 2012). Eine alleinige PrP^c-Defizienz auf der Zelloberfläche der M-Zellen verhindert jedoch nicht eine Infektion (Kujala et al. 2011; Takakura et al. 2011). Es wird weiterhin vermutet, dass insbesondere die Peyerschen Plaques des Dünndarms entscheidend für die Aufnahme des PrP^{sc} aus dem Darmlumen sind (Donaldson et al. 2015), denn in ihnen findet man die M-Zellen in hoher Anzahl, wohingegen die M-Zellen in den Peyerschen Plaques im Dickdarm nur wenig exprimiert sind (Kimura et al. 2015). Hinzu kommt, dass die Darmwand im Dickdarm mit einer dicken Schleimschicht bedeckt ist, was das Eindringen des PrP^{sc} vermutlich erschwert (Pelaseyed et al. 2014). Weiterhin scheint das GALT im Dickdarm weniger effizient in der Transzytose von luminalen Antigenen zu sein, im Vergleich zum GALT im Dünndarm (Donaldson et al. 2015), allerdings kann man trotzdem im GALT der rektalen Mukosa das PrP^{sc} nachweisen (González et al. 2006). Diese Überlegung impliziert jedoch eine kritische Beurteilung möglicher diagnostischer Verfahren, die über den PrP^{sc}-Nachweis in der rektalen Mukosa die Diagnose z. B. einer Scrapie-Erkrankung (González et al. 2006) bzw. der vCJD zu stellen vermögen.

4.3.1.2 Welche Rolle spielen die FDCs im Rahmen oral erworbener Prionerkrankungen?

Allen der genannten Studien dieser Arbeit ist gemein, dass sie den FDCs eine entscheidende Rolle bezüglich der Prionakkumulation im LRS sowie bezüglich der Pathogenese von der Prionaufnahme bis hin zu Neuroinvasion im Rahmen der Scrapie-, BSE-, CWD-Erkrankung

sowie der vCJD zuschreiben (Prinz et al. 2003b; Kujala et al. 2011; McCulloch et al. 2011; O'Connor und Aguzzi 2013; Donaldson et al. 2015). Im Rahmen einer Prionerkrankung findet man sie in B-Zell-Follikeln und in den Keimzentren in den SLOs (Mabbott 2012), wobei die hier erwähnten B-Zellen selber keinen Ort für die Prionreplikation (Bruce et al. 2000; Montrasio et al. 2001), sondern vermutlich eine unterstützende Rolle in der Prionpathogenese darstellen. Den Zusammenhang der FDCs mit den B-Zellen und ihre entscheidende oder sogar limitierende Rolle bezüglich der Neuroinvasion gilt es noch abschließend zu klären (Beekes und McBride 2007; Mabbott 2017). Die entscheidende Rolle der FDCs in der Prionpathogenese liegt in der ungestörten Akkumulation und Replikation des PrP^{sc} bis zur Überwindung der notwendigen Konzentration, die zu einer erfolgreichen Neuroinvasion führt (Mabbott 2017), da die Antigene unprozessiert und somit funktionsfähig internalisiert werden (Wykes et al. 1998; Macpherson und Uhr 2004). Dieses Phänomen der weiterhin bestehenden Funktionsfähigkeit ist bereits von Viren, wie dem HI-Virus und dem ADV (Aleutian mink disease parvovirus) bekannt (Armstrong und Horne 1984). Diese FDCs werden für die ersten Zellen gehalten, die in sekundären lymphatischen Organen das pathologische Prionprotein aufweisen (O'Connor und Aguzzi 2013). Allerdings wird, obwohl die Prionreplikation, die de-novo Konversion sowie die Akkumulation auf der Oberfläche der dendritischen Fortsätze stattfindet, keine Immunantwort eingeleitet (Kujala et al. 2011), obwohl ihre physiologische Funktion die Antigenpräsentation im Lymphfollikel mit konsekutiver Einleitung einer spezifische Immunantwort darstellt. Das Fehlen einer gezielten Immunreaktion stellt ein typisches Merkmal jeder Prioninfektion dar und der Einfluss der PrP^{sc}-Präsentation auf der Oberfläche der FDCs auf die Immunreaktion des Organismus ist somit noch Gegenstand der Forschung (Mabbott 2012). Bislang sind als Reaktion auf die Konversion und Akkumulation auf der Oberfläche der Dendriten nur ein abnormes Falten der Dendriten oder eine verschärfte Akkumulation von Immunkomplexen zwischen den Dendriten der FDCs bekannt (McGovern et al. 2009). Es liegen jedoch auch kontradiktierende Studien vor, die aufzeigen, dass eine erfolgreiche Prioninfektion auch unter FDC-Depletion stattfinden kann. Prinz et al. postulierten z. B. 2002, dass eine erfolgreiche Neuroinvasion des Wirts auch ohne die Expression der FDCs ablaufen kann (Prinz et al. 2002). Hinzukommend wird von Klein et al. 1997 aufgezeigt, dass auch bei Fehlen von T-Zellen eine erfolgreiche Infektion stattfinden kann (Klein et al. 1997).

4.3.1.3 Die Bedeutung der Innervation der SLOs im Rahmen der Neuroinvasion bei oral erworbenen Prionerkrankungen

Interessanterweise können die im vorangegangenen Kapitel erwähnten kontradiktierenden Studien von Prinz et al. durch eine Studie von Kimberlin et al. erklärt werden, die bereits 1983 zeigten, dass eine direkte periphere intraneurale Infektion mit dem PrP^{sc} zu einer erfolgreichen Neuroinvasion führt und aufzeigt, dass lymphatische Zellen für den Prozess der Neuroinvasion, sobald die Nervenzelle erreicht ist, nicht mehr notwendig sind (Kimberlin et al. 1983). Dies könnte bedeuten, dass die Innervation der SLOs ausbreitungslimitierend wäre

und die Prionpathogenese ausgehend vom enterischen über das sympathische und parasympathische Nervensystem führen würde und diese ein mögliches peripheres Reservoir an PrP^{sc} darstellen könnten (Kimberlin und Walker 1979; McBride und Beekes 1999; Glatzel et al. 2001; Kujala et al. 2011). So ließen sich auch die divergierenden Studien erklären, die unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Rolle von FDCs, B-Zellen, Peyerschen Plaques oder anderen Strukturen und Zellen im lymphoretikulären Gewebe (LRS) propagieren (Klein et al. 1997; Prinz et al. 2002) und zeigen, dass auch eine Neuroinvasion, wahrscheinlich über die direkte Aufnahme des infektiösen Agens über Nervenendigungen oder Enterozyten, nach oraler Aufnahme ohne Replikation im LRS möglich ist. Diese These könnte erklären, warum bei der Kuru-Erkrankung bei Annahme einer oralen PrP^{sc}-Aufnahme ein PrP^{sc}-Nachweis im LRS bislang fehlt. Diese Umgehung des LRS kann vor allem der Fall sein, wenn das PrP^{sc} in hohen Dosen oder wenn ein sehr infektiöser Erregerstamm vorliegt, aber vor allem zeigen all diese genannten Studien, dass die Stärke der Innervation der SLOs ausschlaggebend für eine erfolgreiche Neuroinvasion ist und der bloße Kontakt des PrP^{sc} mit peripheren Nervenendigungen in wenigen Fällen ausreichend sein könnte. Entscheidend wäre also, wie nah und in welcher Konzentration das PrP^{sc} in die Nähe der Nervenendigungen käme. Als Vehikel zu stärker innervierten Regionen des Lymphgewebes können B-Zellen oder Tingibile Body Macrophages (TBMs) fungieren (Bruce et al. 2000). Es wird vermutet, dass bestimmte Bereiche der FDC-Membran (Iccosomen, die Immunkomplexe tragen) von B-Zellen aufgenommen werden können (Tew et al. 1989). Diese B-Zellen und zusätzliche Fragmente von FDC-Membranen wiederum können von den TBMs internalisiert (Bruce et al. 2000) und weitertransportiert oder auch degradiert werden (Carp und Callahan 1981; Carp und Callahan 1982). Außerdem sezernieren B- sowie T-Zellen Wachstumsfaktoren, die die Innervation eines Gewebes modifizieren können und auch die Dendriten stimulieren über Botenstoffe das Immunsystem (Straub et al. 1998). Abschließend muss jedoch angemerkt werden, dass bezüglich der hier diskutierten oral erworbenen Prionerkrankungen, insbesondere der vCJD, in der Mehrzahl der typische Ausbreitungsweg die PrP^{sc}- Akkumulation und Replikation im LRS vor der eigentlichen Neuroinvasion darstellt.

4.3.1.4 Die PrP^{sc}-Propagation unter Einfluss des Alters

Da die Prionreplikation und -akkumulation im LRS bezüglich der humanen Prionerkrankungen nur bei der vCJD eine Rolle spielt, ist es interessant zu sehen, dass sich das Alter der hier betroffenen Patienten von dem Alter der an der sporadischen CJD erkrankten Patienten unterscheidet. Bei der vCJD liegt das mittlere Erkrankungsalter der Patienten bei 26 Jahren und das mittlere Sterbealter bei nur 28 Jahren (Mabbott 2012). Bei der sporadischen CJD verhält es sich ganz anders, denn hier sind die Patienten eher älteren Alters – das mittlere Erkrankungsalter liegt hier bei ca. 60 Lebensjahren (Sturzenegger 2001). Neben der Möglichkeit, dass die Jüngeren an vCJD-erkrankten Menschen, aufgrund anderer Essgewohnheiten eher in Kontakt mit den BSE-kontaminierten Produkten gelangten als die Älteren, kann dieser Unterschied auf altersspezifische Prozesse schließen lassen, die notwendig sind, damit eine

Prioninfektion vollzogen werden kann. Man weiß, dass je älter der befallene Organismus ist, das Immunsystem an Funktionsfähigkeit einbüßt (Mabbott 2012). Diese Theorie lässt sich bezüglich der Prionpathogenese in mehreren Studien an Peyerschen Plaques in Schafen, Rindern und Menschen unterstützen, denn man fand eine alterskorrelierte Assoziation zwischen der Peyerschen Plaque-Entwicklung und der Anfälligkeit für die Infektion mit Prionerkrankungen (St Rose et al. 2006). Die FDCs in älteren Mäusen (600 Tage), zeigten sich beeinträchtigt, eher atrophisch und mit eingeschränkter Kapazität, Immunkomplexe zu phagozytieren. Konsekutiv zeigten die Mäuse eine verminderte Antikörperantwort (Szakal et al. 1990; Aydar et al. 2002; Mabbott 2012). Weiterhin kann man in der Milz mit zunehmendem Alter eine Veränderung der mikrozytären Architektur der Marginalzone (MZ) beobachten, was die Mobilität der B-Zellen, die zwischen der MZ und den B-Zell-Follikeln in der weißen Pulpa verkehren (Cinamon et al. 2008), einschränkt und somit den FDCs weniger Antigene präsentieren können, sodass die FDCs weniger PrP^{sc} internalisieren können, was den Beginn der Neuroinvasion hinauszögert (Brown KL et al. 2012). Ein weiterer Faktor, der vor allem in Bezug auf geplante frühdiagnostische Tests an lymphatischen Organen eine Rolle spielt, ist, dass der Gehalt an PrP^{sc} im ZNS und im Milzgewebe in den prionexponierten Mäusen, vor allem älteren Tieren erheblich variieren kann. In letztgenannten Tieren zeigten sich PrP^{sc}-bedingte Pathologien im ZNS wohingegen das Milzgewebe unauffällig war, sodass man davon ausgehen muss, dass eventuelle Screening-Tests an peripherem lymphatischem Gewebe an älteren Patienten negativ ausfallen könnten, obwohl diese das PrP^{sc} bereits im ZNS tragen (Brown et al. 2009; Brown KL et al. 2012; Mabbott 2012).

4.3.1.5 Erhöhung der Suszeptibilität durch Inflammation

Weiterhin muss beachtet werden, dass eine Entzündungsreaktion im betroffenen Organismus die Ausbreitung des PrP^{sc} im Körper, wahrscheinlich über die Aktivierung des Immunsystems beschleunigt (Dickinson et al. 1978; Kimberlin und Walker 1979; Seeger et al. 2005; Glaysher und Mabbott 2007; Heikenwalder et al. 2008) und bei einer Immundefizienz die Replikation sowie die Neuroinvasion verzögert oder gar verhindert wird. Mabbott et al. merkten 2017 in einer Publikation diesbezüglich die folgenden Thesen an (Mabbott 2017). Es kann z. B. die Empfänglichkeit für Prionerkrankungen durch eine verstärkte Prionaufnahme gesteigert werden, indem z. B. bei einer Kolitis die M-Zell-Dichte erhöht wird oder Verletzungen der oralen oder nasalen Schleimhaut vorliegen (Denkers et al. 2011; Crowell et al. 2015b; Donaldson et al. 2016). Aber nicht nur eine akute Entzündungsreaktion oder Verletzung kann die Suszeptibilität erhöhen, sondern auch ein chronisches Entzündungsgeschehen, indem tertiäres lymphatisches Gewebe entsteht, welches FDCs enthält. Die Prionen können sich so im ganzen Körper ausbreiten, z. B. auch im Rahmen einer Mastitis in die sekretierte Milch oder im Rahmen einer Nephritis in den Urin übertreten und so ungeahnte Möglichkeiten der horizontalen aber auch vertikalen Transmission eröffnen (Heikenwalder et al. 2005; Ligios et al. 2005; Seeger et al. 2005; Glaysher und Mabbott 2007; Donaldson et al. 2015). Der Pathomechanismus hinter der erhöhten Suszeptibilität im Rahmen einer

Entzündungsreaktion wird in der verstärkten gastrointestinalen Aufnahme von Prionen vermutet, sodass schneller ein Äquilibrium zwischen Entstehung und Abbau durch Makrophagen erreicht wird und die erforderliche Konzentration zur Überwindung der benötigten Schwellenkonzentration zur erfolgreichen Neuroinvasion schneller erreicht werden kann (Maignien et al. 2005; Glaysher und Mabbott 2007). Des Weiteren wird vermutet, dass so die Prionen überleben und selektiert werden können, die ein zoonotisches Potential aufweisen und sich so in FCDs amplifizieren und an die neue Spezies adaptieren können (Michel et al. 2012).

4.3.2 PrP^{sc} und die Transmission via nasaler/oraler Mukosa oder via Blutbahn

In einer Studie aus dem Jahr 2007 an Hamstern, die intranasal mit dem HY-Erregerstamm der TSE inokuliert wurden, konnte das PrP^{sc} früh im nasalen **Mukosa**-assoziiertem-lymphatischen Gewebe, im olfaktorischen sensorischen Epithel (Bessen et al. 2010) sowie in submandibulären Lymphknoten und im Verlauf der Erkrankung in zervikalen und mesenterialen Lymphknoten, der Milz, den Peyerschen Plaques und in der Zunge detektiert werden (Kincaid und Bartz 2007). Hier wird vermutet, dass es dem PrP^{sc} möglich ist, sich retrograd, ausgehend vom Bulbus olfactorius über die olfaktorischen und vomeronasalen Axone in die Somata, die Dendriten und Zilien dieser peripheren Neurone auszubreiten und so in die nasale Flüssigkeit überzutreten, über die dann auch andere Organismen wiederum sekundär infiziert werden könnten. Die PrP^{sc}-Ablagerungen in den nervalen Strukturen der olfaktorischen Mukosa von sCJD-Patienten konnten durch diese Arbeit ebenfalls mittels der PET-Blot-Methode bestätigt werden (s. Kapitel 3.2.3). Jedoch scheint es so, dass es hier im Gegensatz zur intestinalen Prionaufnahme, nicht notwendig ist, dass sich das PrP^{sc} in SLOs repliziert, sondern es in der Lage ist, direkt das Nervensystem zu erreichen, nachdem der infektiöse Kontakt über die Mund- oder Nasenschleimhaut erfolgte. Diese Erkenntnis birgt neben Gefahren aufgrund der Übertragungsmöglichkeiten im Rahmen von dentalchirurgischen oder ophthalmologischen Eingriffen von sCJD- und vCJD-Patienten (PrP^{sc} konnte auch im Ganglion trigeminale detektiert werden, welches die nasale und orale Mukosa sowie den vorderen Anteil des Auges innerviert (Head et al. 2004)) auch diagnostische Möglichkeiten, da mit Hilfe der RT-QuiC die vCJD oder sCJD über Abstriche der nasalen/oralen Mukosa diagnostiziert, jedoch nicht differenziert werden können (Bessen et al. 2010; Orrú et al. 2014; Bongianni et al. 2017). Zusätzlich zeigt die PrP^{sc}-Detektion in der nasalen Mukosa der vCJD und sCJD eine interessante Parallele zu dem Morbus Parkinson, denn die Idee einer möglichen nasalen Ausbreitungsroute wird auch im Bereich der Parkinsonforschung diskutiert, wobei bezüglich des letztgenannten ein infektiöser Charakter bislang nicht bewiesen werden konnte (Hawkes et al. 2007; Hawkes et al. 2009). Dies stellt eine interessante Parallele zwischen diesen beiden Erkrankungen dar, da diese neben vielen anderen zu den Proteinaggregationserkrankungen gezählt werden (Chiti und Dobson 2006; Soto 2011). Bezüglich der PrP^{sc}-Transmission über den **Blutweg** postulierten van Keulen et al. die Möglichkeit, dass FDCs das infektiöse Agens in kortikale und parakortikale Sinus von GALT-drainierenden

Lymphknoten transportieren können. Hier können dann PrP^{sc}-positive Zellen Anschluss an den efferenten Lymphabfluss erlangen und von dort Kontakt zum Blutstrom erhalten, von wo aus sie dann peripheres, nicht GALT-assoziiertes Gewebe erreichen können (van Keulen et al. 2002). Eine Studie aus dem Jahr 2011 zeigte, dass zelluläre Bestandteile des Blutes das infektiöse Agens PrP^{sc} in ausreichendem Maß für eine mögliche Infektion trugen, aber auch das Blutplasma und der Buffy Coat aus Thrombozyten und Leukozyten eine für eine Infektion ausreichende Konzentration vorwiesen. Auch eine mögliche Depletion der Leukozyten zeigte keinen Einfluss auf die Infektiosität (Mathiason et al. 2010; McCutcheon et al. 2011). Die Patienten, die nach einer infektiösen Bluttransfusion an der **vCJD** erkrankten (s. Kapitel 1.6.3.8), zeigten ein klinisches Bild, dass sich nicht von der klinischen Ausprägung der vCJD nach Verzehr von BSE-kontaminierten Rinderprodukten unterschied (Wroe et al. 2006; Head et al. 2009). Eine Übertragung der **sCJD** via Blutprodukten gilt heute eher als unwahrscheinlich (s. Kapitel 4.3.3.1). Diese Erkenntnisse bergen die Möglichkeit subklinische vCJD-Träger über einen Bluttest frühzeitig erkennen zu können (Edgeworth et al. 2011), obwohl neue Daten auch hier eine vorsichtige Interpretation der Tests propagieren, denn es scheint, dass einige Patienten eine sehr niedrige periphere Konzentration von PrP^{sc} aufweisen und die Tests somit falsch negativ ausfallen könnten (Mead et al. 2014).

4.3.3 Vergleich der erworbenen Prionerkrankungen in Bezug auf Klinik, Erregerstamm und Transmissionsseigenschaften

Zu Beginn muss bezüglich der Terminologie zwischen einer **Kontagiosität** (Ansteckungsfähigkeit bei natürlichem Kontakt) und einer **Transmissibilität** (Übertragbarkeit bei unnatürlichem Kontakt) differenziert werden. (Hörnlmann 2001a). Des Weiteren wird zwischen einer **horizontalen** Übertragung - „[...] jede nicht über die Keimbahn verlaufende Übertragung von Infektionserregern auf andere Individuen“, die enteral (oral) oder parenteral verlaufen kann (Groschup et al. 2001) – und einer **vertikalen** Übertragung - die „[...] die Erregerweitergabe von Eltern auf ihre Nachkommen über die Keimbahn [umfasst]“ und prä-, peri- und postnatal ablaufen kann (Groschup et al. 2001) - unterschieden. Hinzukommend wird zusätzlich noch von einer **iatrogenen** Übertragung und einer **experimentellen** Übertragung gesprochen (Groschup et al. 2001). In der Subgruppe der erworbenen Prionerkrankungen zeigt die Kuru-Erkrankung nur Verläufe nach horizontaler Übertragung aber nie durch vertikale Übertragungsmechanismen (Groschup et al. 2001). Die iatrogene Übertragungsmöglichkeit des infektiösen Agens in Bezug auf u.a. Kornea-Transplantationen (Duffy et al. 1974) oder Wachstumshormon-Transfusionen (Gibbs et al. 1985) kann als horizontale Übertragung angesehen werden (Groschup et al. 2001). Bezüglich der vCJD sind bislang nur horizontale Übertragungsmechanismen als sekundäre Transmission via infektiöser Blutprodukte bekannt (s. Kapitel 1.6.3.8) (Urwin et al. 2016), jedoch kein vertikaler Übertragungsmechanismus (Ward et al. 2006; Everington et al. 2007; Murray et al. 2011).

Alpers und Rail stellten 1971 die These auf, dass die Kuru-Erkrankung durch die Todesriten mit einem an sCJD verstorbenen Angehörigen entstand und das ‚Prion‘ durch die

kannibalistischen Rituale im Rahmen der Trauerzeremonien innerhalb des Stammes weiterverbreitet wurde (Alpers und Rail 1971). Molekulare und biologische Untersuchungen von Prion-Erregerstämmen von Kuru-Erkrankten (Parchi et al. 1997; Parchi et al. 2000; Wadsworth et al. 2008b) im Vergleich zu sCJD- und iCJD-Prion-Erregerstämmen sowie Transmissionsstudien an transgenen und Wildtyp-Mäusen unterstützen diese Vermutung (Brown et al. 1994; Wadsworth et al. 2008a). Zudem zeigen mit Kuru- und sCJD-Prionen inokulierte transgene Mäuse, eine ähnliche und vor allem stark von der vCJD abweichende Neuropathologie bezüglich der spongiformen Veränderungen und der PrP^{sc}-Ablagerungsmuster (Parchi et al. 1997; Parchi et al. 2000; Wadsworth et al. 2008a). Abweichend hiervon muss jedoch angemerkt werden, dass sich im Hirngewebe Kuru-Erkrankter vornehmlich der PrP^{sc}-Typ 2 findet, der ebenfalls typischerweise mit der vCJD assoziiert ist wohingegen im Hirngewebe von sCJD-Erkrankter vornehmlich der Priontyp 1 detektiert wird. Weiterhin lassen sich typischerweise die Kuru-Plaques disseminiert im ZNS von Kuru-Patienten finden, die in sCJD-Patienten fehlen (Hainfellner et al. 1997; McLean et al. 1998). Diese findet man jedoch in der peripher erworbenen iatrogenen CJD (Plaquerähnliche PrP^{sc}-Ablagerungen) sowie in der vCJD (floride Plaques) (Brown et al. 1992; Billette de Villemeur et al. 1994; Hill et al. 1999a; Brown et al. 2000; Will 2003; Brown et al. 2006). Hinzukommt, dass sich ebenfalls die klinische Ausprägung der sCJD (zentrales Kriterium: progressive Demenz) (s. Kapitel 1.6.2.2) von der Kuru-Erkrankung (progrediente zerebelläre Ataxie und spät im Krankheitsverlauf einsetzende Demenz) (Alpers und Rail 1971) unterscheidet. Die Kuru-Erkrankung gleicht hier aufgrund der starken zerebellären Symptome eher der iCJD (Brandner et al. 2008; Wadsworth et al. 2008a). Klinische Ähnlichkeiten bestehen zwischen der sCJD und der iatrogenen CJD bei zentraler Inokulation (Will 2003). Weiterhin muss angemerkt werden, dass sich die vCJD von der sCJD ebenfalls bezüglich der phänotypischen Ausprägung u. a. in Bezug auf Inkubationszeiten und die Erkrankungsdauer (s. Kapitel 1.6.3.9, 1.6.3.10) und der sekundären Transmissionseigenschaften unterscheidet, da eine sekundäre, iatrogene Transmission von vCJD-Donorblut mit anschließender vCJD-Erkrankung im Empfänger in bislang fünf Fällen beschrieben worden ist. Eine Übertragung der sporadischen Form der CJD via Bluttransfusionen gilt heute eher als ausgeschlossen, da auch retrospektive Studien, die über 21 Jahre hinweg Patienten begleitet haben, bis heute keinen CJD-Fall nach sekundärer Transmission von Blutprodukten (sporadische, hereditäre und iatrogene CJD-Donoren) detektieren konnten (Crowder et al. 2017).

4.3.3.1 Einfluss der PrP^{sc}-Typen und des 129M/V-Polymorphismus des *PRNP*-Gens auf die Transmissionseigenschaften der vCJD im Vergleich zu der sCJD

Der 129M/V-Polymorphismus sowie die PrP^{sc}-Typen 1 und 2 werden als Ursache möglicher Transmissionsbarrieren bezüglich der Prionerkrankungen diskutiert. Dieses **Codon 129** des *PRNP*-Gens kann entweder aus den Basen ATG, codierend für die Aminosäure Methionin (M) bzw. aus dem Basentriplett GTG, codierend für die Aminosäure Valin (V) bestehen (Brown und Mastrianni 2010). In der kaukasischen Population beziffert sich die

Allelfrequenz von Val auf 0.34 und von Met auf 0.66 (Owen et al. 1990). Die genotypische Verteilung in ebendieser Population ist 37% Met/Met, 51% Met/Val und 12% Val/Val. Somit dominiert in der Bevölkerung der heterozygote Anteil. Betrachtet man nun die Genotypen der sCJD-Patienten bezüglich des Codons 129, was man in einer Studie in Großbritannien getan hat, fällt auf, dass 89% homozygot (Val/Val oder Met/Met) an Codon 129 waren (Palmer et al. 1991), wohingegen nur 49% in der Normalbevölkerung eine Homozygotie an diesem Codon aufweisen (Owen et al. 1990; Laplanche et al. 1994, Salvatore et al. 1994). Zusammenfassend kann man also sagen, dass der Anteil an homozygoten Genotypen bei sCJD-Patienten überrepräsentiert ist und schlussfolgern, dass eine Homozygotie an diesem Codon 129 mit einer erhöhten Anfälligkeit für sCJD einhergeht. (Wadsworth 2004, Mallik et al. 2010, Korth et al. 2003). Des Weiteren muss bezüglich der japanischen Bevölkerung der Polymorphismus E219K des *PRNP*-Gens genannt werden, bei der ebenfalls die Homozygotie ein Risikofaktor für die Entwicklung der sCJD darstellt (Shibuya et al. 1998, Shibuya et al. 1998b). Ebenso sind alle bisher gesicherten bzw. wahrscheinlichen vCJD-Fälle an Codon 129 für Methionin homozygot. Daher liegt auch hier die Vermutung nahe, dass eine Assoziation eines homozygoten vCJD-Genotyps mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber der jeweiligen Erkrankung einhergeht (Diack et al. 2014). Im Jahr 2016 konnte jedoch erstmals ein Patient mit einer gesicherten vCJD-Diagnose und einem heterozygoten Genotyp an Codon 129 identifiziert werden (Mok et al. 2017), was die Möglichkeit einer zweiten Erkrankungswelle bei Individuen mit diesem Genotyp und mit einer längeren Inkubationszeit bedeuten könnte (Mackenzie und Will 2017). Hinzukommend zeigte die genetische Auswertung des lymphatischen Gewebes PrP^{sc}-positiver Appendizes einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Valin/Valin homozygoten Genotypen an Codon 129 (Gill et al. 2013), jedoch ohne die abschließende Diagnose einer vCJD, sodass bislang kein 129MV-Polymorphismus im Rahmen der vCJD ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren werden weitere Genloci diskutiert, die bezüglich der verstärkten Empfindlichkeit gegenüber der vCJD weiter untersucht werden sollten (Mead et al. 2012), z. B. gibt es weitere Studien die eine Bedeutung des Cathepsin-D-Polymorphismus (Bishop et al. 2008) sowie des *MTMR7*- (Sanchez-Juan et al. 2012) oder des *PLCXD3*- Gens diskutieren (Bishop et al. 2013).

Ergänzend zu dem 129-M/V-Polymorphismus des *PRNP*-Gens werden, wie oben bereits angedeutet, die unterschiedlichen **PrP^{sc}-Typen** als Ursache möglicher Transmissionbarrieren diskutiert. 1992 konnten Marsh et al. zwei TME-Erregerstämme in Hamstern identifizieren, die sie als Hyper (HY) und Drowsy (DY) bezeichneten. Sie unterschieden sich in ihren biologischen Eigenschaften, welche auf die differierenden biochemischen Charakteristika des PrP^{sc}, wie ihre Sensitivität gegenüber dem Proteinase-K-Verdau oder ihrem Migrationsverhalten in Polyacrylamid-Gelen zurückgeführt werden konnten, sodass daraufhin zwei verschiedene PrP^{sc}-Typen (HY-PrP^{sc} und DY-PrP^{sc}) benannt wurden (Bessen und Marsh 1992; Bessen und Marsh 1994). Parchi et al. transferierten 1996 dieses Hamster-Modell der unterschiedlichen PrP^{sc}-Typen auf die humane sCJD und konnten hier ebenfalls (s. Kapitel 1.5.1), aufgrund ihrer divergierenden biochemischen Eigenschaften und aufgrund ihres

unterschiedlichen Migrationsverhaltens in der SDS-Page, zwei PrP^{sc}-Typen voneinander unterscheiden. Im Verlauf zeigte sich, dass der PrP^{sc}-Typ 2 nur bei der vCJD sowie bezüglich der sCJD nur in Kombination mit dem heterozygoten Genotyp am Codon 129 des *PRNP*-Gens vorkommt. Dieser Fakt stellt ein wichtiges Differenzierungsmerkmal bezüglich der humanen erworbenen Prionerkrankungen dar. Hinzukommt, dass sich die vCJD unter den humanen erworbenen Prionerkrankungen durch die Prionakkumulation im LRS auszeichnet, sodass unter Berücksichtigung dieser beiden Fakten ein möglicher Gewebetropismus der jeweiligen PrP^{sc}-Typen je nach Erregerstamm zu diskutieren wäre. Doch warum scheint sich nur der PrP^{sc}-Typ 2 im LRS zu replizieren und dort zu akkumulieren, bevor es zu einer Neuroinvasion kommt, wohingegen der PrP^{sc}-Typ 1 nur im ZNS detektiert werden kann. Unter natürlichen Bedingungen können diese Unterschiede, aufgrund der Unmöglichkeit der gezielten Ausschaltung einzelner Variablen, nicht auf eine einzige Variable zurückgeführt werden, deswegen existieren weiterhin Thesen, die besagen, dass die Transmissionsroute den Tropismus der PrP^{sc}-Ablagerungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Fragmentgrößen und Glykosylierungsmuster und konsekutiv durch ihre unterschiedlichen Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen (Parchi et al. 1997; Collinge 2005; Marín-Moreno et al. 2017) determiniert (s. Kapitel 4.3.3.3); oder dass der Priontyp 1 bzw. DY-PrP^{sc} gar nicht erst das FAE überwinden kann bzw. nur in einer sehr geringen Konzentration und somit die PrP^{sc}-Konzentration, die das GALT erreicht, nicht für eine Neuroinvasion ausreichend ist. Deswegen sähe man z. B. den PrP^{sc}-Typ 2 vornehmlich in der varianten CJD bzw. in der Kuru-Erkrankung, da dieses Glykosylierungsmuster die Transmission nach oraler Aufnahme bzw. die Ausbreitung des PrP^{sc}-Typ 2 erleichtert und so die vCJD bzw. Kuru entstehen kann (Li et al. 2001). Doch warum gelang dann, unter Annahme dieser These, kein PrP^{sc}-Nachweis im LRS von Kuru-Patienten (s. Kapitel 1.6.3.3 und Kapitel 1.6.3.11)? Weiterhin würde diese These jedoch implizieren, dass alle Prionerkrankungen, die einen PrP^{sc}-Typ 2 aufweisen, potenziell oral übertragbar wären, was ein mögliches Risiko für die Übertragung der Scrapie- aber auch der CWD-Erkrankung auf den Menschen möglich machten. Des Weiteren bleibt bislang nicht abschließend erklärbar, warum bislang kein PrP^{sc}-Nachweis im LRS von heterozygoten sCJD-Fällen gelang. Zum einen müssen die Detektionsschwellen der verwendeten Nachweismethoden als Ursache berücksichtigt werden. Jedoch kann auch über einen möglichen differierenden zoonotischen Subtyp des PrP^{sc}-Typ 2 nach oraler Aufnahme diskutiert werden, der sich durch seine Akkumulation im LRS von dem PrP^{sc}-Typ 2 in heterozygoten sCJD-Personen und auch vom PrP^{sc}-Typ 2 in Kuru-Fällen unterscheidet. Diesbezüglich wäre es interessant die PrP^{sc}-Ablagerungsmuster, -Ausbreitungsrouten sowie ihre PrP^{sc}-Typisierung nach oraler klassischer, aber auch atypischer Scrapie- bzw. CWD-Aufnahme im Vergleich zu anderen peripheren Transmissionrouten zu untersuchen. Einen wichtigen Hinweis, um die Ursachen für die PrP^{sc}-Typ 2-Akkumulation im LRS im Gegensatz zum PrP^{sc}-Typ 1 besser verstehen können, lieferten Shikiya et al. im Jahr 2017 (Shikiya et al. 2017). Sie zeigten, dass der PrP^{sc}-Typ 1 bzw. das DY-PrP^{sc} sehrwohl aus dem Darmlumen in das GALT gelangt und es ebenfalls anschließend in den SLOs (z. B. im Milzgewebe) in ähnlicher

Lokalisation wie der PrP^{sc}-Typ 2 (z. B. Keimzentren) detektiert werden kann. Jedoch erfolgt im Falle der peripheren DY-PrP^{sc}-Inokulation keine erfolgreiche Neuroinvasion bzw. ein klinischer Ausbruch der Prionerkrankung – jedoch bei direkter Inokulation in periphere Nerven – sodass geschlussfolgert werden kann, dass der Unterschied in der Prionpathogenese zwischen diesen beiden Priontypen auf Ebene der SLOs zu finden sein muss. Dieser ist laut Shikiya et al. durch die im Vergleich zum HY-PrP^{sc}-Typ niedrige Rate an DY-PrP^{sc}-Replikation und die hohe Rate an DY-PrP^{sc}-Degradation bedingt. Weiterhin stellten sie fest, dass diese Imbalance nicht nur aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der PrP^{sc}-Typen bedingt ist, sondern auch von dem umgebenden Gewebe abhängt, da in vitro die Prionreplikation in Hirngewebe schneller abläuft als im Milzgewebe. Welche hierfür notwendigen Cofaktoren benötigt werden, ist bislang unbekannt. Das Wissen um die Ursache und Lokalisation für eine erfolgreiche Neuroinvasion nach oraler PrP^{sc}-Aufnahme kann Möglichkeiten für neue diagnostische, aber auch therapeutische Maßnahmen eröffnen.

4.3.3.2 Die Rolle der Speziesbarriere in Bezug auf die Suszeptibilität der Priontransmission zwischen zwei Spezies

Die bislang bedeutendsten Inter-Spezies-Übertragungen stellen die vom Schaf auf das Rind im Rahmen der BSE-Epidemie (Groschup et al. 2001) sowie die vom Rind auf den Menschen dar, was in dem Ausbruch der neuen Variante der CJD endete (Bruce et al. 1997; Collinge 1997). Bei der Prionübertragung zwischen zwei unterschiedlichen Arten lassen sich unterschiedliche Verläufe beobachten. Zum einen lässt sich das Phänomen der „**Adaptation**“ erkennen. Diese bedeutet, dass bei dieser Übertragung z. B. die Inkubationszeiten stark variieren können im Vergleich zu der Übertragung innerhalb einer Spezies. Überträgt der Empfänger jedoch das infektiöse Agens innerhalb seiner Spezies immer weiter, zeigt sich im Verlauf eine immer kürzer und uniformer werdende Inkubationszeit (Marín-Moreno et al. 2017; Lasmezas et al. 2001). Zum anderen kann es ebenfalls, wie bei der vCJD (s. Kapitel 1.6.3.10) beschrieben, zu einem **subklinischen Verlauf** kommen, bei dem der subklinische Empfänger jedoch andere seiner Spezies letal infizieren kann. Hierbei kann sich eine subklinische Infektion im weiteren Krankheitsverlauf in eine manifeste und tödlich endende Prionerkrankung entwickeln oder die Inkubationszeit für diese Erkrankung ist länger als die durchschnittliche menschliche Lebenserwartung, sodass es nie zu einem Krankheitsausbruch kommen muss (Bishop et al. 2006). Des Weiteren treten ebenfalls nach Übertragung ein **sofortiger Krankheitsausbruch** oder eine komplette **Resistenz** gegenüber der Krankheitsübertragung auf (Marín-Moreno et al. 2017). I. Pattison entdeckte Ende der 60er Jahre die sogenannte Speziesbarriere (Pattison 1965), die letzteres genanntes Phänomen erklärte, „[...] warum ein Prion bei der einen Art nicht oder nur unter Schwierigkeiten, bei anderen Arten jedoch relativ leicht eine Krankheit auszulösen vermag“ (Prusiner 2001). Es zeigte sich, dass eine „[...] erfolgreiche Übertragbarkeit [zwischen zwei unterschiedlichen Arten] hauptsächlich eine Frage des Grades der PrP-Aminosäuresequenzhomologie zwischen Spender- und Empfängerart [ist]“ (Prusiner 2001). Je homologer das Spender- und Empfänger-PrP^c war,

desto besser konnte die Prionerkrankung übertragen werden (Prusiner et al. 1990). So konnte die Übertragung zwischen Schaf und Rind erfolgreich stattfinden, da sich die Aminosäuresequenz des PrP^c dieser beiden Arten an nur sechs Positionen unterscheidet (Prusiner 2001). Des Weiteren ist entscheidend an welcher Stelle der Aminosäuresequenz die Überschneidungen auftreten (Krakauer et al. 1996), denn einige „[...] Bereiche [...] scheinen für die Effizienz (oder Ineffizienz) der Artenschranke bedeutsamer zu sein als andere“ (Prusiner 2001; Schätzl et al. 1995; Prusiner 2001; Telling et al. 1995). Jedoch muss auch angemerkt werden, dass die Umgebungsbedingungen im Empfänger entscheidend für mögliche Konformationsänderungen der Tertiär- und Quartärstruktur des Prionproteins sind und somit trotz gleichen Ursprungs unterschiedliche Prionerregersämme mit divergierenden biochemischen und klinischen Eigenschaften entstehen können und eine Übertragung erfolgreich oder nicht erfolgreich sein kann (Peretz et al. 2002; Crowell et al. 2015a; Espinosa et al. 2016). Letztendlich zeigt das neue missgefaltete Prionprotein im Empfänger die eigene, artenspezifische und in der aktuellen Umgebung biochemisch stabile Aminosäuresequenz des PrP^c und nicht die des inokulierten PrP^{sc} (Bockman et al. 1987). Somit kann z. B. eine Maus in verschiedenen Geweben jeweils unterschiedliche pathologische Prionproteine aufweisen, obwohl diesem Tier nur ein Erregerstamm des Prionproteins übertragen wurde (Béringue et al. 2008).

4.3.3.3 Hat die Transmissionsroute einen Einfluss auf den Phänotypen?

Zusammenfassend stellten Brandner et al. 2008 fest, dass Kuru am ehesten Ähnlichkeit mit der iCJD (periphere Transmission von kontaminiertem Wachstumshormon) (Brandner et al. 2008) bzw. einem seltenen Subtyp der sCJD (Parchi et al. 1996) aufweist (s. Kapitel 4.3.3) und somit die vCJD, u. a. aufgrund der immunhistochemischen Detektion von PrP^{sc} im lymphoretikulären Gewebe, einen von den übrigen erworbenen humanen Prionerkrankungen distinkten Prionerregersamm darstellt und die distinkten Eigenschaften somit nicht auf die periphere Transmissionsroute sondern auf die Prionerregersammeigenschaften zurückzuführen sein müssen. Wenn man jedoch annimmt, dass das infektiöse Agens der Kuru-Erkrankung nicht wie angenommen oral aufgenommen wurde, sondern wie ebenfalls diskutiert parenteral über mukösen Kontakt mit infektiösem Gewebe, z. B. konjunktival oder transdermal (Goodfield 1997; Liberski und Gajdusek 1997), stellt die vCJD wiederum die einzige humane erworbene Prionerkrankung dar, die oral akquiriert wurde und die o. g. These muss kritisch hinterfragt werden, da der Infektionsweg dann doch eine entscheidende Rolle bezüglich der distinkten phänotypischen und histopathologischen Eigenschaften spielen kann und somit das LRS einzig aufgrund der enteralen Infektionsroute beteiligt wäre. Dies wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung, warum kein PrP^{sc}-2-Nachweis im LRS von Kuru-Patienten gelang.

4.3.3.4 Haben die Inkubationszeiten einen Einfluss auf den Phänotyp?

Genauso könnte es sein, dass die bislang diagnostizierten vCJD-Fälle allesamt eine kurze Inkubationszeit gemein haben und deren Charakteristikum die Replikation von PrP^{sc} im

lymphatischen Gewebe darstellt. Die Fälle mit längerer Inkubationszeit und möglicherweise fehlender Replikation von PrP^{sc} in lymphatischen Gewebe sind eventuell einfach nur noch nicht ausgebrochen (Hill et al. 1999a).

4.3.3.5 Zusammenfassung der Übertragbarkeit von Prionerkrankungen

Somit existieren bislang insgesamt „[...] fünf [gesicherte] Faktoren, die die Effizienz der Übertragbarkeit determinieren: (I) der Übertragungsweg [intrazerebral, parenteral, enteral], (II) die Infektionsdosis [je höher, desto effizienter] (Titer), (III) die Aminosäuresequenz und dreidimensionale Struktur des Prionstammes [einschließlich der Glykosylierungsstruktur des PrP^c und des PrP^{sc} (Wiseman et al. 2015)], (IV) das Prion-Protein-Gen der Empfängerspezies und (V) die indirekt aus (III) und (IV) resultierende Wechselwirkung zwischen dem eindringenden PrP^{sc} und dem PrP^c der infizierten Spezies.“ (Hörnlimann 2001a)

4.4 Offene Fragen und Ausblick

Anhand des Ergebnisses dieser Arbeit kann die Annahme, dass das LRS der sCJD frei von PrP^{sc} ist, mit Hilfe der PET-Blot-Methode bestätigt werden. Diese vorherige in der Literatur beschriebene Erkenntnis basierte auf der Untersuchung des LRS-Gewebes mit immunhistochemischen Untersuchungen, wie z.B. dem Western-Blot. In der Vergangenheit zeigt sich jedoch bereits, dass die PET-Blot-Methode einen sensitiveren Nachweis bezüglich des PrP^{sc}-Nachweises bei Prionerkrankungen und insbesondere bezüglich der sCJD erbringen konnte, als die genannten konventionellen Methoden, sodass es galt, diese, die vCJD als distinkte humane Prionerkrankungen charakterisierende Annahme mit ausschlaggebenden Konsequenzen für das Verständnis, die Diagnostik und therapeutische Ansätze mit Hilfe der PET-Blot-Methode zu verifizieren. Nach diesem Ergebnis stellt die vCJD weiterhin eine in den humanen Prionerkrankungen alleinstehende Krankheitsentität dar, da sich nur hier das PrP^{sc} im LRS detektieren lässt. Somit gilt es in der Zukunft, diese distinkte Eigenschaft näher zu charakterisieren, den dahinterstehenden Pathomechanismus besser verstehen zu lernen und den Grund, warum das PrP^{sc} nur hier gefunden werden kann, herauszufinden. Könnte es auch in Anbetracht der Vielfalt des PrP^{sc} auch Varianten bei den übrigen Prionerkrankungen geben, die mit den bislang durchgeführten Methoden und Behandlungen degradiert werden und somit nicht mehr nachweisbar wären? Oder liegt der Grund der PrP^{sc}-Akkumulation im LRS tatsächlich in der oralen Transmissionsroute? Doch warum zeigen dann Kuru-Erkrankte hier keinen Nachweis? Oder liegt das Geheimnis in der zoonotischen Herkunft des PrP^{sc}, da die vCJD die bislang einzige bekannte humane Prionerkrankung nach Transmission einer tierischen Prionerkrankung darstellt und die orale Transmission einer humanen Prionerkrankung (vermutlich sCJD als Grund für die Kuru-Epidemie) keine PrP^{sc}-Akkumulation im LRS zeigte? Diesbezüglich muss auch die neue atypische/Nor98 Scrapie sowie die CWD kritisch hinterfragt werden und eine mögliche Übertragbarkeit über die Nahrungskette auf den Menschen ausgeschlossen und die Speziesbarriere besser verstanden werden. Bislang sind bereits einige Faktoren bekannt, die diese entscheidend beeinflussen, wie der PrP^{sc}-Typ

oder der 129MV-Polymorphismus des *PRNP*-Gens, jedoch sind die genauen Mechanismen weiterhin unbekannt. Interessanterweise fanden Wemheuer et al. 2009 heraus, dass die atypische/Nor98 Scrapie viele Parallelen zu dem sCJD-Typ 1 aufweist und die klassische Scrapie stark dem sCJD-Typ 2 gleicht, sodass sie die These aufstellten, dass übergeordnete Gruppen von Prionerkrankungen existieren könnten, die in jeder Spezies präsent sein könnten (Wemheuer et al. 2009b). Hiernach würden die BSE und die vCJD einer übergeordneten Gruppe von PrP^{sc}-Typ2-Erkrankungen zugeordnet werden. Weiterhin muss der positive Nachweis von PrP^{sc} im LRS von vCJD-Patienten und sein tatsächlicher Krankheitswert kritisch aufgearbeitet werden, denn nur weil dieses hier und in keiner anderen humanen Prionerkrankung nachweisbar ist, muss es nicht zwangsläufig ein für die Krankheit charakterisierendes Merkmal sein. Es könnte sein, dass die heute angewendeten Methoden die PrP^{sc}-Akkumulation im LRS der vCJD-Patienten nur detektieren können, weil die PrP^{sc}-Konzentration in den anderen Prionerkrankungen unterhalb der Detektionsschwelle liegt. Ein Beispiel hierfür entstammt der atypischen/Nor98 Scrapie, da hier nur das Bioassay in der Lage war, die Infektiosität der Lymphknoten nachzuweisen, obwohl die PET-Blot-Methode und die übrigen konventionellen immunhistochemischen Methoden dieses bereits als negativ gewertet hatten (Andreoletti et al. 2008). Des Weiteren wurden in Großbritannien PrP^{sc}-Prävalenzen in Appendizes von bis zu 1 von 2000 Personen genannt. Werden diese Personen tatsächlich alle erkranken und bis dahin Andere über eine sekundäre Transmission infizieren? Wenn allerdings kein Krankheitsausbruch oder Transmission stattfindet, was bedeutet dann dieser Nachweis (Mackenzie und Will 2017)? Hinzukommt, dass ebenfalls die sekundären Transmissionsmöglichkeiten z. B. via Blutprodukte noch nicht richtig verstanden sind. Es ist unklar, ab wann das PrP^{sc} im Blut der betroffenen Patienten auftaucht, in welchem Zusammenhang es mit der Inkubationszeit steht und welchen Einfluss die Höhe der PrP^{sc}-Konzentration im Blut auf den Krankheitsverlauf zeigt (McCutcheon et al. 2011). Des Weiteren muss auch in Anbetracht der aktuellen wissenschaftlichen Fortschritte die Übertragungsmöglichkeit via Stammzelltransplantationen in Betracht gezogen werden (Head 2013). Hieraus wird ersichtlich, dass ein entscheidender Schritt im Verständnis der Prionerkrankungen durch das Verständnis der Transmissionseigenschaften erbracht werden würde und dies große Folgen für die Diagnostik und die Therapie dieser Erkrankungen haben könnte. So könnte man frühzeitig risikoarme diagnostische Tools am LRS entwickeln oder das Wissen nutzen, um bei genauerer Kenntnis, die Neuroinvasion z. B. durch Blocken der Kommunikation zwischen FCDs und enterischem Nervensystem zu verzögern bzw. zu stoppen bzw. die Balance der Replikation/Degradation zu Gunsten der Degradation in den SLOs zu verändern. Es ist ebenso denkbar, einen Impfschutz aufgrund des Wissens um die nasal/oral-muköse Infektionsroute durch muköse Vakzination zu entwickeln (Goñi et al. 2005; Goñi et al. 2008). Abschließend kann interessanterweise ein Transfer auf den Überbegriff ‚Proteinaggregationserkrankungen‘ erfolgen, da das Prionprotein nicht das einzige Protein in der Natur ist, das sich durch pathologische Eigenschaften wie das starke Aggregationsverhalten, Unlöslichkeit in Detergenzien oder Resistenz gegenüber proteinzerstörenden Substanzen

auszeichnet. Es gibt z.B. in den *Saccharomyces cerevisiae* ein ähnliches Proteinverhalten der Ure2 und Sup35 (Wickner 1994; Halfmann et al. 2010) und auch bei anderen Proteinaggregationserkrankungen wird diskutiert, inwieweit diese ähnliche Eigenschaften wie das Prionprotein aufweisen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein neuer Überbegriff der *Protein-misfolded disorders* ins Leben gerufen, zu denen mittlerweile u. a. Alzheimer, Parkinson und 20 weitere Erkrankungen gezählt werden (Soto 2001; Chiti und Dobson 2006). Auch zählen weitere Amyloidosen, die sich ähnlich den Amyloidablagerungen im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung verhalten dazu (Prusiner et al. 1983; Kretzschmar 2001). Weiterhin fanden Silveira et al. 2005 interessanterweise heraus, dass nicht etwa die Fibrillen am infektiösesten sind, sondern nicht-fibrilläre, 300-600 kDa-leichte, 14-28 Prionmolekülen entsprechende Partikel (Silveira et al. 2005). Aufgrund dieser Beobachtung wird diskutiert, ob die amyloiden Fibrillen nicht infektiös bedingt, sondern als protektive Immunreaktion des Organismus auf die gefährlichen kleinen, subfibrillären Oligomere anzusehen ist, wie es bereits bei der Alzheimer Erkrankung oder anderen Amyloidosen spekuliert wird (Aguzzi und Calella 2009).

Aus all diesen Fragen und den fehlenden Antworten wird ersichtlich, wie bedeutend die Prionerkrankungen noch heute sind und dass diese Erkrankungen besser verstanden werden müssen – nicht nur zur besseren Diagnostik und Therapie der Prionerkrankungen selbst, sondern auch aufgrund Ihrer Bedeutung für andere Proteinaggregationserkrankungen.

5 Zusammenfassung

Die Prionerkrankungen umfassen eine neurodegenerative Erkrankungsgruppe in Menschen und Tieren, deren Gemeinsamkeit es ist, durch ein sich falsch gefaltetes körpereigenes (PrP^c) Protein (PrP^{sc}) ausgelöst zu werden, immer tödlich zu verlaufen und innerhalb einer Spezies und über Speziesgrenzen hinweg potenziell übertragbar zu sein. Bezüglich der humanen Prionerkrankungen unterscheidet man die sporadischen (idiopathisch), die hereditären (genetisch) und die erworbenen (transmissibel) Prionerkrankungen. Neben Unterschieden in der Ätiopathogenese, der Inkubationszeit, der klinischen Ausprägung, der Diagnostik sowie der Neuropathologie findet sich vor allem ein für die Bevölkerung wichtiger Unterschied zwischen der sCJD und der vCJD in ihrer potenziellen Übertragbarkeit. Wo bei der sCJD eine mögliche Übertragbarkeit dieser Erkrankung nur durch zentrale Inokulation über kontaminierte Medizinprodukte bekannt ist, ist bei der vCJD auch eine periphere Übertragung über Blutprodukte möglich. Bezüglich der letztgenannten Erkrankung bereitet vor allem der Bevölkerung Großbritanniens der PrP^{sc}-Nachweis im peripheren Gewebe nach oralem Eintrag des BSE-Erregers in den menschlichen Körper große Sorge, da dieser im lymphatischen System (LRS) oder im Blut sogar bereits vor Einsetzen klinischer Symptome positiv ist und so bereits Übertragungen durch Blutspenden nachgewiesen werden konnten. Hier kommt erschwerend hinzu, dass die Prionerkrankungen bislang nur durch eine histologische Untersuchung von Hirngewebe (prä- oder postmortal) sicher diagnostiziert werden können. Seit der Entdeckung von PrP^{sc} im lymphatischen Gewebe (Tonsillen und Appendix) bei vCJD-Patienten noch vor Ausbrechen klinischer Symptome, breitet sich die Hoffnung aus, bereits präklinisch diese Erkrankung durch gezielte Biopsien diagnostizieren zu können. Hinzu kommen Meldungen über positive PrP^{sc}-Nachweise in Blutproben sowie die Möglichkeit, diese als diagnostisches Tool nutzen zu können. Doch diese Ergebnisse liefern nur einen diagnostischen Nutzen und Erkenntnisse über mögliche differierende Pathomechanismen, wenn man sie hierdurch von den übrigen humanen Prionerkrankungen, insbesondere von der sCJD, unterscheiden kann. Dies legen die o. g. Studien nahe – doch noch stand ein negativer Nachweis der untersuchten und relevanten Gewebeproben der sCJD-Patienten mit der bislang hierfür sensitivsten Untersuchungsmethode - der PET-Blot-Methode - aus, so dass diese genannten negativen Nachweise des sCJD-Gewebes differenziert betrachtet werden müssen. Diese diagnostische Lücke konnte ich nun mit dieser Untersuchung schließen. Ich konnte mit Hilfe verschiedener in der Literatur diskutierter Gewebetypen des LRS von humanen sCJD-Patienten im Vergleich zu entsprechendem Gewebe von klassischen Scrapie-Fällen belegen, dass auch mit Hilfe der PET-Blot-Methode kein PrP^{sc}-Nachweis im lymphatischen Gewebe von sCJD-Patienten, iCJD-Patienten und im Gewebe anderer neurodegenerativer Erkrankungen möglich ist, sodass bestätigt werden kann, dass bislang nur die vCJD im Bereich der humanen Prionerkrankungen einen positiven Nachweis (mit Hilfe von Western-Blot, Immunhistochemie, Bioassay und PET-Blot) für PrP^{sc} im peripheren lymphatischen Gewebe erbringt. Das LRS-Gewebe der klassischen Scrapie-Erkrankung konnte als Positivkontrolle genutzt werden, da dieses, wie auch die BSE oder die CWD in Hirschen

weitere tierische Prionerkrankungen darstellen, die als einzige das PrP^{sc} im LRS präsentieren. Doch warum sich nur in Menschen bezüglich der vCJD das PrP^{sc} im lymphatischen Gewebe detektieren lässt und ob dies auf die unterschiedlichen Transmissionsrouten, Prionerregerstämme, Inkubationszeiten, die genetischen Voraussetzungen oder das Alter des Wirts zurückzuführen ist, bleibt Gegenstand der Forschung, da dies erhebliche Auswirkungen nicht nur auf die Diagnostik und Therapie der Prionerkrankungen selber, sondern auch auf andere sogenannte Proteinaggregationserkrankungen, wie dem M. Alzheimer oder dem M. Parkinson hat.

6 Literaturverzeichnis

- Adams H, Beck E, Shenkin AM (1974): Creutzfeldt-Jakob disease: further similarities with kuru. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37, 195–200
- Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M (2007): Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 552–561
- Aguzzi A, Calella AM (2009): Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89, 1105–1152
- Alper T, Haig DA, Clarke MC (1978): The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J Gen Virol* 41, 503–516
- Alperovitch A, Brown P, Weber T, Pocchiari M, Hofman A, Will R (1994): Incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe in 1993. *Lancet* 343, 918
- Alpers M, Rail L (1971): Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: clinical and aetiological aspects. *Proc Aust Assoc Neurol* 8, 7–15
- Anaya ZEA, Savistchenko J, Massonneau V, Lacroux C, Andréoletti O, Vilette D (2011): Recovery of small infectious PrP(res) aggregates from prion-infected cultured cells. *J Biol Chem* 286, 8141–8148
- Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F (2000): Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81, 3115–3126
- Andréoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad S, Elsen J-M, Schelcher F (2002): PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* 83, 2607–2616
- Andréoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbière F, Ferré P, Foucras G, et al. (2004): PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* 10, 591–593
- Andreoletti O, Herva M, Cassard H, Espinosa JC, Lacroux C, Simon S: When Atypical Scrapie cross species barriers. prion2008 Conference; 2008 Oct 8-10; Madrid, Spain. Book of Abstracts; 2008. S. 29.
- Antoine JC, Michel D, Bertholon P, Mosnier JF, Laplanche JL, Beaudry P, Hauw JJ, Veyret C (1997): Creutzfeldt-Jakob disease after extracranial dura mater embolization for a nasopharyngeal angiofibroma. *Neurology* 48, 1451–1453
- Armstrong JA, Horne R (1984): Follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. *Lancet* 2, 370–372
- Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK (2002): Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation. *Eur J Immunol* 32, 2817–2826
- Baldauf E, Diringer H, Beekes M (1997): Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* 78, 1187–1197
- Baldauf E, McBride PA, Beekes M (1998): Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* 79, 601–607

- Balkema-Buschmann A, Eiden M, Hoffmann C, Kaatz M, Ziegler U, Keller M, Groschup MH (2011): BSE infectivity in the absence of detectable PrP^{Sc} accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle. *J Gen Virol* 92, 467–476
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000): Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767–811
- Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA (2003): Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol* 77, 583–591
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986): Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417–428
- Beekes M, McBride PA (2000): Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278, 181–184
- Beekes M, McBride PA (2007): The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J* 274, 588–605
- Begara-McGorum I, Clark AM, Martin S, Jeffrey M (2000): Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec* 147, 439–441
- Begara-McGorum I, González L, Simmons M, Hunter N, Houston F, Jeffrey M (2002): Vacuolar Lesion Profile in Sheep Scrapie: Factors Influencing its Variation and Relationship to Disease-specific PrP Accumulation. *J Comp Pathol* 127, 59–68
- Belay ED (1999): Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* 53, 283–314
- Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA (1995): Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 76, 509–517
- 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
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B (2003): Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153, 202–208
- Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R (2005): Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503–514
- Béringue V, Mallinson G, Kaisar M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003): Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain J Neurol* 126, 2065–2073
- Béringue V, Le Dur A, Tixador P, Reine F, Lepourry L, Perret-Liaudet A, Haïk S, Vilotte J-L, Fontés M, Laude H (2008): Prominent and Persistent Extraneural Infection in Human PrP Transgenic Mice Infected with Variant CJD. *PLoS ONE* 3, e1419
- 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

- Bessen RA, Marsh RF (1992): Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66, 2096–2101
- Bessen RA, Marsh RF (1994): Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859–7868
- Bessen RA, Shearin H, Martinka S, Boharski R, Lowe D, Wilham JM, Caughey B, Wiley JA (2010): Prion shedding from olfactory neurons into nasal secretions. *PLoS Pathog* 6, e1000837
- Billette de Villemeur T, Gelot A, Deslys JP, Dormont D, Duyckaerts C, Jardin L, Denni J, Robain O (1994): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease in three growth hormone recipients: a neuropathological study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 111–117
- Binelli S, Agazzi P, Giaccone G, Will RG, Bugiani O, Franceschetti S, Tagliavini F (2006): Periodic electroencephalogram complexes in a patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 59, 423–427
- Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, Tuzi NL, Head MW, Ironside JW, Will RG, Manson JC (2006): Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol* 5, 393–398
- Bishop MT, Kovacs GG, Sanchez-Juan P, Knight RS (2008): Cathepsin D SNP associated with increased risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *BMC Med Genet* 9, 31
- Bishop MT, Sanchez-Juan P, Knight RS (2013): Splice site SNPs of phospholipase PLCXD3 are significantly associated with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *BMC Med Genet* 14, 91
- Bockman JM, Prusiner SB, Tateishi J, Kingsbury DT (1987): Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: Host species-specific epitopes. *Ann Neurol* 21, 589–595
- Bolton DC, Meyer RK, Prusiner SB (1985): Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* 53, 596–606
- Bolton DC, Bendheim PE, Marmorstein AD, Potempska A (1987): Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch Biochem Biophys* 258, 579–590
- Bongianni M, Orrù C, Groveman BR, Sacchetto L, Fiorini M, Tonoli G, Triva G, Capaldi S, Testi S, Ferrari S, et al. (2017): Diagnosis of Human Prion Disease Using Real-Time Quaking-Induced Conversion Testing of Olfactory Mucosa and Cerebrospinal Fluid Samples. *JAMA Neurol* 74, 155
- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB (1990): Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110, 743–752
- Brandner S, Whitfield J, Boone K, Puwa A, O'Malley C, Linehan JM, Joiner S, Scaravilli F, Calder I, P. Alpers M, et al. (2008): Central and peripheral pathology of kuru: pathological analysis of a recent case and comparison with other forms of human prion disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363, 3755–3763
- Brotherston JG, Renwick CC, Stamp JT, Zlotnik I, Pattison IH (1968): Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol* 78, 9–17
- Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA (1998): Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* 75, 29–37

- Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999): Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344, 1–5
- Brown K, Mastrianni JA (2010): The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 277–298
- Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A, Fraser H, Morrison WI, Bruce ME (1999): Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 5, 1308–1312
- Brown KL, Wathne GJ, Sales J, Bruce ME, Mabbott NA (2009): The effects of host age on follicular dendritic cell status dramatically impair scrapie agent neuroinvasion in aged mice. *J Immunol* 183, 5199–5207
- Brown KL, Gossner A, Mok S, Mabbott NA (2012): The effects of host age on the transport of complement-bound complexes to the spleen and the pathogenesis of intravenous scrapie infection. *J Virol* 86, 25–35
- Brown, N (2000): Bovine Spongiform Encephalopathy in Great Britain: A Progress Report; June 2000. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London 2000
- Brown P, Cathala F, Castaigne P, Gajdusek DC (1986): Creutzfeldt-Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases. *Ann Neurol* 20, 597–602
- Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P (1987): The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 37, 895–904
- Brown P, Gajdusek DC (1991): Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet Lond Engl* 337, 269–270
- Brown P, Preece MA, Will RG (1992): „Friendly fire“ in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Lond Engl* 340, 24–27
- Brown P, Gibbs CJ, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC (1994): Human spongiform encephalopathy: The national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 35, 513–529
- 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* 55, 1075–1081
- Brown P, Brandel J-P, Preece M, Sato T (2006): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: The waning of an era. *Neurology* 67, 389–393
- Brown P, Brandel J-P, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, Ladogana A, Pocchiari M, Leschek EW, Schonberger LB (2012): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* 18, 901–907
- Bruce ME, Fraser H (1982): Focal and asymmetrical vacuolar lesions in the brains of mice infected with certain strains of scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)* 58, 133–140
- 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* 72, 595–603
- Bruce ME, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H (1994): Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343, 405–411

- 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
- Bruce ME, Brown KL, Mabbott NA, Farquhar CF, Jeffrey M (2000): Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol Today* 21, 442–446
- Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, Fraser H (2002): Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* 83, 695–704
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339–1347
- Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G, et al. (2007): Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog* 3, e31
- Carp RI (1982): Transmission of scrapie by oral route: effect of gingival scarification. *Lancet* 1, 170–171
- Carp RI, Callahan SM (1981): In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology* 16, 8–13
- Carp RI, Callahan SM (1982): Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology* 17, 201–207
- 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* 61, 185–192
- CDC (1997): Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts -- Japan, January 1979-May 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 46, 1066–1069
- Chadeau-Hyam M, Alperovitch A (2005): Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease in France. *Int J Epidemiol* 34, 46–52
- Chandler RL (1961): Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378–1379
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, et al. (2005): Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308, 1435–1439
- Chiti F, Dobson CM (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333–366
- Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Cyster JG (2008): Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9, 54–62
- Cloucard C, Beaudry P, Elsen JM, Milan D, Dussaucy M, Bounneau C, Schelcher F, Chatelain J, Launay JM, Laplanche JL (1995): Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* 76, 2097–2101
- Cochius JI, Burns RJ, Blumbergs PC, Mack K, Alderman CP (1990): Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotrophin. *Aust N Z J Med* 20, 592–593
- Cohen FE, Prusiner SB (1998): Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* 67, 793–819

- Collinge J (1997): Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 6, 1699–1705
- Collinge J (2001): Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519–550
- Collinge J (2005): Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 906–919
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996): Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of „new variant“ CJD. *Nature* 383, 685–690
- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Frosh A, Mead S, Hill AF, Brandner S, Thomas D, Alpers MP (2008): A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3725–3739
- Comoy EE, Mikol J, Luccantoni-Freire S, Correia E, Lescoutra-EtcheGARAY N, Durand V, Dehen C, Andreatti O, Casalone C, Richt JA, et al. (2015): Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep* 5, 11573
- Cornelius JR, Boes CJ, Ghearing G, Leavitt JA, Kumar N (2009): Visual symptoms in the Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob Disease. *J Neuroimaging* 19, 283–287
- Corona C, Porcaro C, Martucci F, Iulini B, Manea B, Gallo M, Palmitessa C, Maurella C, Mazza M, Pezzolato M, et al. (2009): Olfactory system involvement in natural scrapie disease. *J Virol* 83, 3657–3667
- Corona C, Costassa EV, Iulini B, Caramelli M, Bozzetta E, Mazza M, Desiato R, Ru G, Casalone C (2017): Phenotypical Variability in Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Classical and Atypical Forms. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150, 241–265
- Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, Wadsworth JDF (2008): Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* 416, 297–305
- Crowder LA, Schonberger LB, Dodd RY, Steele WR (2017): Creutzfeldt-Jakob disease lookback study: 21 years of surveillance for transfusion transmission risk. *Transfusion (Paris)* 57, 1875–1878
- Crowell J, Hughson A, Caughey B, Bessen RA (2015a): Host Determinants of Prion Strain Diversity Independent of Prion Protein Genotype. *J Virol* 89, 10427–10441
- Crowell J, Wiley JA, Bessen RA (2015b): Lesion of the olfactory epithelium accelerates prion neuroinvasion and disease onset when prion replication is restricted to neurons. *PLoS One* 10, e0119863
- Cuillé J, Chelle P (1936): La maladie dite tremblante du mouton est- elle inocuable? *CR Acad Sci Paris* 203, 1552–1554
- Defebvre L, Destée A, Caron J, Ruchoux MM, Wurtz A, Remy J (1997): Creutzfeldt-Jakob disease after an embolization of intercostal arteries with cadaveric dura mater suggesting a systemic transmission of the prion agent. *Neurology* 48, 1470–1471
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES (2005): Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630–1634

- Denkers ND, Telling GC, Hoover EA (2011): Minor oral lesions facilitate transmission of chronic wasting disease. *J Virol* 85, 1396–1399
- de Silva R: Human Spongiform Encephalopathy. In: Baker HF, Ridley RM (Hrsg.): *Prion Diseases*. 3; Humana Press, New York 1996, 15–33
- Deslys JP, Jaegly A, d'Aignaux JH, Mouthon F, de Villemeur TB, Dormont D (1998): Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 351, 1251
- Diack AB, Head MW, McCutcheon S, Boyle A, Knight R, Ironside JW, Manson JC, Will RG (2014): Variant CJD. 18 years of research and surveillance. *Prion* 8, 286–295
- Dickinson AG (1976): Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* 44, 209–241
- Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC (1974): Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol* 84, 19–25
- Dickinson AG, Fraser H, McConnell I, Outram GW (1978): Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie. *Nature* 272, 54–55
- Diringer H (1990): Durchbrechen von Speziesbarrieren mit unkonventionellen Viren. *Bundesgesundhbl* 33, 435–440
- Dodelet VC, Cashman NR (1998): Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91, 1556–1561
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Schlechter J, Jaschke J, Kilic E, Bähr M, Hermann DM, Weise J (2015): Cellular prion protein promotes post-ischemic neuronal survival, angioneurogenesis and enhances neural progenitor cell homing via proteasome inhibition. *Cell Death Dis* 6, e2024
- Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR, Mabbott NA (2012): M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol* 5, 216–225
- Donaldson DS, Else KJ, Mabbott NA (2015): The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. *J Virol* 89, 9532–9547
- Donaldson DS, Sehgal A, Rios D, Williams IR, Mabbott NA (2016): Increased Abundance of M Cells in the Gut Epithelium Dramatically Enhances Oral Prion Disease Susceptibility. *PLoS Pathog* 12, e1006075
- Donnelly CA, Ghani AC, Ferguson NM, Wilesmith JW, Anderson RM (1997): Analysis of the Bovine Spongiform Encephalopathy Maternal Cohort Study: Evidence for Direct Maternal Transmission. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat* 46, 321–344
- Douet JY, Zafar S, Perret-Liaudet A, Lacroux C, Lukan S, Aron N, Cassard H, Ponto C, Corbière F, Torres JM, et al. (2014): Detection of Infectivity in Blood of Persons with Variant and Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerg Infect Dis* 20, 114–117
- Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D (1974): Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290, 692–693
- Dürig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmücker U, Bieschke J, Dührsen U, Kretschmar HA (2000): Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol* 108, 488–495

- Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, Campbell T, Lowe J, Mead S, Rudge P, Collinge J, Jackson GS (2011): Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 377, 487–493
- Ernst DR, Race RE (1993): Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* 41, 193–201
- Espinosa JC, Morales M, Castilla J, Rogers M, Torres JM (2007): Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J Gen Virol* 88, 1379–1383
- Espinosa JC, Nonno R, Di Bari M, Aguilar-Calvo P, Pirisinu L, Fernández-Borges N, Vanni I, Vaccari G, Marín-Moreno A, Frassanito P, et al. (2016): PrP^C Governs Susceptibility to Prion Strains in Bank Vole, While Other Host Factors Modulate Strain Features. *J Virol* 90, 10660–10669
- Everington D, Smith AJ, Ward HJT, Letters S, Will RG, Bagg J (2007): Dental treatment and risk of variant CJD – a case control study. *Br Dent J* 202, E19–E19
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004): Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9683–9688
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM (2002): Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113, 177–192
- Foster JD (2004): Maternal transmission studies of BSE in sheep. *J Gen Virol* 85, 3159–3163
- Fraser H, Dickinson AG (1970): Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* 226, 462–463
- Fraser H, Dickinson AG (1978): Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. *J Comp Pathol* 88, 563–573
- Fraser H, McConnell I, Wells GA, Dawson M (1988): Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 123, 472
- Fraser H, Pearson GR, McConnell I, Bruce ME, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ (1994): Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 134, 449
- Gabizon R, Rosenmann H, Meiner Z, Kahana I, Kahana E, Shugart Y, Ott J, Prusiner SB (1993): Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Am J Hum Genet* 53, 828–835
- Gajdusek DC, Zigas V (1957): Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257, 974–978
- Gajdusek DC, Zigas V (1961): Studies on kuru. I. The ethnologic setting of kuru. *Am J Trop Med Hyg* 10, 80–91
- Gajdusek DC, Gibbs CJ (1964): Attempts to demonstrate a transmissible agent in kuru, amyotrophic lateral sclerosis, and other sub-acute and chronic nervous system degenerations of man. *Nature* 204, 257–259
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966): Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794–796
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1967): Transmission and passage of experimental „kuru“ to chimpanzees. *Science* 155, 212–214

- Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, et al. (2008): A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 63, 697–708
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmézas CI, Weiss S (2001): The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20, 5863–5875
- Geschwind MD, Martindale J, Miller D, DeArmond SJ, Uyehara-Lock J, Gaskin D, Kramer JH, Barbaro NM, Miller BL (2003): Challenging the clinical utility of the 14-3-3 protein for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 60, 813–816
- Gibbs CJ, Joy A, Heffner R, Franko M, Miyazaki M, Asher DM, Parisi JE, Brown PW, Gajdusek DC (1985): Clinical and Pathological Features and Laboratory Confirmation of Creutzfeldt-Jakob Disease in a Recipient of Pituitary-Derived Human Growth Hormone. *N Engl J Med* 313, 734–738
- 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* 57, 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
- Glasse R (1967): Cannibalism in the Kuru region of New Guinea. *Trans N Y Acad Sci* 29, 748–754
- Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A (2001): Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* 31, 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
- Glaysner BR, Mabbott NA (2007): Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* 178, 3757–3766
- Goldfarb LG, Korczyn AD, Brown P, Chapman J, Gajdusek DC (1990): Mutation in codon 200 of scrapie amyloid precursor gene linked to Creutzfeldt-Jakob disease in Sephardic Jews of Libyan and non-Libyan origin. *Lancet* 336, 637–638
- Goñi F, Knudsen E, Schreiber F, Scholtzova H, Pankiewicz J, Carp R, Meeker HC, Rubenstein R, Brown DR, Sy M-S, et al. (2005): Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience* 133, 413–421
- Goñi F, Chabalgoity JA, Prelli F, Schreiber F, Scholtzova H, Chung E, Kascsak R, Kascsak R, Brown DR, Sigurdsson EM, Wisniewski T (2008): High Titers of Mucosal and Systemic anti-PrP Antibodies Abrogates Oral Prion Infection in Mucosal Vaccinated Mice. *Neuroscience* 153, 679–686
- González L, Dagleish MP, Bellworthy SJ, Sisó S, Stack MJ, Chaplin MJ, Davis LA, Hawkins S a. C, Hughes J, Jeffrey M (2006): Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet Rec* 158, 325–331
- Goodfield J (1997): Cannibalism and kuru. *Nature* 387, 841

- Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, Chenouard N, de Chaumont F, Martino A, Enninga J, et al. (2009): Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11, 328–336
- Griffith JS (1967): Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043–1044
- Groschup, MH, Weiland F, Straub OC, Pfaff E (1996): Detection of Scrapie Agent in the Peripheral Nervous System of a Diseased Sheep. *Neurobiol Dis* 3, 191–195
- Groschup MH, Hörnlimann B, Buschmann A: Die „natürliche“ und iatrogene Übertragbarkeit der Prionkrankheiten. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 361–370
- 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: Trigeminal Ganglia in CJD. *Ann Neurol* 25, 102–106
- Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE (1982): Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 146, 657–664
- Hainfellner JA, Brantner-Inthaler S, Cervenáková L, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Diringer H, Liberski PP, Regele H, Feucht M (1995): The original Gerstmann-Sträussler-Scheinker family of Austria: divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype. *Brain Pathol* 5, 201–211
- Hainfellner JA, Liberski PP, Guiroy DC, Cervénaková L, Brown P, Gajdusek DC, Budka H (1997): Pathology and immunocytochemistry of a kuru brain. *Brain Pathol* 7, 547–553
- Halfmann R, Alberti S, Lindquist S (2010): Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends Cell Biol* 20, 125–133
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplov D, Hood L, Burlingame A (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274, 1–13
- Hardt M, Baron T, Groschup MH (2000): A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122, 43–53
- Harris DA, Lele P, Snider WD (1993): Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4309–4313
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, et al. (2009): Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226–230
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007): Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 599–614
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2009): Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 615–622
- Head MW (2013): Human prion diseases: Molecular, cellular and population biology: Human prion diseases. *Neuropathology* 33, 221–236
- Head MW, Northcott V, Rennison K, Ritchie D, McCardle L, Bunn TJR, McLennan NF, Ironside JW, Tullo AB, Bonshek RE (2003): Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 342–346

- 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: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. *Am J Pathol* 164, 143–153
- Head MW, Yull HM, Ritchie DL, Bishop MT, Ironside JW (2009): Pathological investigation of the first blood donor and recipient pair linked by transfusion-associated variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 433–436
- Heikenwalder M, Zeller N, Seeger H, Prinz M, Klöhn P-C, Schwarz P, Ruddle NH, Weissmann C, Aguzzi A (2005): Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* 307, 1107–1110
- Heikenwalder M, Kurrer MO, Margalith I, Kranich J, Zeller N, Haybaeck J, Polymenidou M, Matter M, Bremer J, Jackson WS, et al. (2008): Lymphotoxin-dependent prion replication in inflammatory stromal cells of granulomas. *Immunity* 29, 998–1008
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schürmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar HA (1999): Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19, 8866–8875
- Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997a): Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99–100
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P (1997b): The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448–450, 526
- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, et al. (1999a): Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353, 183–189
- Hill AF, Antoniou M, Collinge J (1999b): Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 80, 11–14
- 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
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Penney M, Ritchie D, Ironside JW (2002): Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *BMJ* 325, 633
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW (2004a): Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 203, 733–739
- Hilton DA, Sutak J, Smith MEF, Penney M, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Head MW, Wiley CA, Ironside JW (2004b): Specificity of lymphoreticular accumulation of prion protein for variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Pathol* 57, 300–302
- 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
- Hoffmann C, Eiden M, Kaatz M, Keller M, Ziegler U, Rogers R, Hills B, Balkema-Buschmann A, van Keulen L, Jacobs JG, Groschup MH (2011): BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res* 42, 21

- 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
- Honda RP, Xu M, Yamaguchi K-I, Roder H, Kuwata K (2015): A Native-like Intermediate Serves as a Branching Point between the Folding and Aggregation Pathways of the Mouse Prion Protein. *Structure* 23, 1735–1742
- Hoover CE, Davenport KA, Henderson DM, Denkers ND, Mathiason CK, Soto C, Zabel MD, Hoover EA (2017): Pathways of Prion Spread during Early Chronic Wasting Disease in Deer. *J Virol* 91, e00077-17
- Hope J, Morton LJ, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH (1986): The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J* 5, 2591–2597
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M (1995): A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* 76, 2583–2587
- Hörnlimann B: Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001a, 3–20
- Hörnlimann B: Portrait der Kuru. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001b, 141–146
- Hörnlimann B: Portrait der BSE beim Rind. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001c, 173–180
- Hörnlimann B, Alpers M: Die Epidemiologie der Kuru. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 312-319
- Hörnlimann B, Kretzschmar H, Windl O, Aguzzi A: Die Überwachung der Prionkrankheiten des Menschen. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten: De Gruyter, Berlin 2001a, 239-246
- Hörnlimann B, Pauli G, Harbarth S, Widmer H-R, Simon D: Die Prävention von Prionkrankheiten im medizinischen Bereich. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001b, 415-422
- Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG (1996): The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335, 924–930
- Ishida C, Okino S, Kitamoto T, Yamada M (2005): Involvement of the peripheral nervous system in human prion diseases including dural graft associated Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 325–329
- Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, et al. (2006): Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *Jpn J Infect Dis* 59, 100–107
- Jackson GS, Burk-Rafel J, Edgeworth JA, Sicilia A, Abdilahi S, Korteweg J, Mackey J, Thomas C, Wang G, Schott JM, et al. (2014): Population Screening for Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Using a Novel Blood Test: Diagnostic Accuracy and Feasibility Study. *JAMA Neurol* 71, 421

- Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseurosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Zeitschr Nervenheilk* 70, 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, Wells GA (1988): Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol* 25, 398–399
- Jeffrey M, González L (2004): Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Curr Top Microbiol Immunol* 284, 65–97
- 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* 125, 48–57
- Jeffrey M, Witz JP, Martin S, Hawkins SAC, Bellworthy SJ, Dexter GE, Thurston L, González L (2015): Dynamics of the natural transmission of bovine spongiform encephalopathy within an intensively managed sheep flock. *Vet Res* 46, 126
- Kawauchi Y, Kamitani T, Yagishita S, Kitamoto T, Kishida H (2006): Autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with Met/Val heterozygosity at codon 129 and type 1 protease-resistant prion protein presenting some florid-type plaques and many Kuru plaques in the cerebellum. *Neuropathology* 26, 313–317
- Kim C, Haldiman T, Surewicz K, Cohen Y, Chen W, Blevins J, Sy M-S, Cohen M, Kong Q, Telling GC, et al. (2012): Small protease sensitive oligomers of PrPSc in distinct human prions determine conversion rate of PrP(C). *PLoS Pathog* 8, e1002835
- Kimberlin RH, Walker CA (1979): Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol* 89, 551–562
- Kimberlin RH, Hall SM, Walker CA (1983): Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci* 61, 315–325
- Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, Iwanaga T (2015): Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunol* 8, 650–660
- Kincaid AE, Bartz JC (2007): The nasal cavity is a route for prion infection in hamsters. *J Virol* 81, 4482–4491
- Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI (1990): Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec* 127, 418–420
- Kitamoto T, Tateishi J (1994): Human prion diseases with variant prion protein. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343, 391–398
- Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T, Tateishi J (1992): Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 140, 1285–1294

- 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
- Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RM, Weissmann C, Aguzzi A (1998): PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* **4**, 1429–1433
- Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, Carroll MC, Verbeek JS, Botto M, Walport MJ, et al. (2001): Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* **7**, 488–492
- Knight R: Infectious and Sporadic Prion Diseases; in: Legname G, Vanni S (Hrsg.): *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Band 150; Elsevier, Cambridge 2017, 293–318
- Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR (2009): RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* **183**, 5738–5747
- Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, et al. (2003): Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4784–4789
- Krakauer DC, Pagel M, Southwood TRE, de A. Zanotto PM (1996): Phylogenesis of prion protein. *Nature* **380**, 675–675
- Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W (1996): Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP⁰/0 mice. *Mol Med* **2**, 725–734
- Kretzschmar HA: Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (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* **122**, 1–5
- Kretzschmar HA, Honold G, Seitelberger F, Feucht M, Wessely P, Mehraein P, Budka H (1991): Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Sträussler, and Scheinker. *Lancet* **337**, 1160
- Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsave SF, van Kasteren SI, Wille H, Prusiner SB, Mabbott NA, Peters PJ (2011): Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* **7**, e1002449
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999): Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**, 225–226
- Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A, et al. (2005): Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* **64**, 1586–1591
- Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alperovitch A, Launay JM (1994): Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Neurology* **44**, 2347–2351

- Lasmezias CI, Fournier J-G, Nouvel V, Boe H, Marce D, Lamoury F, Kopp N, Hauw J-J, Ironside J, Bruce M, et al. (2001): Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health. *Proc Natl Acad Sci* 28, 4142–4147
- Lezmi S, Ronzon F, Bencsik A, Bedin A, Calavas D, Richard Y, Simon S, Grassi J, L'Etoile M (2006a): PrP(d) accumulation in organs of ARQ/ARQ sheep experimentally infected with BSE by peripheral routes. *Acta Biochim Pol* 53, 399-405
- Lezmi S, Bencsik A, Baron T (2006b): PET-blot Analysis Contributes to BSE Strain Recognition in C57Bl/6 Mice. *J Histochem Cytochem* 54, 1087–1094
- Li R, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS (2001): The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol* 207, 49–58
- Liberski PP (2013): Kuru: a journey back in time from papua new Guinea to the neanderthals' extinction. *Pathogens* 2, 472–505
- Liberski PP, Gajdusek DC (1997): Kuru: forty years later, a historical note. *Brain Pathol* 7, 555–560
- Ligos C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrone C, Cancedda MG, Madau L, Aguzzi A (2005): PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med* 11, 1137–1138
- Ligos C, Cancedda GM, Margalith I, Santucci C, Madau L, Maestrone C, Basagni M, Saba M, Heikenwalder M (2007): Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PloS One* 2, e859
- Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS (2001): Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol* 166, 3733–3742
- Llewellyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004): Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363, 417–421
- Loertscher R, Lavery P (2002): The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation. *Transpl Immunol* 2, 93–96
- Mabbott NA (2012): Prion pathogenesis and secondary lymphoid organs (SLO). *Prion* 6, 322–333
- Mabbott NA (2017): How do PrPSc Prions Spread between Host Species, and within Hosts? *Pathogens* 6, 60
- Mabbott NA, Brown KL, Bruce ME (1997): T lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein, PrPc. *Biochem Soc Trans* 25, 307S
- Mabbott NA, Williams A, Farquhar CF, Pasparakis M, Kollias G, Bruce ME (2000): Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* 74, 3338–3344
- Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME (2003): Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol* 77, 6845–6854
- Mackenzie G, Will R (2017): Creutzfeldt-Jakob disease: recent developments. *F1000Research* 6, 2053

- Macpherson AJ, Uhr T (2004): Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303, 1662–1665
- Maignien T, Shakweh M, Calvo P, Marcé D, Salès N, Fattal E, Deslys J-P, Couvreur P, Lasmezas CI (2005): Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm* 298, 293–304
- Makzhami S, Passet B, Halliez S, Castille J, Moazami-Goudarzi K, Duchesne A, Vilotte M, Laude H, Mouillet-Richard S, Béringue V, et al. (2014): The prion protein family: a view from the placenta. *Front Cell Dev Biol* 2, 35
- Mallik S, Yang W, Norstrom EM, Mastrianni JA (2010): Live cell fluorescence resonance energy transfer predicts an altered molecular association of heterologous PrP^{Sc} with PrP^C. *J Biol Chem* 285, 8967–8975
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J (1992): The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115, 117–122
- Marín-Moreno A, Fernández-Borges N, Espinosa JC, Andréoletti O, Torres JM: Transmission and Replication of Prions. In: Legname G, Vanni S (Hrsg.): *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Band 150; Elsevier, Cambridge 2017, 181–201
- Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Bernoulli C, Asher DM (1979): Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 5, 177–188
- Masujin K, Matthews D, Wells GAH, Mohri S, Yokoyama T (2007): Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. *J Gen Virol* 88, 1850–1858
- Mathews JD, Glasse R, Lindenbaum S (1968): Kuru and cannibalism. *Lancet* 2, 449–452
- Mathiason CK, Hayes-Klug J, Hays SA, Powers J, Osborn DA, Dahmes SJ, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Telling GC, et al. (2010): B Cells and Platelets Harbor Prion Infectivity in the Blood of Deer Infected with Chronic Wasting Disease. *J Virol* 84, 5097–5107
- McBride PA, Beekes M (1999): Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* 265, 135–138
- McBride PA, Eikelenboom P, Kraal G, Fraser H, Bruce ME (1992): PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol* 168, 413–418
- McCulloch L, Brown KL, Bradford BM, Hopkins J, Bailey M, Rajewsky K, Manson JC, Mabbott NA (2011): Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen. *PLoS Pathog* 7, e1002402
- McCutcheon S, Alejo Blanco AR, Houston EF, de Wolf C, Tan BC, Smith A, Groschup MH, Hunter N, Hornsey VS, MacGregor IR, et al. (2011): All Clinically-Relevant Blood Components Transmit Prion Disease following a Single Blood Transfusion: A Sheep Model of vCJD. *PLoS One* 6, e23169
- McGovern G, Mabbott N, Jeffrey M (2009): Scrapie affects the maturation cycle and immune complex trapping by follicular dendritic cells in mice. *PLoS One* 4, e8186
- McGowan J (1922): Scrapie in Sheep. *Scottish J Agric* 5, 365–375
- McKinley MP, Masiarz FR, Prusiner SB (1981): Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* 214, 1259–1261

- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57–62
- McLean CA, Ironside JW, Alpers MP, Brown PW, Cervenakova L, Anderson RM, Masters CL (1998): Comparative neuropathology of Kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host. *Brain Pathol Zurich Switz* **8**, 429–437
- 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
- Mead S, Uphill J, Beck J, Poulter M, Campbell T, Lowe J, Adamson G, Hummerich H, Klopp N, Rückert I-M, et al. (2012): Genome-wide association study in multiple human prion diseases suggests genetic risk factors additional to PRNP. *Hum Mol Genet* **21**, 1897–1906
- Mead S, Wadsworth JDF, Porter M-C, Linehan JM, Pietkiewicz W, Jackson GS, Brandner S, Collinge J (2014): Variant Creutzfeldt-Jakob disease with extremely low lymphoreticular deposition of prion protein. *JAMA Neurol* **71**, 340–343
- 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* **83**, 2310–2314
- Michel B, Ferguson A, Johnson T, Bender H, Meyerett-Reid C, Pulford B, von Teichman A, Seelig D, Weis JH, Telling GC, et al. (2012): Genetic depletion of complement receptors CD21/35 prevents terminal prion disease in a mouse model of chronic wasting disease. *J Immunol* **190**, 4520–4527
- Miller JM, Jenny AL, Taylor WD, Marsh RF, Rubenstein R, Race RE (1993): Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Sheep with Scrapie. *J Vet Diagn Invest* **5**, 309–316
- Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park K-W, Maderna E, Suardi S, Haik S, Brandel J-P, et al. (2014): Prions in the Urine of Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *N Engl J Med* **371**, 530–539
- Mohri S, Handa S, Tateishi J (1987): Lack of Effect of Thymus and Spleen on the Incubation Period of Creutzfeldt-Jakob Disease in Mice. *J Gen Virol* **68**, 1187–1189
- 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* **376**, 292–294
- Montrasio F, Cozzio A, Flechsig E, Rossi D, Klein MA, Rüllicke T, Raeber AJ, Vosshenrich CA, Proft J, Aguzzi A, Weissmann C (2001): B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4034–4037
- Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, Manson JC (1998): Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* **18**, 118–125
- Morgan KL, Nicholas K, Glover MJ, Hall AP (1990): A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain. *Vet Rec* **127**, 373–376
- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995): Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509–517

- Murray K, Peters J, Stellitano L, Winstone AM, Verity C, Will RG (2011): Is there evidence of vertical transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **82**, 729–731
- Nakato G, Fukuda S, Hase K, Goitsuka R, Cooper MD, Ohno H (2009): New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res* **16**, 227–235
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997): Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* **272**, 6324–6331
- Nathanson N, Wilesmith J, Griot C (1997): Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol* **145**, 959–969
- Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996): Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**, 345–348
- Nevin S, Mcmenemey WH, Behrman S, Jones DP (1960): Subacute Spongiform Encephalopathy—a Subacute Form of Encephalopathy Attributable to Vascular Dysfunction (spongiform Cerebral Atrophy). *Brain* **83**, 519–564
- O'Connor T, Aguzzi A (2013): Prions and lymphoid organs: solved and remaining mysteries. *Prion* **7**, 157–163
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735–746
- Orrù CD, Wilham JM, Vascellari S, Hughson AG, Caughey B (2012): New generation QuIC assays for prion seeding activity. *Prion* **6**, 147–152
- Orrù CD, Bongiani M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, Fiorini M, Pocchiari M, Monaco S, Caughey B, Zanusso G (2014): A Test for Creutzfeldt–Jakob Disease Using Nasal Brushings. *N Engl J Med* **371**, 519–529
- Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow TJ (1990): Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. *Am J Hum Genet* **46**, 1215–1216
- Palmer MS, Collinge J (1992): Human prion diseases. *Curr Opin Neurol Neurosurg* **5**, 895–901
- 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* **90**, 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, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretschmar HA (1997): Typing prion isoforms. *Nature* **386**, 232–233
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, et al. (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* **46**, 224–233

- Parchi P, 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* 97, 10168–10172
- Parchi P, Strammiello R, Giese A, Kretzschmar HA (2011): Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathol* 121, 91–112
- Parry HB (1962): Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity* 17, 75–105
- Pattison IH (1965): Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In: Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Alpers MP (Hrsg.): *Slow, latent and temperate virus infections*. NINDB Monograph 2; US Government Printing, Washington 1965, 249–257
- 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, lxxv–lxxvii
- Peden A, Head MW, Diane LR, Jeanne EB, James WI (2004): Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364, 527–529
- Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJT, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FGH, Ironside JW (2010): Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 16, 296–304
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EEL, et al. (2014): The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 260, 8–20
- Peretz D, Williamson RA, Legname G, Matsunaga Y, Vergara J, Burton DR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR (2002): A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34, 921–932
- Pérez DR, Damberger FF, Wüthrich K (2010): Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol* 400, 121–128
- Pocchiari M, Masullo C, Salvatore M, Genuardi M, Galgani S (1992): Creutzfeldt-Jakob disease after non-commercial dura mater graft. *Lancet* 340, 614–615
- Powell-Jackson J, Weller RO, Kennedy P, Preece MA, Whitcombe EM, Newsom-Davis J (1985): Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human growth hormone. *Lancet* 2, 244–246
- Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A (2002): Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 919–924
- Prinz M, Huber G, Macpherson AJS, Heppner FL, Glatzel M, Eugster H-P, Wagner N, Aguzzi A (2003a): Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol* 162, 1103–1111
- Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, Fu Y-X, Lipp M, Aguzzi A (2003b): Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* 425, 957–962

- Prinz M, Montrasio F, Furukawa H, van der Haar ME, Schwarz P, Rüllicke T, Giger OT, Häusler K-G, Perez D, Glatzel M, Aguzzi A (2004): Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J Neurosci* 24, 5974–5981
- Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144
- Prusiner SB: Die Geschichte der Erforschung von Prionen. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 36-50
- Prusiner SB, Groth DF, Bildstein C, Masiarz FR, McKinley MP, Cochran SP (1980a): Electrophoretic properties of the scrapie agent in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2984–2988
- Prusiner SB, Garfin DE, Cochran SP, McKinley MP, Groth DF, Hadlow WJ, Race RE, Eklund CM (1980b): Experimental scrapie in the mouse: electrophoretic and sedimentation properties of the partially purified agent. *J Neurochem* 35, 574–582
- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR (1981): Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6675–6679
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349–358
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA (1990): Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673–686
- R. L. Klitzman MPA (1984): The Natural Incubation Period of Kuru and the Episodes of Transmission in Three Clusters of Patients. *Neuroepidemiology* 3, 3–20
- Race R, Jenny A, Sutton D (1998): Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and ante-mortem diagnosis. *J Infect Dis* 178, 949–953
- 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
- Ritchie DL, Head MW, Ironside JW (2004): Advances in the detection of prion protein in peripheral tissues of variant Creutzfeldt-Jakob disease patients using paraffin-embedded tissue blotting. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 360–368
- Ritchie DL, Boyle A, McConnell I, Head MW, Ironside JW, Bruce ME (2009): Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. *J Gen Virol* 90, 3075–3082
- Rudge P, Jaunmuktane Z, Adlard P, Bjurstrom N, Caine D, Lowe J, Norsworthy P, Hummerich H, Druyeh R, Wadsworth JDF, et al. (2015): Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years. *Brain* 138, 3386
- Saá P, Castilla J, Soto C (2006): Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 313, 92–94
- Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001): Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810–813
- Safar J, Ceroni M, Piccardo P, Liberski PP, Miyazaki M, Gajdusek DC, Gibbs CJ (1990): Subcellular distribution and physicochemical properties of scrapie-associated precursor protein and relationship with scrapie agent. *Neurology* 40, 503–508

- Sajnanı G, Silva CJ, Ramos A, Pastrana MA, Onisko BC, Erickson ML, Antaki EM, Dynin I, Vázquez-Fernández E, Sigurdson CJ, et al. (2012): PK-sensitive PrP is infectious and shares basic structural features with PK-resistant PrP. *PLoS Pathog* **8**, e1002547
- 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* **94**, 375–379
- Sanchez-Juan P, Bishop MT, Aulchenko YS, Brandel J-P, Rivadeneira F, Struchalin M, Lambert J-C, Amouyel P, Combarros O, Sainz J, et al. (2012): Genome-wide study links MTMR7 gene to variant Creutzfeldt-Jakob risk. *Neurobiol Aging* **33**, 1487.e21-1487.e28
- Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A, Tsujihata M, Matsuo H, et al. (2007): Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **24**, 207–212
- Schätzl H: The Phylogeny of Mammalian and Nonmammalian Prion Proteins. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): *Prions in Humans and Animals*. De Gruyter, Berlin 2007, 119–133
- Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995): Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362–374
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB (2001): Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* **314**, 1209–1225
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA (1996): Preclinical test for prion diseases. *Nature* **381**, 563
- Schulz-Schaeffer WJ, Fatzer R, Vandeveld M, Kretzschmar HA (2000a): Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol Suppl* 173–180
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000b): The Paraffin-Embedded Tissue Blot Detects PrPSc Early in the Incubation Time in Prion Diseases. *Am J Pathol* **156**, 51–56
- Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Seifert B, Miele G, Aguzzi A (2005): Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310**, 324–326
- Segarra C, Bougard D, Moudjou M, Laude H, Béringue V, Coste J (2013): Plasminogen-Based Capture Combined with Amplification Technology for the Detection of PrPTSE in the Pre-Clinical Phase of Infection. *PLoS ONE* **8**, e69632
- Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T (1998a): Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **43**, 826–828
- Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T (1998b): Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **351**, 419
- 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, Miller MW (2003): Other animal prion diseases. *Br Med Bull* **66**, 199–212

- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005): The most infectious prion protein particles. *Nature* 437, 257–261
- Singh J, Udgaonkar JB (2015): Molecular Mechanism of the Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein: Current Understanding and Its Implications. *Biochemistry (Mosc)* 54, 4431–4442
- Soto C (2001): Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett* 498, 204–207
- Soto C (2003): Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4, 49–60
- Soto C (2011): Prion Hypothesis: The end of the Controversy? *Trends Biochem Sci* 36, 151–158
- Spielhauer C, Schätzl HM (2001): PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 44604–44612
- Spiropoulos J, Casalone C, Caramelli M, Simmons MM (2007): Immunohistochemistry for PrP^{Sc} in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 398–409
- St Rose SG, Hunter N, Matthews L, Foster JD, Chase-Topping ME, Kruuk LEB, Shaw DJ, Rhind SM, Will RG, Woolhouse MEJ (2006): Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis* 6, 5
- Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J (2002): Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 104, 279–286
- Stahl N, Prusiner SB (1991): Prions and prion proteins. *FASEB J* 5, 2799–2807
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229–240
- Stahl N, Borchelt DR, Prusiner SB (1990): Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry (Mosc)* 29, 5405–5412
- Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner SB (1992): Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry (Mosc)* 31, 5043–5053
- Stahl N, Baldwin MA, Teplov DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993): Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry (Mosc)* 32, 1991–2002
- Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame AL (1999): Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry (Mosc)* 38, 4885–4895
- Stöhr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, Birkmann E, Panza G, Prusiner SB, Eigen M, Riesner D (2008): Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2409–2414

- Sturzenegger M: Die Klinik der Prionkrankheiten des Menschen. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 247–260
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003): The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* 22, 3591–3601
- Szakai AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JJ (1990): Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. *Anat Rec* 227, 475–485
- Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, et al. (2011): Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* 179, 1301–1309
- Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB (1992): Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7620–7624
- Taylor DM (1989): Scrapie agent decontamination: implications for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 124, 291–292
- Taylor DM, McConnell I, Fraser H (1996): Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol* 77, 1595–1599
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995): Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79–90
- Terry LA, Marsh S, Ryder SJ, Hawkins S a. C, Wells G a. H, Spencer YI (2003): Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 152, 387–392
- Tew JG, Kosco MH, Szakai AK (1989): The alternative antigen pathway. *Immunol Today* 10, 229–232
- Thadani V, Penar PL, Partington J, Kalb R, Janssen R, Schonberger LB, Rabkin CS, Prichard JW (1988): Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J Neurosurg* 69, 766–769
- Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Wrede A, Wemheuer W, Brenig B, Kratzel C, Lemmer K, Beekes M (2007): Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog* 3, e66
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rüllicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996): Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639–642
- Tranulis MA, Gunnes G, Heggebø R, Ulvund M, Landsverk T, Groschup MH, Press CM, Inge Lie K (2000): Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* 81, 2327–2337
- Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB (1988): Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 176, 21–30

- Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, Shaked G, Gabizon R, Taraboulos A (2002): Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry (Mosc)* 41, 12868–12875
- Urwin PJM, Mackenzie JM, Llewelyn CA, Will RG, Hewitt PE (2016): Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study. *Vox Sang* 110, 310–316
- van Duijn CM, Delasnerie-Lauprêtre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, Wientjens DP, Brandel JP, Weber T, Bonavita V, Zeidler M, et al. (1998): Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* 351, 1081–1085
- van Keulen LJ, Schreuder BEC, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld JPM (1995): Immunohistochemical Detection and Localization of Prion Protein in Brain Tissue of Sheep With Natural Scrapie. *Vet Pathol* 32, 299–308
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA (2000): Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl* 16, 57–71
- van Keulen LJ, Vromans MEW, van Zijderveld FG (2002): Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* 110, 23–32
- Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J (2001): Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358, 171–180
- Wadsworth JDF (2004): Human Prion Protein with Valine 129 Prevents Expression of Variant CJD Phenotype. *Science* 306, 1793–1796
- Wadsworth JDF, Joiner S, Linehan JM, Desbruslais M, Fox K, Cooper S, Cronier S, Asante EA, Mead S, Brandner S, et al. (2008a): Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3885–3890
- Wadsworth JDF, Joiner S, Linehan JM, Asante EA, Brandner S, Collinge J (2008b): The origin of the prion agent of kuru: molecular and biological strain typing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363, 3747–3753
- Wang F, Wang X, Yuan C-G, Ma J (2010): Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327, 1132–1135
- Wang J, Gusti V, Saraswati A, Lo DD (2011): Convergent and divergent development among M cell lineages in mouse mucosal epithelium. *J Immunol* 187, 5277–5285
- Ward HJT, Everington D, Cousens SN, Smith-Bathgate B, Leitch M, Cooper S, Heath C, Knight RSG, Smith PG, Will RG (2006): Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Ann Neurol* 59, 111–120
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bähr M, Zerr I (2004): Upregulation of cellular prion protein (PrP^c) 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* 121, 419–420

- Wells GA, Spiropoulos J, Hawkins SA, Ryder SJ (2005): Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet Rec* 156, 401–407
- Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Wemheuer WE, Brenig B, Bratberg B, Schulz-Schaeffer WJ (2009a): Detection of classical and atypical/Nor98 scrapie by the paraffin-embedded tissue blot method. *Vet Rec* 164, 677–681
- Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Schulze-Sturm U, Wemheuer WE, Hahmann U, Gawinecka J, Schütz E, Zerr I, Brenig B, et al. (2009b): Similarities between forms of sheep scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease are encoded by distinct prion types. *Am J Pathol* 175, 2566–2573
- Westaway D, Prusiner SB (1986): Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res* 14, 2035–2044
- Westergaard L, Christensen HM, Harris DA (2007): The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772, 629–644
- Wickner RB (1994): [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566–569
- Wijeratne WV, Curnow RN (1990): A study of the inheritance of susceptibility to bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 126, 5–8
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB (1988): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123, 638–644
- Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ (1991): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 128, 199–203
- Will RG: Portrait der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD). In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin 2001, 152-157
- Will RG (2003): Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 66, 255–265
- Will RG, Matthews WB (1982): Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45, 235–238
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921–925
- Wrede A: Charakterisierung der myopathologischen Veränderungen bei der Kamptokormie des Morbus Parkinson. *Med. Diss. Göttingen* 2011
- Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J (2006): Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 368, 2061–2067
- Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG (1998): Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 161, 1313–1319
- Zabel MD, Reid C (2015): A brief history of prions. *Pathog Dis* 73, ftv087

- Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, von Schroetter C, López García F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K (2000): NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 145–150
- 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 GE, Barraclough CR, Bateman DE, Bates D, Burn DJ, Colchester AC, Durward W, Fletcher NA, Hawkins SA, et al. (1997): New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350, 903–907
- Zeidler M, Sellar RJ, Collie DA, Knight R, Stewart G, Macleod MA, Ironside JW, Cousens S, Colchester AC, Hadley DM, et al. (2000): The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 355, 1412–1418
- Zerr I, Poser S: Die Epidemiologie und Risikofaktoren der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar HA (Hrsg.): Prionen und Prionkrankheiten. De Gruyter, Berlin 2001, 299-305
- Zigas V: *Laughing Death*. Humana Press, Totowa 1990
- Zlotnik I, Rennie JC (1965): Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *J Comp Pathol* 75, 147–157
- 2017: NCJDRSU <http://www.cjd.ed.ac.uk/sites/default/files/worldfigs.pdf>; Zugriff am 09.02.2018
- 2018: NCJDRS <http://www.cjd.ed.ac.uk/sites/default/files/figs.pdf>; Zugriff am 09.02.2018

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brück sowie Frau Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler möchte ich für die sehr freundliche Aufnahme in ihre Abteilung danken.

Prof. Dr. Walter Schulz-Schaeffer möchte ich ausgesprochen herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, die kritische Diskussion aller Daten, die Beantwortung aller Fragen, die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und nicht zuletzt für die Vergabe des Themas und die zuverlässige Betreuung danken.

Unseren „Forschungs-MTAs“ Kerstin Brekerbohm, Manuela Becker und insbesondere Tatjana Pfander möchte ich für die Unterstützung, Beratung und die wirklich schöne Zusammenarbeit danken. Tatjana, ohne deine Hilfe wäre diese Promotion nicht möglich gewesen!