



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2000

**Mechanisms of neuroinvasion by prions: molecular principles and present state of
research**

Brandner, S ; Klein, M A ; Aguzzi, A

Other titles: Mechanismen der Neuroinvasion: molekulare Grundlagen und aktueller Stand der Forschung

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-1919>

Journal Article

Originally published at:

Brandner, S; Klein, M A; Aguzzi, A (2000). Mechanisms of neuroinvasion by prions: molecular principles and present state of research. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 130(12):435-442.

S. Brandner, M. A. Klein, A. Aguzzi

Institut für Neuropathologie,
Universitätsspital Zürich

Mechanismen der Neuroinvasion von Prionen: molekulare Grundlagen und aktueller Stand der Forschung¹

Summary

Mechanisms of neuroinvasion by prions: molecular principles and present status of research

The prion was defined by Stanley Prusiner as the infectious agent that causes transmissible spongiform encephalopathies and equated with the prion protein PrP^{Sc}. Its cognate gene, Prnp, was identified by Charles Weissmann in Zurich, and shown to encode the host protein PrP^C. Since the latter discovery, transgenic mice have contributed many important insights to the field of prion biology, including an understanding of the molecular basis of the species barrier for prions. By disrupting the Prnp gene, it was shown that an organism that lacks PrP^C is resistant to infection by prions. Introduction

of mutant PrP genes into PrP-deficient mice was used to investigate the structure-activity relationship of the PrP gene with regard to scrapie susceptibility. Ectopic expression of PrP in Prnp-knockout mice provided a useful strategy for the identification of host cells competent for prion replication. Finally, the availability of Prnp-knockout mice and transgenic mice overexpressing PrP allows selective reconstitution experiments aimed at expressing PrP in neurografts or in specific populations of haemato- and lymphopoietic cells. The latter studies have allowed us to clarify some of the mechanisms of prion spread and disease pathogenesis

Keywords: prions; neural grafting; lymphoreticular system; neuroinvasion

Zusammenfassung

Das Agens, das übertragbare spongiforme Enzephalopathien hervorruft, wurde 1982 von Stanley Prusiner als Prion bezeichnet und mit dem PrP^{Sc}-Protein gleichgesetzt. Wenige Jahre später gelang es der Arbeitsgruppe von Charles Weissmann in Zürich, das entsprechende Gen zu identifizieren, welches überraschenderweise für ein auf der Zelloberfläche vorkommendes Wirtspolypeptid PrP^C codiert. Seither haben transgene Mäuse entscheidend zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen von Prion-Erkrankungen beigetragen. Weitere fundamentale Erkenntnisse brachten die sogenannten Prnp-«knockout»-Mäuse, denen das Prnp-Gen gezielt ausgeschaltet

wurde: Sie sind resistent gegenüber der Infektion mit Prionen. Das Wiedereinführen von mutierten Prnp-Genen in die «knockout»-Mäuse stellte einen weiteren Schritt dar, um die Zusammenhänge zwischen der Struktur des Prion-Proteins und der Empfänglichkeit gegenüber der Prion-Infektion aufzuklären. Die Expression von PrP in spezifischen Zelltypen des Zentralnervensystems oder des Immunsystems hat weitere Erkenntnisse über die Pathogenese und die Neuroinvasion vermittelt. Schliesslich haben wir die Ausbreitung von Prionen untersucht, indem wir die PrP-Expression in spezifischen Zellkompartimenten – z.B. durch neurale Transplantate im Zentral-

¹ Unsere Arbeiten wurden unterstützt durch den Kanton Zürich, den Schweizerischen Nationalfonds, die Europäische Union, die Bundesämter für Gesundheit, Veterinärwesen, Bildung und Wissenschaft sowie durch die Firmen Migros, Baxter Healthcare und Abbott Diagnostics.

Korrespondenz:
Prof. Dr. med. Adriano Aguzzi
Institut für Neuropathologie
Universitätsspital
CH-8091 Zürich

nervensystem oder durch Knochenmarksrekonstitution im lymphoretikulären System – wiederhergestellt haben. Die Rolle des Immunsystems wurde ausserdem mit Mäusen

untersucht, die spezifische Immundefekte aufwiesen.

Keywords: Prionen; Neuroinvasion; lymphoretikuläres System; neurale Transplantate

Einleitung

Prion-Erkrankungen oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien («transmissible spongiform encephalopathies», TSE) sind neurologische Erkrankungen, die klinisch durch Demenz und Bewegungsstörungen auffallen. In Gehirn finden sich schwammartige («spongiforme») Veränderungen, begleitet von einer Reaktion der Astrozyten, die als Gliose bezeichnet wird. Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) und das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) beim Menschen, die Traberkrankheit bei Schafen und Ziegen sowie der Rinderwahnsinn (BSE) sind die bekanntesten Beispiele. Während Scrapie seit mehr als

250 Jahren bekannt ist, hat sich die BSE vor 15 Jahren erstmals manifestiert und sich seither epidemieartig in Grossbritannien ausgebreitet. Das Auftreten einer neuen Variante der CJK (vCJK) bei bislang 46 jungen Leuten in Grossbritannien [1, 2] und bei einem Opfer in Frankreich [3] ist wahrscheinlich auf eine Infektion mit dem BSE-Erreger über die Nahrungskette zurückzuführen. Dieser beunruhigende Zusammenhang wurde in der Folge mit experimentellen Daten untermauert, die belegen, dass die BSE und vCJK auf denselben Erreger zurückzuführen sind [4].

Molekulare Grundlagen der Prion-Erkrankungen

Nach wie vor bleibt die Natur der Erreger der TSE rätselhaft, obwohl mittlerweile eine Vielzahl experimenteller Daten dafür spricht, dass es sich bei dem infektiösen Agens nicht um einen konventionellen Erreger, sondern überwiegend oder sogar ausschliesslich um ein abnorm gefaltetes Eiweissmolekül handelt [5–7]. Die sogenannte «protein only»-Hypothese wurde erstmals von Griffith aufgestellt [8] und später von Prusiner in eine präzise biologische Fragestellung umgesetzt [9]. Prusiner hat den Ausdruck «prion» geprägt, zusammengesetzt aus «proteinaceous infectious only». Die «protein only»-Hypothese besagt, dass Prionen frei von Nukleinsäuren sind und ausschliesslich aus einer abnorm gefalteten Form des normalen, auf der Oberfläche der Wirtszelle vorkommenden «zellulären» PrP^C (PrP cellular) bestehe. Die abnorm gefaltete Form PrP^{Sc} (PrP Scrapie) unterscheidet sich von PrP^C durch ihre partielle Resistenz gegenüber Eiweissverdau und ist in Detergentien schwerer in Lösung zu bringen.

Mehrere Modelle wurden vorgeschlagen, um den Mechanismus zu erklären, durch den PrP^{Sc} in der Lage ist, PrP^C zu rekrutieren und in

weiteres PrP^{Sc} umzufalten. In dem von Prusiner vorgeschlagenen Modell bewirkt ein PrP^{Sc}-Monomer die Umfaltung eines PrP^C-Moleküls in die PrP^{Sc}-Konformation. Das bedeutet, dass PrP^{Sc} nach Eindringen in eine Zelle die Konversion von PrP^C-Molekülen zu PrP^{Sc}-Molekülen auslösen kann und damit die Replikation der infektiösen Einheit sichergestellt wird. Ein alternatives Modell schlägt hingegen vor, dass die Bildung von PrP^{Sc} durch einen Kristallisationskeim von aggregiertem PrP^{Sc} initiiert wird und schliesslich einen Polymerisationsprozess «triggert», bei dem sich weitere PrP^{Sc}-Moleküle anlagern und dadurch den ganzen Komplex stabilisieren. Hat der Komplex eine gewisse Grösse erreicht, zerfällt er in mehrere Stücke, von denen jedes einen neuen Kristallisationskern darstellt und auf diese Weise den Aggregationsprozess beschleunigt [10]. Allerdings bedürfen beide Modelle noch einer experimentellen Bestätigung. Zwar konnte in einem zellfreien In-vitro-Experiment schon gezeigt werden, dass PrP^{Sc}-Aggregate in der Lage sind, PrP^C in eine Protease-resistente Form zu rekrutieren [11], aber diese Reaktionsprodukte waren nicht infektiös.

Die Rolle von PrP in Prion-Erkrankungen

Wie oben ausgeführt, stellt PrP^C das Substrat für eine Umwandlung in PrP^{Sc} dar. Diese Umwandlung wird durch PrP^{Sc} katalysiert. Entsprechend der «protein only»-Hypothese sollte dann ein Organismus, dem PrP^C fehlt, unempfindlich gegenüber Scrapie sein und auch den Erreger nicht vermehren. Dies konnte experimentell in der Arbeitsgruppe von Weissmann in Zürich eindrucksvoll bestätigt werden. Es wurden Mäuse hergestellt, denen durch einen gezielten genetischen Eingriff das *Prnp*-Gen ausgeschaltet wurde [12]. Es war zunächst überraschend, dass diese Mäuse eine völlig normale Entwicklung zeigten und eine regelrechte Lebenserwartung hatten, denn bislang nahm man an, dass PrP^C aufgrund seines Vorkommens im entwickelnden und reifen Zentralnervensystem eine wichtige Rolle spiele. Die intrazerebrale Verabreichung von Prionen führte weder zu einer Erkrankung der Mäuse noch zu einer Replikation von Infektiosität im Gehirn. Damit wurde die Voraussage der «protein only»-Hypothese eindrucksvoll bestätigt [13, 14].

Heterozygote Mäuse mit nur einem ausgeschalteten *Prnp*-Gen (und einem intakten Wildtyp-Gen) zeigten immerhin eine teilweise Unempfindlichkeit gegenüber Prionen: Statt der 160 Tage Inkubationszeit bei Wildtyp-Mäusen mit zwei *Prnp*-Allelen hatten die heterozygoten (*Prnp*^{+/-}) Mäuse eine Inkubationszeit von etwa 290 Tagen und einen deutlich milderen Verlauf [15]. Das bedeutet, dass die Menge an PrP^C mit der Empfänglichkeit für Prionen korreliert. Dies könnte deshalb von Bedeutung sein, da ein möglicher Therapieansatz auf eine Verringerung der PrP-Menge auf Nervenzellen abzielen könnte.

Welches sind überhaupt die Abläufe, die im Rahmen der Scrapie-Pathogenese toxisch für die Zellen sind? Es wurde allgemein angenommen, dass Ablagerungen des pathologischen Prion-Proteins direkt toxisch auf die Zelle wirken und dadurch Zelltod, z.B. durch Apoptose, auslösen [16, 17]. Andere pathogenetische Mechanismen postulieren erhöhte Zytokin-Spiegel im Zentralnervensystem, die mittelbar oder unmittelbar neurotoxisch wirken [18, 19]. Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmass Prionen direkt neurotoxisch wirken, haben wir *Prnp*^{0/0}-Mäuse mit einem intrazerebralen PrP^C-überexprimierenden Transplantat versehen, welches dann mit Prionen infiziert wurde (Abb. 1). Solche Transplantate zeigten Zeichen einer schweren spongiformen Enzephalopathie (Abb. 2) mit Anreicherung von PrP^{Sc} und Infektiosität [20, 21]. Zusätzlich fanden sich auch im umliegenden Wirtsgehirn erhebliche Mengen an PrP^{Sc} und Infektiosität, jedoch ohne einen erkennbaren Schaden zu verursachen. Diese Befunde legen nahe, dass PrP^{Sc} von sich aus nicht neurotoxisch ist. Vielleicht übt es seine Wirkung nur dann aus, wenn es PrP^C als Substrat vorfindet und den Konversionsprozess in der Zelle auslösen kann. Damit wird auch klar, dass die Plaques, die bei spongiformen Enzephalopathien auftreten, ein Epiphänomen sind und nicht direkt neurotoxisch sind. Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen zeigen, dass Mikrogliazellen mögliche Kandidaten bei der Vermittlung neurotoxischer Effekte von PrP^{Sc} auf PrP^C exprimierende Zellen darstellen.

Die Neuroinvasion der Prionen

Obwohl die intrazerebrale Verabreichung von Prionen weitaus am effektivsten ist, stellt die orale Aufnahme den epidemiologisch relevanteren Infektionsweg dar. Es ist anzunehmen, dass auf diese Weise nicht nur die BSE, sondern auch die neue Variante der CJD übertragen wurde [22]. Da sich aber Prion-Erkrankungen primär als Erkrankungen des Zentralnervensystems manifestieren, ist offenbar die Neuroinvasion der Prionen von entscheidender Bedeutung. In Anbetracht der sehr genau reproduzierbaren Inkubationszeiten kann auch davon ausgegangen werden, dass diese Abläufe einer genauen Kontrolle unterliegen. Unser

wesentlichstes Interesse gilt daher der Aufklärung der Abläufe bei der Ausbreitung von der Peripherie zum Zentralnervensystem. Zunächst haben wir die Frage gestellt, ob Prionen in der Lage sind, von der Peripherie zum Transplantat in einer *Prnp*^{0/0}-Maus zu gelangen. Nach intraperitonealer Gabe von Prionen zeigte keines der intrazerebralen Transplantate Zeichen einer spongiformen Enzephalopathie, und auch die Milzen dieser Mäuse enthielten keine Infektiosität, während die intraperitoneal oder intrazerebral inokulierten Wildtyp-Mäuse Scrapie entwickeln und deren lymphoretikuläres System schon kurz nach der

Inokulation hohe Infektiositäts-Titer enthält. In den folgenden Experimenten wurde dann untersucht, ob der Transport von Prionen in *Prnp*^{0/0}-Mäusen wiederhergestellt werden kann, wenn die PrP-Expression im lymphoretikulären System wiederhergestellt wird. Dazu erhielten *Prnp*^{0/0}-Mäuse zunächst intrazerebrale PrP-exprimierende Transplantate (Abb. 1), die gewissermassen als Indikator für einen stattfindenden Prion-Transport dienen sollten. Diese Mäuse wurden dann bestrahlt und erhielten Knochenmarkszellen (oder alternativ fetale Leberzellen) entweder von Wildtyp- oder

von PrP^C-überexprimierenden Mäusen. Nach intraperitonealer Inokulation mit Prionen war Infektiosität in der Milz, nicht aber im Zentralnervensystem nachweisbar [23]. Wir schliessen daraus, dass es für den Transfer von Prionen von der Milz ins Nervensystem eines PrP-exprimierenden Gewebes bedarf, das sich mittels Knochenmarkstransfer nicht rekonstituieren lässt. Indirekte Befunde lassen eine wichtige Rolle des peripheren Nervensystems bei der Ausbreitung von Prionen von der Peripherie ins Zentralnervensystem vermuten [24–26].

Die Rolle des lymphoretikulären Systems bei der Neuroinvasion der Prionen

Mehrere Arbeiten weisen auf die Bedeutung des lymphatischen Systems bei der Prion-Replikation hin, jedoch war bisher wenig bekannt über die Zellen, welche die Prion-Propagation im lymphoretikulären System unterstützen. Untersuchungen, in denen nach einer intraperitonealen Gabe von Prionen eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt wurde, zeigten, dass die entscheidenden Zellen offenbar weitgehend strahlenunempfindlich sind [27]. Mögliche Kandidaten sind follikulär-dendritische Zellen [28], und tatsächlich akkumuliert PrP^{Sc} in diesen Zellen bei infizierten Wildtyp-Mäusen und in Mäusen mit selektivem T-Zell-Defekt. Weitere Hinweise für die Bedeutung der follikulär-dendritischen Zellen ergaben sich aus Experimenten mit Mäusen, die aufgrund eines kombinierten Immundefekts («severe combined immune deficiency», SCID) keine B- und T-Lymphozyten sowie funktionell beeinträchtigte follikulär-dendritische Zellen besitzen. Diese Mäuse erkrankten nach intraperitonealer Infektion mit Prionen nicht, und weder im Zentralnervensystem noch in der Milz werden Prionen vermehrt. Rekonstitution des lymphoretikulären Systems dieser Mäuse mit (PrP-exprimierenden) Wildtyp-Milzzellen stellt die Empfänglichkeit für Prionen wieder her [29], womit klar wird, dass Bestandteile des Immunsystems für den Transfer von Prionen zum Zentralnervensystem erforderlich sind. Wir haben uns deshalb zum Ziel gesetzt, die Rolle einzelner Komponenten des Immunsystems bei der Prion-Neuroinvasion zu untersuchen. Dazu haben wir eine Reihe von «knockout»-Mäusen mit definierten Defekten des Immunsystems untersucht. Dies waren Mäuse mit kombinierten B- und T-Zell-Defekten (RAG-2^{-/-}, RAG-1^{-/-} und SCID-Mäuse) sowie AGR^{-/-}-Mäuse mit einem zusätzlichen

Fehlen der Rezeptoren für Interferon- $\alpha\beta$ und Interferon- γ . Defekte von B-Zellen wurden an μ MT^{-/-}-Mäusen untersucht, die keine Immunglobuline produzieren, aber funktionelle und vollständige T-Zellen besitzen. Isolierte T-Zell-Defekte wurden an CD4^{-/-}, CD8^{-/-}, β_2 -Mikroglobulin- oder an Perforin-«knockout»-Mäusen untersucht. Zunächst zeigte sich, dass die unterschiedlichen Immundefekte keinen Einfluss auf die Inkubationszeit nach intrazerebraler Inokulation hatten. Hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede nach intraperitonealer Verabreichung von Prionen: Alle Mäuse mit einem isolierten B-Zell-Defekt oder einem kombinierten B- und T-Zell-Defekt blieben klinisch gesund, nicht aber Mäuse mit T-Zell-Defekt und intakten B-Zellen. Diese Ergebnisse legten eine entscheidende Rolle der B-Zellen bei der Propagation von Prionen nach peripherer Inokulation nahe [30]. Da nun aber B-Zell-defiziente Mäuse keine Antikörper produzieren und deren lymphatische Organe keine follikulär-dendritischen Zellen entwickeln, stellte sich die Frage, welcher dieser Faktoren für die Prion-Propagation verantwortlich sein könnte. Es wurden also zwei weitere Mauslinien untersucht: Um den Einfluss von Immunglobulinen zu untersuchen, verwendeten wir Mäuse, die ausschliesslich Antikörper einer IgM-Subklasse (t11 μ MT) produzierten; diese Antikörper besitzen keine nachweisbare Spezifität für PrP. Die Rolle der follikulär-dendritischen Zellen wurde mit Mäusen untersucht, die keine funktionellen follikulär-dendritischen Zellen (TNFR1^{-/-}), jedoch differenzierte B-Zellen besitzen. Beide Mauslinien entwickelten Scrapie nach peripherer Inokulation mit Prionen. Damit wird bestätigt, dass B-Zellen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Prion-Neuroinvasion spielen [30].

PrP-Expression auf B-Zellen ist nicht notwendig für eine Neuroinvasion von Prionen

Da es für die Replikation von Prionen und deren Transport von der Peripherie zum Zentralnervensystem einer Expression von PrP^C bedarf [23], haben wir untersucht, ob die PrP^C-Expression auf Lymphozyten auch für die Neuroinvasion notwendig ist. Dazu wurde in verschiedenen immundefizienten Mäusen (SCID, RAG-1^{-/-} und μ MT^{-/-}) ein adoptiver Knochenmarkstransfer mit fetalen Leberzellen entweder aus Wildtyp- oder aus *Prnp*^{0/0}-Mäusen vorgenommen. Die Rekonstitution induzierte die Bildung von Keimzentren in den Milzen der Mäuse (B-Zell-defiziente Mäuse haben praktisch keine Keimzentren) und führte zur Differenzierung der follikulär-dendritischen Zellen. Als Kontrolle dienten Mäuse mit kombinierten B- und T-Zell-Defekten, die mit fetalen Leberzellen von (B-Zell-defizienten) μ MT^{-/-}-Embryonen rekonstituiert wurden. Hier fanden sich keine follikulär-dendritischen Zellen, in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass B-Zellen (oder deren Produkte) für die Reifung von follikulär-dendritischen Zellen nötig sind. Die rekonstituierten Mäuse wurden nun intraperitoneal mit Prionen infiziert. Überraschenderweise wurden alle mit einer hohen Prionendosis inokulierten Mäuse krank, die mit fetalen Leberzellen immunkompetenter Spender rekonstituiert wurden, egal ob es sich dabei um

Prnp^{+/-} oder *Prnp*^{0/0}-Genotyp handelte. Der Transfer von fetalen Leberzellen von μ MT^{-/-}-Spendertieren hingegen, der als Kontrolle diente, führte nicht zu einer Wiederherstellung der Empfänglichkeit der Mäuse gegenüber intraperitoneal verabreichten Prionen. Weiterhin haben wir untersucht, ob sich in diesen mit fetalen Leberzellen rekonstituierten Mäusen PrP^{Sc} in den fetalen Leberzellen ansammelt. Dies wurde mittels Zweifarben-Immunfluoreszenz-Konfokal-Mikroskopie durchgeführt (Abb. 3). Dabei zeigte sich PrP-immunreaktives Material, das grösstenteils mit dem Netzwerk der follikulär-dendritischen Zellen kolo-kalisiert war [31]. Damit lässt sich aus den Befunden schliessen, dass die follikulär-dendritischen Zellen (FDC) für die Ansammlung, möglicherweise auch für die Replikation von Prionen im lymphoretikulären System (z.B. in der Milz), verantwortlich sind, zumal sie die Zellpopulation darstellen, deren Reifung mit der Anwesenheit von B-Zellen korreliert. Natürlich ist es gleichermassen denkbar, dass follikulär-dendritische Zellen (FDC) lediglich ein Reservoir für Prionen sind und der eigentliche Transport von anderen (B-Zell-abhängigen) Komponenten abhängt oder dass Prionen mit B-Zellen zusammen zu Nervenendigungen transportiert werden.

Abbildung 1

Schematische Darstellung der Transplantation neuroektodermalen Gewebes in adulte Empfänger-mäuse. Trächtigen Mäusen, die das *Prnp*-Gen überexprimieren (transgene Mäuse, Linie tga20), werden zu einem definierten Zeitpunkt Embryonen entnommen. Nach sorgfältiger Präparation des Neuroektoderms wird dieses stereotaktisch in die Kaudoputamenregion oder in den Seitenventrikel der Empfänger-mäuse (*Prnp*^{0/0}) transplantiert.

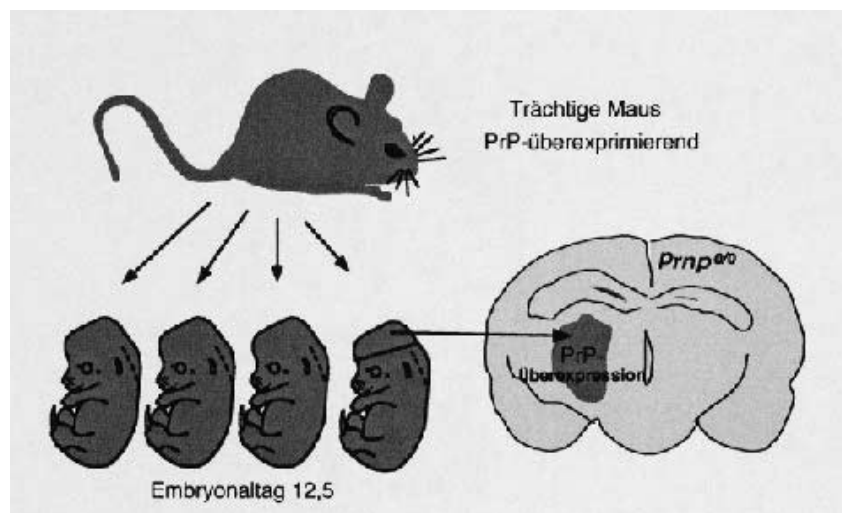


Abbildung 2

Prnp-überexprimierende Transplantate in der Kaudoputamenregion bzw. Seitenventrikel von *Prnp*^{0/0}-Mäusen. In der immunhistochemischen Färbung für saures Gliafaserprotein (GFAP) kommen reaktiv veränderte Astrozyten zur Darstellung.

- Kontrollexperiment, nicht infiziertes Transplantat mit regelrechter Ausdifferenzierung in neuronale und gliale Elemente. Keine reaktiv veränderten Astrozyten und keine Spongiose.
- In der linken Bildhälfte ein Transplantat mit ausgeprägter Gliose und feinblasiger Spongiose. In der rechten Bildhälfte die morphologisch völlig regelrecht erscheinende Kaudoputamenregion des Empfängergehirns.
- 285 Tage nach der Infektion mit Prionen hat sich diese massive grobblasige Spongiose entwickelt, die Astrozyten sind bizarr verformt. Im angrenzenden Corpus callosum des Empfängertieres sind keine pathologischen Veränderungen erkennbar (linker oberer Bildausschnitt).
- «Endstadium» in einem kortikalen Transplantat 465 Tage nach Infektion. Während das umgebende Hirngewebe normal erscheint, sind im Transplantat keine Neurone mehr vorhanden, und die verbleibenden Astrozyten sind bizarr verformt. Im linken oberen Anteil des Transplantats sind noch vereinzelt Neurone vorhanden, daher dort die fokale Spongiose.
- Eine Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 2c: Transplantat 285 Tage nach Infektion. Immunhistochemische Färbung für Synaptophysin: Der lange Pfeil zeigt auf ein Neuron, in dessen Zytoplasma Synaptophysin-positives Material akkumuliert hat. Die Pfeilspitzen markieren grobkörnige Synaptophysin-Ablagerungen (Originalvergrößerung 600×).
- Zwischen den Neuronen liegen z.T. stark verformte Astrozyten, die nicht mehr die typische Sternform aufweisen (GFAP-Immunhistochemie, Originalvergrößerung 600×). In beiden Abbildungen kommt die grobblasige Spongiose zur Darstellung.

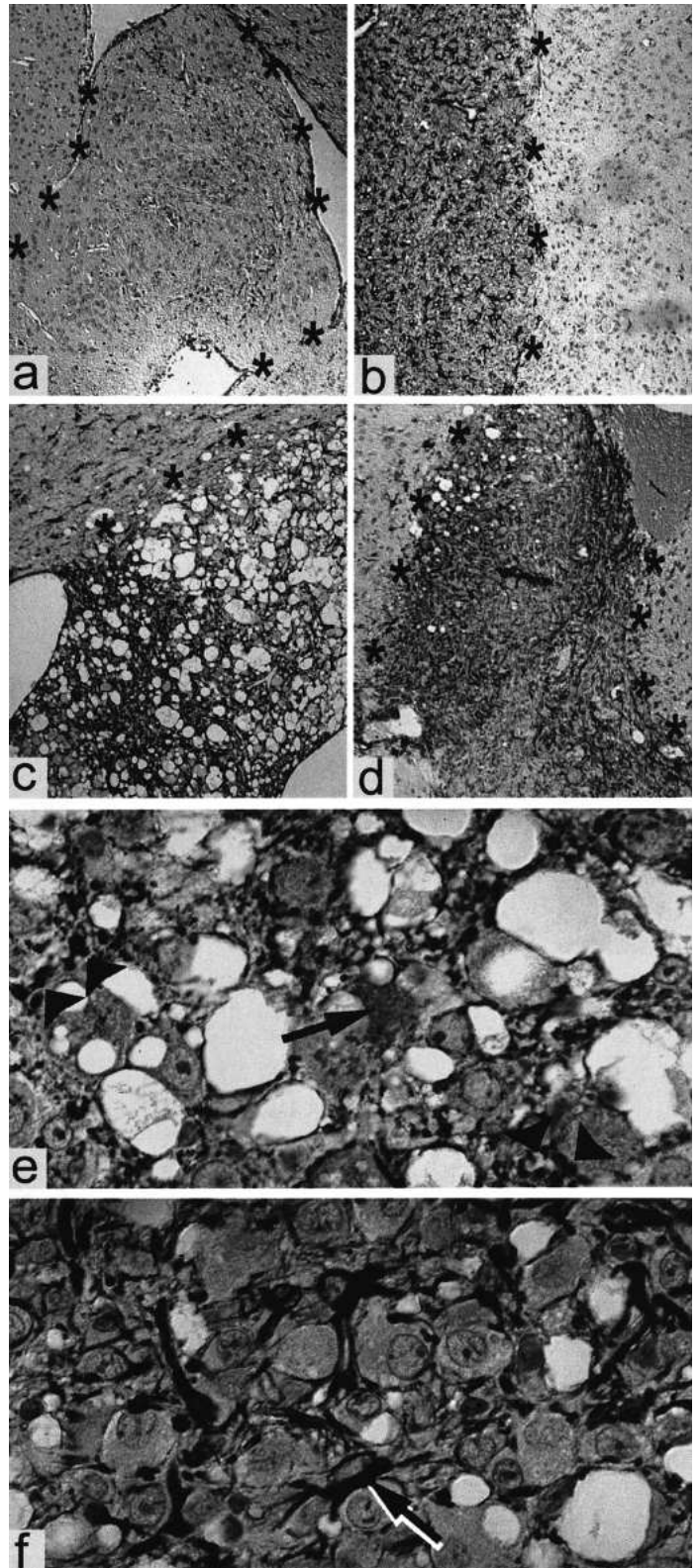


Abbildung 3

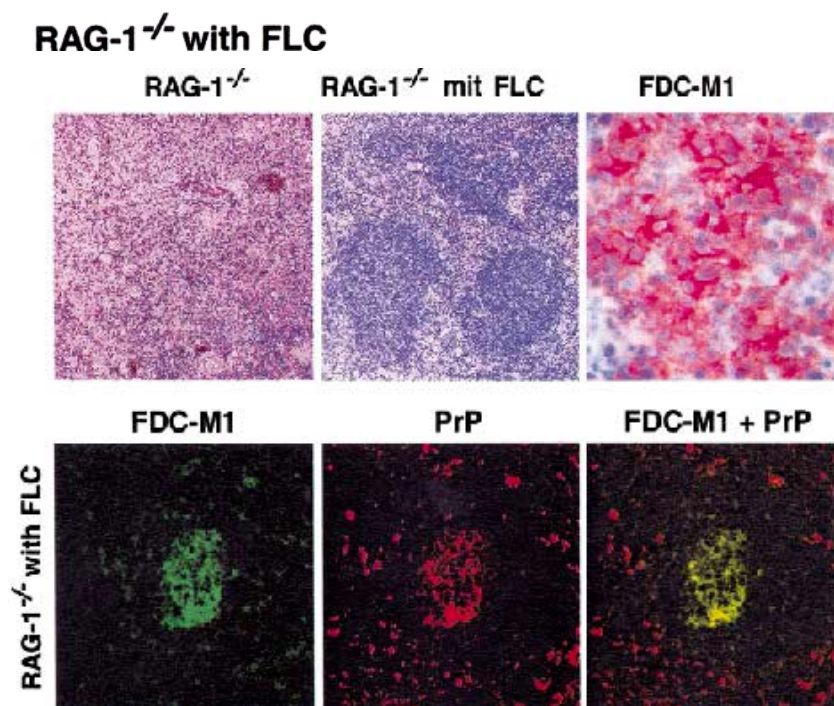
Histologischer Befund der Milz einer RAG-1^{-/-}-Maus, die mit *Pmp*^{0/0}-fetalen Leberzellen rekonstituiert wurde.

Obere Reihe:

- a) HE-gefärbter Paraffinschnitt der Milz einer RAG-1^{-/-}-Maus. Beachte das Fehlen einer regelrechten Architektur ohne Ausbildung von Keimzentren.
 b) Nach Rekonstitution mit fetalen Leberzellen kommt es zu einem weitgehend regelrechten Aufbau von Keimzentren (HE, Paraffinschnitt). Am Gefrierschnitt lässt sich mit dem Marker FDC-M1 ein dichtes Netzwerk an positiv gefärbten follikulär-dendritischen Zellen nachweisen.

Untere Reihe:

Konfokale Doppel-Immunfluoreszenz zur Darstellung der Kolokalisation von follikulär-dendritischen Zellen (FDC-M1, grün) und PrP (Antiserum R340, rot) in der Milz von RAG-1^{-/-}-Mäusen, die mit *Pmp*^{0/0}-fetalen Leberzellen rekonstituiert wurden. In der Überlagerung (rechts) erscheint das PrP-Signal weitgehend mit dem Netzwerk der follikulär-dendritischen Zellen kolokalisiert (gelb).

**Welchen Erkenntnisgewinn bringen unsere Experimente?**

Was bringen uns die Erkenntnisse, die wir aus unseren Arbeiten gewinnen, im Hinblick auf die gegenwärtige Situation der BSE und dem damit zusammenhängenden Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung? Nun, einerseits gibt es mehrere Hinweise, dass nvCJD mehr lymphotrop ist als die sporadische CJD, da zwar nvCJD-, (aber nicht CJD-Prionen in den Tonsillen [22, 32] und im Appendix [33] nachweisbar sind. Deswegen ist das Verständnis der peripheren Pathogenese der Prion-Erkrankungen so wichtig, damit eine Risikoabschätzung der iatrogenen Übertragung menschlicher BSE von präklinisch Erkrankten möglich ist. Es ist beunruhigend, dass praktisch keine Erkenntnisse über die Häufigkeit präklinisch Erkrankter in Grossbritannien vorliegen und damit die tatsächliche Verbreitung völlig ungewiss ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass follikulär-dendritische Zellen höchstwahrscheinlich ein Prion-Reservoir im lymphatischen Gewebe darstellen und dass Milzlymphozyten experimentell inokulierter Mäuse ebenfalls Prioneninfiziert sind. Vor allem letzteres ist besorgniserregend, da Milzlymphozyten wahrscheinlich

in einem ständigen Austausch mit Blutlymphozyten stehen, was relevant wird, wenn subklinisch nvCJD-Infizierte Blut spenden [34]. Immer noch ist nicht geklärt, ob Depletion von Leukozyten in Blutprodukten notwendig und/oder ausreichend ist, um jedes denkbare Risiko auszuschliessen.

Ein weiterer Punkt betrifft die sekundäre Prophylaxe, da durchaus eine beträchtliche Zahl von präklinisch infizierten Personen existieren könnte [35], die infektiöses BSE-Material über die Nahrungskette aufgenommen haben. Es ist daher vordringlich, auch hier Ansätze zu entwickeln, die zumindest helfen, die Ausbreitung des Erregers zu kontrollieren oder zu verhindern, dass es zum Ausbruch einer klinischen manifesten Erkrankung kommt.

Angesichts der oben diskutierten Daten wäre es durchaus denkbar, eine Therapie mit dem Ziel einer Immunmodulation und der Verhinderung einer Neuroinvasion im Sinne einer Sekundärprophylaxe zu etablieren.

Verdankung: Wir danken Marianne König, Mauri Peltola und Beatrice Pfister für die hervorragenden histologischen Arbeiten.

Literatur

- 1 Will R, Cousens S, Farrington C, Smith P, Knight R, Ironside J. Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999;353:9157-8.
- 2 Will R, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921-5.
- 3 Chazot G, Broussole E, Lapras C, Blättler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man [letter]. *Lancet* 1996;347:1181.
- 4 Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE [letter] [see comments]. *Nature* 1997;389:448-50.
- 5 McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 1983;35:57-62.
- 6 Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985;40:735-46.
- 7 Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983;35:349-58.
- 8 Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1996;215:1043-4.
- 9 Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982;216:136-44.
- 10 Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993;73:1055-8.
- 11 Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein [see comments]. *Nature* 1994;370:471-4.
- 12 Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992;356:577-82.
- 13 Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993;73:1339-47.
- 14 Sailer A, Büeler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 1994;77:967-8.
- 15 Büeler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* 1994;1:19-30.
- 16 Fairbairn DW, Carnahan KG, Thwaites RN, Grigsby RV, Holyoak GR, O'Neill KL. Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:341-6.
- 17 Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretschmar HA. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* 1995;5:213-21.
- 18 Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV. Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 1994;68:2383-7.
- 19 Williams AE, van Dam AM, Man AHWK, Berkenbosch F, Eikelenboom P, Fraser H. Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res* 1994;654:200-6.
- 20 Brandner S, Isenmann S, Kühne G, Aguzzi A. Identification of the end stage of scrapie using infected neural grafts. *Brain Pathol* 1998;8:19-27.
- 21 Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996;379:339-43.
- 22 Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997;349:99.
- 23 Blättler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtländer T, Weissmann C, et al. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 1997;389:69-73.
- 24 Beekes M, Baldauf E, Diringer H. Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 1996;77:1925-34.
- 25 Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol* 1983;64:713-6.
- 26 Kimberlin RH, Hall SM, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci* 1983;61:315-25.
- 27 Fraser H, Farquhar CF. Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol* 1987;13:211-23.
- 28 Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Dohura K, Tateishi J. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 1991;65:6292-5.
- 29 Fraser H, Brown KL, Stewart K, McConnell I, McBride P, Williams A. Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow. *J Gen Virol* 1996;77:1935-40.
- 30 Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, et al. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997;390:687-90.
- 31 Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinker-nagel RM, et al. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 1998;4:1429-33.
- 32 Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples [see comments]. *Lancet* 1999;353:183-9.
- 33 Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J. Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease [letter]. *Lancet* 1998;352:703-4.
- 34 Aguzzi A. Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *Lancet* 1997;349:742-3.
- 35 Aguzzi A, Collinge J. Post-exposure prophylaxis after accidental prion inoculation. *Lancet* 1997;350:1519-20.