

Prionen – Proteine auf Abwegen?

Was weiß man über die mutmaßlichen BSE-Erreger?

Martin H. Groschup (Tübingen) und Thomas C. Mettenleiter (Insel Riems)

Im Jahre 1986 wurde der erste Fall der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) bei einem Rind in Großbritannien diagnostiziert. Seitdem entwickelte sich eine BSE-Epidemie unerwarteten Ausmaßes. Es wird geschätzt, dass sich zwischen 1977 und 1995 über 900.000 britische Rinder mit dem BSE-Erreger infiziert haben. Von diesen erkrankten im Vereinigten Königreich bis Ende 1996 ca. 165.000 Tiere an BSE, während die anderen Tiere vor dem Ausbruch der klinischen Erkrankung geschlachtet wurden. Die Verfütterung von infektiösem Tiermehl stellt nach heutigem Kenntnisstand den wichtigsten Übertragungsweg für den Erreger dar. Die Frage, ob der BSE-Erreger vom Scrapie-Erreger der Schafe und Ziegen abstammt oder ob er schon immer beim Rind auftrat, ist bis heute ungeklärt. Hier sollen kurz der aktuelle Wissensstand zur Natur dieser außergewöhnlichen Erreger dargestellt und die hierzu in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV) durchgeführten Forschungsvorhaben vorgestellt werden.

BSE und verwandte Krankheiten

Der „Rinderwahnsinn“ ist die zur Zeit wohl bekannteste aus einer ganzen Gruppe von Krankheiten, die alle ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen. Man spricht von den sogenannten ‘Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien’ (TSEs), was sich mit ‘übertragbaren schwammartigen Gehirnerkrankungen’ übersetzen lässt. TSEs sind bei Mensch und Tier bereits seit Jahrhunderten bekannt. Die Krankheit ‘Scrapie’ wurde im 18. Jahrhundert erstmals bei Schafen und Ziegen beschrieben. Vereinzelte Ausbrüche der übertragbaren Nerz-Enzephalopathie wurden seit 1947 vorwiegend in den Vereinigten Staaten beobachtet. Dagegen kommt die ‘Chronic Wasting Disease’ in den USA und in Kanada erst seit 1967 bei in Gefangenschaft gehaltenen Maultierhirschen und Elchen vor.

Beim Menschen kennt man seit der Jahrhundertwende die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Kuru sowie – seit 1992 – die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI). Inzwischen ist für nahezu alle TSE-Formen die Übertragbarkeit von einem Individuum auf ein anderes belegt.

TSEs bei Mensch und Tier führen erst nach jahrelangen Inkubationszeiten zur Erkrankung. Besonders betroffen sind bestimmte Bereiche der grauen Gehirns substanz, die mikroskopisch schwammartige Veränderungen aufweisen, was auf das Absterben von Nervenzellen zurückzuführen ist. In vielen Fällen finden sich Ablagerungen aus unlöslichen Proteinen (“amyloide Plaques”).

Die Arbeit mit transgenen Tieren, also mit Organismen, die neben ihrer eigenen Erbsubstanz auch kleinere Stücke fremden Erbguts tragen, hat wesentlich dazu beigetragen, die Krankheiten besser zu verstehen und Forschungsarbeiten zu vereinfachen und zu beschleunigen. So wird an der BFAV ein wichtiger Teil der

Untersuchungen zu BSE mit transgenen Mäusen durchgeführt, die einfacher zu halten und schneller zu vermehren sind als etwa Rinder.

Die Natur der Erreger

TSE-Erreger geben den Mikrobiologen nach wie vor Rätsel auf. Dass es sich um wahrhaft 'unkonventionelle' Erreger handelt, zeigt schon ein Blick auf ihre beispiellos hohe Stabilität. Nur konzentrierte Säuren oder Laugen und chlorhaltige Lösungen inaktivieren sie zuverlässig. Dagegen sind herkömmliche formaldehyd- oder alkoholhaltige Desinfektionsmittel völlig wirkungslos. TSE-Erreger widerstehen ultravioletter oder ionisierender Strahlung, die bei Viren durch die Schädigung des Erbguts zu einer völligen Zerstörung ihrer Infektiosität führen.

Aufgrund dieser Eigenschaften vermutete der amerikanische Mikrobiologe Griffith 1967, dass es sich bei diesen Erregern um reine Proteine, also um Eiweiße, handeln könnte. Der Amerikaner Prusiner griff diesen Gedanken Ende der siebziger Jahre auf und formulierte im Jahre 1982 die Grundlagen der Prion-Theorie. Sie geht davon aus, dass ein krankhaft verändertes Eiweiß, das Prion-Protein, den Infektionserreger darstellt, was eine grundlegend neue Klasse von Infektionserregern postuliert (Viren besitzen immerhin neben einer Eiweißhülle auch noch eine darin liegende Erbsubstanz, die Nukleinsäuren DNS oder RNS). Der eindeutige Beweis für diese Theorie steht allerdings noch aus.

Daneben wird weiterhin diskutiert, dass ein Virus für diese Erkrankungen verantwortlich sein könnte, welches das Prion-Protein nur als Rezeptor zum Eindringen in die Zelle benutzt. Anhänger der Virino-Theorie postulieren dagegen, dass eine kleine virale Nukleinsäure nicht von viruseigenen Proteinen, sondern von Prion-Protein umgeben ist. Bisher gelang es aber nicht, eine solche erregerspezifische Nukleinsäure nachzuweisen.

Ein natürlicher Bestandteil des Körpers

Eines der zahlreichen Proteine, die natürlicherweise in den Hirnzellen von Menschen und Wirbeltieren vorkommen, ist das sogenannte Prion-Protein (PrP^{C}). Schon früh wurde gezeigt, dass im Gehirn erkrankter Personen und Tiere eine **veränderte Form dieses Proteins** auftritt, die immer mit dem Vorhandensein des infektiösen Agens korreliert. Diese Form wird als pathologisches Prion-Protein (PrP^{Sc}) bezeichnet.

Die Funktion des Prion-Proteins ist bis heute unklar: Transgene Mäuse, die nicht mehr in der Lage sind, das zelluläre PrP^{C} zu bilden ($\text{PrP}^{0/0}$ -Mäuse), entwickeln sich völlig normal. Möglicherweise spielt PrP^{C} bei der Regulation der inneren Uhr oder bei der Nervenreizleitung in Synapsen eine Rolle.

Das Gen für das Prion-Protein liegt im Erbgut bei Mensch und Tier jeweils nur einmal je Chromosomensatz vor. Das Protein besteht – je nach Spezies – aus 254 bis 273 Aminosäuren. Bei seiner Bildung in der Zelle wird es mit unterschiedlichen Mengen von Zuckerresten verknüpft. Reifes Prion-Protein weist daher drei verschiedene Molekularmassen auf, die sich in biochemisch-immunologischen Nachweisverfahren als charakteristische Banden darstellen lassen.

Das pathologische Prion-Protein

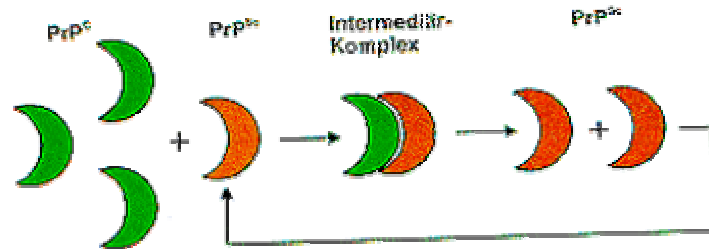


Abb. 3: *Prion-Theorie:*

Umformung des zellulären Prion-Proteins (grün) in seine pathologische Form (rot).

Pathologisches Prion-Protein lagert sich an zelluläres Prion-Protein an und bildet mit ihm einen Intermediär-Komplex, aus dem zwei pathologische Prion-Protein-Moleküle hervorgehen.

Nach der Prion-Theorie stellt die Umwandlung vom natürlichen zellulären Prion-Protein (PrP^{C}) zum pathologischen Prion-Protein (PrP^{Sc}) das Schlüsselereignis für die Vermehrung des infektiösen Agens dar (Abb. 3). Wie diese Umwandlung im Einzelnen im Organismus vonstatten geht, ist bislang noch nicht geklärt.

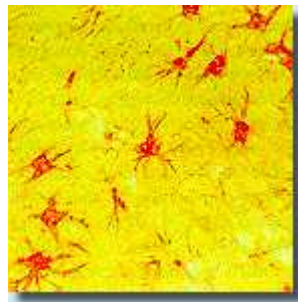


Abb. 4: **Immun-histochemischer Nachweis der Ablagerung von pathologischem Prion-Protein im Gehirn einer an Scrapie erkrankten Maus. Die pathologischen Prion-Proteine wurden markiert und angefärbt: Sie sind in den befallenen Zellen als rote, kleinkörnige Ablagerungen zu erkennen.**

Anders als PrP^{C} liegen PrP^{Sc} als intrazellulär abgelagerte Aggregate (=Anhäufungen) vor (Abb. 4). Die Proteine besitzen eine partielle Resistenz gegenüber dem eiweißabbauenden Enzym Proteinase-K: Nur das erste Drittel der Aminosäurekette wird enzymatisch verdaut. Der Nachweis der Anreicherung des resistenten Reststücks im Gehirn besitzt diagnostische Bedeutung (Abb. 5). Gegen zelluläres wie auch pathologisches Prion-Protein bildet das Immunsystem aufgrund der natürlichen Toleranz gegenüber körpereigenen Bestandteilen keine Antikörper. Deshalb ist derzeit keine Serodiagnostik für diese Erkrankungen möglich.

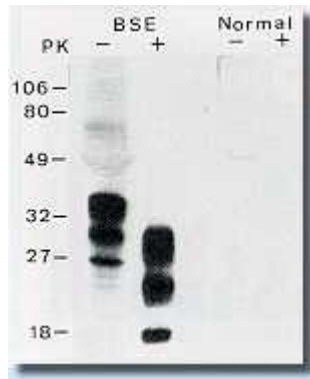


Abb. 5: **Immunoblot-Nachweis des pathologischen Prion-Proteins (PrP^{Sc}) im Gehirn eines an BSE verendeten Rindes. PrP^{Sc} wurde gereinigt, aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die drei charakteristischen Banden sind nur im Gehirnextrakt des BSE-Tieres, nicht aber im Gewebe eines gesunden Rindes nachzuweisen. PrP^{Sc} besitzt darüber hinaus eine partielle Proteinase K- (PK) Resistenz: die Behandlung mit dem Enzym führt nicht zum vollständigen Verdau.**

Die Pathogenese (=Entstehung u. Entwicklung)

Infektionsversuche belegen, dass die Bildung des normalen Prion-Proteins in den Zellen nicht nur eine Voraussetzung für den Ausbruch der Erkrankung darstellt, sondern auch für die Vermehrung der Erreger notwendig ist. Mäuse ohne Prion-Gen erkranken nicht und produzieren auch keine infektiösen Erreger. Wird allerdings das Gen repariert, so bilden diese Tiere wieder Prion-Protein und werden für die Krankheit empfänglich.

Implantationsexperimente mit embryonalem Nervengewebe einer PrP-bildenden Maus in das Gehirn einer $PrP^{0/0}$ -Maus erbrachten einen weiteren Einblick in die Pathogenese dieser Erkrankungsgruppe: Nach einer Infektion der so implantierten Mäuse mit Scrapie-Erregern degenerieren ausschließlich die Zellen im implantierten Gewebe und bilden pathologisches PrP, ohne dass die Mäuse erkranken.

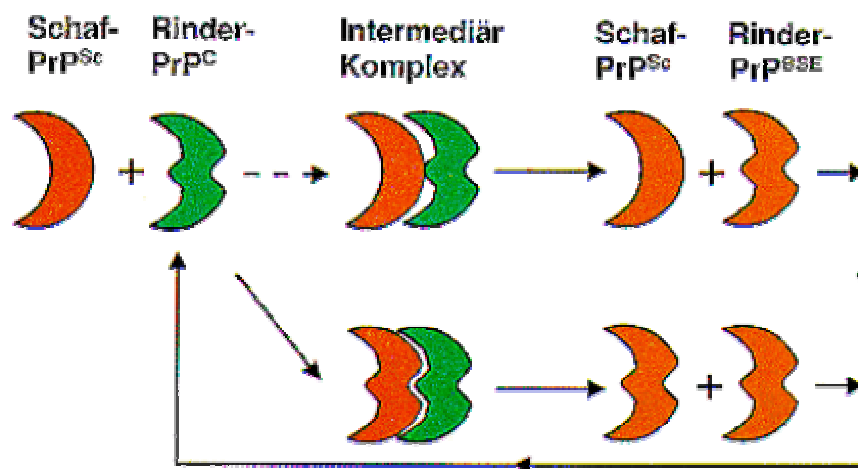
Inzwischen wurden transgene Mäuse hergestellt, bei denen das PrP-Gen gezielt entweder nur in Nervenzellen oder nur in Astrozyten (Stützzellen des Nervengewebes) gebildet wird. Da beide Maustypen an Scrapie erkranken, sind wohl beide Zellarten infizierbar und vermehren den Scrapie-Erreger. Welcher Mechanismus ursächlich für den Untergang der Zellen verantwortlich ist, ist bisher noch unklar. Ein synthetisches 'Mini-Eiweiß' aus 20 Aminosäuren, das einem Teilstück von PrP entspricht, bringt in der Zellkultur neuronale Zellen von normalen Mäusen zum Absterben, nicht aber die Zellen von $PrP^{0/0}$ -Mäusen.

Trotz großer Anstrengungen konnte bisher kein chemischer Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc} gefunden werden. Physikalische Untersuchungen zeigen aber, dass PrP^{Sc} vorwiegend aus β -Faltblatt-Strukturen aufgebaut ist, während PrP^C einen höheren Anteil an α -helikalen Strukturen aufweist. Das heißt, beide Erscheinungsformen des Proteins bestehen aus den gleichen Aminosäuren, haben aber eine andere räumliche Struktur. Dies könnte die unterschiedlichen Eigenschaften von PrP^{Sc} und PrP^C zumindest teilweise erklären.

Die Artbarriere

Die Übertragung von TSEs über verschiedene Tierarten hinweg verläuft im allgemeinen sehr ineffizient. Man spricht hier von einer Artbarriere. So sind Mäuse nur dann mit Hamster-Prionen infizierbar, wenn sie das Hamster-Prion-Protein-Gen tragen. Diese Mäuse bilden dann folgerichtig auch nur pathologisches Hamster-PrP^{Sc} und kein Maus-PrP^{Sc}. Dabei unterscheiden sich die Hamster- und die Maus-Prion-Proteine nur in wenigen Aminosäuren. Generell wird angenommen, dass die Artbarriere umso niedriger ist, je mehr sich die Prion-Proteine der verschiedenen Arten ähneln.

Wie nun in Großbritannien die Krankheit trotz Artbarriere von Scrapie-infizierten Schafen auf Rinder übergesprungen sein könnte, verdeutlicht das Denkmodell in Abb. 6.: Möglicher Übertragungsweg der Scrapie-Erreger vom Schaf auf Rinder



Bei der Erstübertragung von TSE-Erregern in eine neue Spezies (z. B. durch Verfütterung von Tiermehl aus erkrankten Schafen) behindern Tierart-bedingte Unterschiede des pathologischen Prion-Proteins der Ausgangsart (Schafe, rot) gegenüber dem zellulären Prion-Protein der Empfängerart (Rinder, grün) die Bildung eines Intermediär-Komplexes, so dass nur wenig Prion-Protein des Empfängers in pathologisches Prion-Protein umgeformt wird. Die Übertragung des Scrapie-Erregers auf das Rind verläuft deshalb sehr ineffizient (obere Reihe), und die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit ist entsprechend lang. Bei der zweiten Passage der Erreger in der neuen Spezies (Rind) existiert diese Barriere aber nicht mehr. Das heißt: Wird aus Unwissenheit Tiermehl aus infizierten Rindern an andere Rinder verfüttert, so trifft pathologisches Prion-Protein auf zelluläres Prion-Protein desselben Aufbaus, und der Umformungsprozeß verläuft wesentlich effizienter (Kreislauf mit dem durchgezogenen Pfeil - untere Zeile). Deshalb ist bei der zweiten Passage des Erregers im Rind die Inkubationszeit deutlich kürzer als bei der Erstübertragung. Ist die Artbarriere also erst einmal überwunden, so kann sich die Krankheit in der neuen Tierart wesentlich schneller ausbreiten.

Ist nun die Prion-Theorie bewiesen?

Die beschriebenen Ergebnisse belegen eine enge Assoziation zwischen Erkrankung, ursächlichem Infektionserreger und Prion-Protein. Sie beweisen allerdings nicht endgültig, dass der Infektionserreger mit dem pathologischen PrP identisch ist. Veränderungen im PrP-Gen, die in bestimmten Familien gefunden werden, haben ein deutlich höheres Auftreten von TSE zur Folge und transgene Mäuse, die solch ein mutiertes menschliches PrP-Gen tragen, erkranken spontan. Zwar war diese Erkrankung auf andere Mäuse übertragbar, es ließ sich aber in deren Gehirn kein pathologisches PrP nachweisen.

Den wichtigsten Einwand gegen die Prion-Theorie stellt aber die Beobachtung von TSE-Erregerstämmen dar, die sich durch unterschiedliche Inkubationszeiten sowie durch unterschiedliche Zerstörungsmuster im Gehirn auszeichnen. Es ist unklar, wie diese Stammeseigenschaften von einem einzigen Protein mit einer fest definierten Aminosäuresequenz codiert werden sollten. Deshalb kann bis heute nicht ausgeschlossen werden, dass neben PrP auch andere Faktoren ursächlich an der Krankheit beteiligt sind.