

Prionen

Diese anscheinend infektiösen Eiweißstoffe sind ein biologisches Rätsel: Proteinpartikel, die sich in lebenden Zellen vermehren, ohne daß sich bislang irgendeine eigene DNA oder RNA finden ließe. Wie können dann überhaupt neue Prionen entstehen?

Von Stanley B. Prusiner

Der kleinste gemeinsame Nenner allen Lebens schienen bislang die Nucleinsäuren DNA und RNA zu sein. Denn lebende Organismen sind zwar außerordentlich vielfältig, als Arten wie als Individuen, doch haben alle eines gemein: eine aus Nucleinsäuren bestehende Erbsubstanz.

Von Bakterien bis hinauf zum Menschen bestimmt die DNA, die Desoxyribonucleinsäure, die Struktur von Enzymen und anderen Proteinen und damit die Gestalt und Entwicklung eines Lebewesens. Ihre Replikation, also die Herstellung identischer Tochterstränge, ist das für die Vermehrung entscheidende Ereignis. Sogar Viren, die sich bekanntlich nicht selbsttätig vermehren können und deren Status als lebende Organismen deshalb umstritten ist, erhalten ihre Identität von einem Molekül DNA oder RNA (Ribonucleinsäure). Die erst vor gut zehn Jahren erkannten Viroide schließlich, die bestimmte Pflanzenkrankheiten übertragen, bestehen sogar aus nichts anderem als RNA. Der Grundsatz, daß die genetische Information von den Nucleinsäuren auf die Proteine übergeht, also immer in Richtung Proteine fließt, wurde von Francis H. C. Crick einmal das zentrale Dogma der Molekularbiologie genannt.

Mittlerweile jedoch hat sich herausgestellt, daß ein als Prion bezeichnetes infektiöses Teilchen eine bemerkenswerte Ausnahme von der Regel machen könnte, daß jeder Organismus Nucleinsäuren enthält, die seine Identität bestimmen. So weiß man, daß ein Prion die Erzeugung neuer Prione veranlassen kann, zumindest in bestimmten Säugerzellen, und daß zu seinen molekularen Bestandteilen mindestens ein Protein zählt. So sollte man auch eine DNA oder RNA erwarten, welche die Struktur des Proteins vorgibt. Die bislang zusammengetragenen Befunde jedoch weisen darauf hin,

daß das Prion überhaupt keine Nucleinsäure besitzt. Sollte schließlich doch noch etwas DNA oder RNA gefunden werden, so wäre sie wahrscheinlich nicht lang genug, um die Information für die Struktur des Proteins zu enthalten.

Das heißt aber nicht zwangsläufig, daß ein Prion das zentrale Dogma verletzt – die jüngsten Ergebnisse stützen weniger ketzerische Hypothesen. Doch steht kaum in Frage, daß seine Vermehrungsweise höchst ungewöhnlich ist.

Prionen-Infekte

Man kennt heute zwei von Prionen verursachte Krankheiten: die Skrapie, eine Störung des Nervensystems bei Schafen und Ziegen, sowie die Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose, eine seltene, von geistigem Zerfall begleitete Erkrankung des Menschen. In der Öffentlichkeit wurde sie unlängst als Todesursache des Choreographen George Balanchine bekannt.

Diskutiert werden Prionen auch als mutmaßliche Erreger zweier weiterer degenerativer Gehirnleiden des Menschen: so von Kuru, einer nur bei neuguineischen Hochlandstämmen beobachteten Erkrankung, sowie vom Gerstmann-Sträussler-Syndrom (Bild 3). Prionen zählen überdies zu den möglichen Ursachen mehrerer anderer Erkrankungen, doch bleibt es bislang bei bloßen Indizien. Die darunter wohl wichtigste Erkrankung ist der Morbus Alzheimer, die häufigste Form des Altersschwachsinn und die zugleich vierthäufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten.

Skrapie gehört ebenso wie die anderen mit Prionen zusammenhängenden Krankheiten zu der Gruppe der langsamen, schleichenden Infektionen. Sie zeichnen sich durch sehr lange Inkubationszeiten aus, in der Größenordnung

von Monaten, Jahren oder sogar Jahrzehnten. In dieser Zeit zeigt der Patient oder das befallene Tier keinerlei Symptome. Sobald die Krankheit jedoch ausgebrochen ist, schreitet sie unaufhaltsam fort und führt in der Regel zum Tode.

An Skrapie erkrankte Schafe leiden unter starkem Hautjucken. So kratzen und scheuern sie sich häufig (englisch *scrape*) einen Großteil ihrer Wolle ab, was der Krankheit ihren Namen gab. Sie ist seit über 200 Jahren bekannt. Erst um 1935 aber konnten französische Wissenschaftler überzeugend nachweisen, daß Skrapie sich durch Überimpfen von einem Schaf auf andere übertragen läßt. Die Übertragbarkeit bedeutet, daß ein infektiöses Agens vorhanden ist, das sich im Wirtstier vermehren kann.

Bis zum Jahre 1959 blieb Skrapie eine obskure Tierseuche. Damals wies William J. Hadlow vom Rocky-Mountain-Laboratorium des amerikanischen National Institute of Allergy and Infectious Diseases darauf hin, daß Skrapie und Kuru miteinander verwandt sein dürften. Die erste medizinische Beschreibung der Kuru war gerade zwei Jahre zuvor von Vincent Zigas und D. Carleton Gajdusek vom National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke veröffentlicht worden. Sie hatten die Erkrankung bei Eingeborenen Neuguineas beobachtet, die eine bestimmte Form des rituellen Kannibalismus praktizieren sollten, bei der das Gehirn eines verstorbenen Verwandten als Zeichen der Totenverehrung gegessen wurde. Inzwischen ist dieser Brauch erloschen, und mit ihm ging auch die Häufigkeit der Kuru zurück.

Im Jahre 1966 berichteten Gajdusek, Clarence J. Gibbs jr. und Michael P. Alpers, daß es ihnen gelungen war, Kuru auf Menschenaffen zu übertragen. Zwei Jahre später konnten Gajdusek und Gibbs das gleiche auch bei der Jakob-

Creutzfeldt-Pseudosklerose erreichen. Und in jüngerer Zeit gelang es dann Colin L. Masters, zusammen mit Gajdusek und Gibbs, das Gerstmann-Sträussler-Syndrom auf Menschenaffen und andere Affenarten zu übertragen.

Die klinischen und pathologischen Merkmale dieser drei Erkrankungen und der Skrapie lassen auf eine enge Verwandtschaft untereinander schließen. Die ersten Symptome von Skrapie, Kuru und dem Gerstmann-Sträussler-Syndrom sind Schwierigkeiten beim Laufen und Verlust der Bewegungskoordination, was auf eine funktionelle Störung des Kleinhirns deutet. Schwachsinn tritt bei Kuru erst spät im Krankheitsverlauf auf. Die Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose

hingegen beginnt gewöhnlich damit, obwohl einzelne Fälle auch ähnliche Anfangssymptome wie bei Kuru zeigen. Nie sind irgendwelche Anzeichen von Entzündung oder Fieber festzustellen, und die Zahl der Zellen in der Hirn-Rückenmarksfüssigkeit bleibt normal. Dies weist darauf hin, daß das Immunsystem nicht auf den Erreger anspricht.

Die von diesen Krankheiten hervorgerufenen pathologischen Veränderungen beschränken sich auf das Zentralnervensystem. So haben sich regelmäßig die Astrozyten, eine Klasse von Stützzellen im Gehirn, ungewöhnlich stark vermehrt. Die verästelten Fortsätze der Neuronen haben viele ihrer stachelartigen Auswüchse verloren, die bei der

Übertragung der Nervenimpulse eine Rolle spielen. Bei einigen der Krankheiten ist das Gehirngewebe von zahlreichen Vakuolen durchsetzt und sieht wie ein Schwamm aus. Häufig sind Amyloid-Plaques, fleckenförmige Ablagerungen eines faserartig strukturierten Materials, zu erkennen. Doch scheinen sie kein regelmäßiges oder verbindliches Merkmal darzustellen.

Konzentrationsbestimmung – langsamer als Pasteur

In den vergangenen zwanzig Jahren wurde beträchtliche Mühe darauf verwandt, die Ursache der Skrapie zu klä-

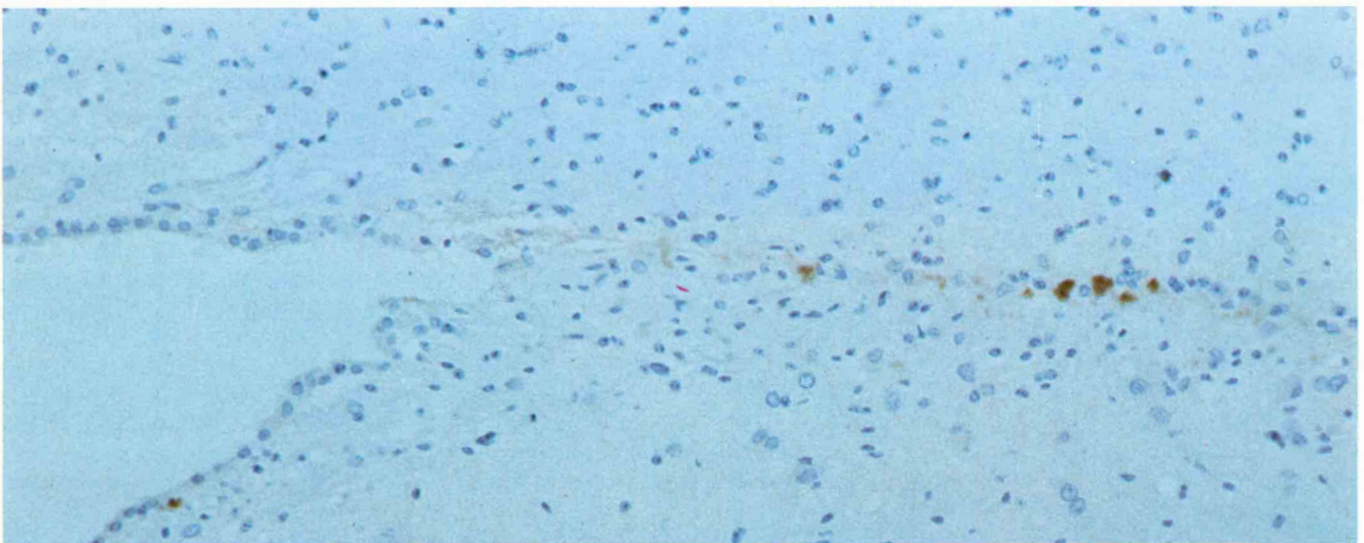


Bild 1: Diese Prionen im Gehirn eines Hamsters wurden mit einer immunologischen Färbetechnik sichtbar gemacht. Das Tier war mit Skrapie infiziert worden, dem Prototyp einer Prionen-bedingten Krankheit. Unter natürlichen Bedingungen befällt sie Schafe und Ziegen. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr zwei Monaten wurden Gehirnschnitte angefertigt und Antikörpern ausgesetzt, die gegen das sogenannte PrP-Protein gerichtet sind. Es ist der Hauptbestandteil des Prions, wenn nicht gar der einzige. An die Antikörper war das Enzym Peroxidase gekoppelt, das die Umwandlung einer später zugefügten Substanz in ei-

nen dunklen Farbstoff katalysiert. Damit ließ sich die Anwesenheit von Prionen im Gewebe mikroskopisch an den dunkel gefärbten Strukturen erkennen. Die lichtmikroskopische Aufnahme oben zeigt mehrere solcher dunklen Körperchen. Darunter sind sie nochmals vergrößert abgebildet. Die flaumig-flockigen Strukturen werden als Zusammenballungen von Prionen-Stäbchen angesehen (Bild 9), von denen jedes wiederum aus vielleicht 1000 PrP-Molekülen besteht. Die Antikörper gegen PrP sind erst in den letzten Monaten gewonnen worden. Die Aufnahmen stammen vom Autor und seinen Mitarbeitern an der Universität von Kalifornien.

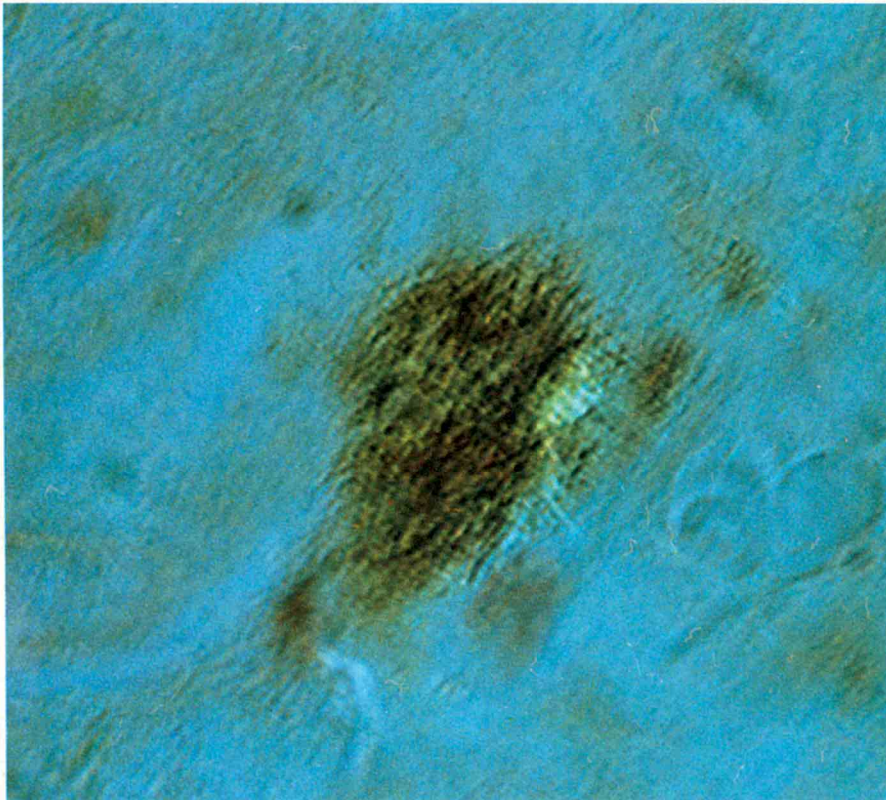


Bild 2: Mit Kongorot angefärbte Ansammlungen von Prionen-Stäbchen ähneln stark den Amyloid-Plaques, die für einige – möglicherweise durch Prionen verursachte – menschliche und tierische Erkrankungen charakteristisch sind. Mit Kongorot gefärbtes Amyloid zeigt die optische Erscheinung der Doppelbrechung: Durch drehbare Polarisationsfilter betrachtet, erscheint es abwechselnd grün und gold. Die mikroskopische Aufnahme hier zeigt einen doppelt gefärbten Gehirnschnitt eines Ham-

sters: Die Ansammlung von Prionen-Stäbchen darin – identifiziert durch Peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen PrP – hat auch Kongorot aufgenommen und zeigt die grün-goldene Doppelbrechung. Das Gewebe auf dieser und den beiden vorhergehenden Aufnahmen stammt aus dem subependymalen Bereich des Gehirns, in der Nähe des Hippocampus. Dort sind Amyloid-Plaques nicht nur bei Skrapie-infizierten Nagetieren, sondern auch bei Patienten mit der Alzheimer-Krankheit zu finden.

ren. Die ungewöhnliche Struktur und die seltsamen Eigenschaften des Erregers sowie der Umstand, daß die biologischen Methoden, die seine Konzentrationsbestimmung erforderte, besonders zeit- und arbeitsaufwendig sind, haben die Forschungen erheblich behindert. Mitte der siebziger Jahre gab es mehr als ein Dutzend Hypothesen über die Natur des Skrapie-Erregers – und damit sogar mehr Hypothesen als Arbeitsgruppen, die sich mit der Krankheit beschäftigten.

Einen Erreger mit strukturell und chemisch unbekannten Eigenschaften zu isolieren verlangt eine empirische Vorgehensweise. Gewöhnlich wird dazu eine Gewebeprobe eines infizierten Tieres homogenisiert und dann in Fraktionen aufgetrennt, die sich in irgendeiner physikalischen oder chemischen Eigenschaft unterscheiden. Anschließend wird die Konzentration des Erregers in jeder Fraktion bestimmt und die reinste davon zur weiteren Bearbeitung ausgesondert. Im Falle der Skrapie gab es nur eine einzige Möglichkeit, die Konzentration des Erregers zu messen: seine Fähigkeit zu bestimmen, die Krankheit in Tieren hervorzuufen.

Viele Jahre lang mußten solche Messungen mittels Endpunkt-Titration (auch Endpunkt-Verdünnung genannt) durchgeführt werden. Dazu wurden Tiere mit zunehmend verdünnten Proben des Materials geimpft. Die Verdünnung, die gerade noch die Krankheit auslösen konnte, war ein Maß für die Konzentration des Erregers im Ausgangsmaterial. Bei den ersten, an Schafen und Ziegen durchgeführten Untersuchungen benötigte man noch eine ganze Herde und einen Zeitraum von mehreren Jahren, um eine einzige Probe zu beurteilen.

Im Jahre 1960 gelang es dann Richard Chandler, Skrapie auf Mäuse zu übertragen. Die Endpunkt-Titration bei Mäusen sah gewöhnlich zehn Verdünnungsschritte vor, wobei jeder die Konzentration auf ein Zehntel des vorhergehenden verringerte (Bild 5 oben). Mit diesen Verdünnungen wurden dann jeweils sechs Mäuse geimpft. Tiere, die hohe Dosen erhalten hatten, erkrankten innerhalb von vier bis fünf Monaten, solche mit der schwächsten, gerade noch krankmachenden Dosis erst nach fast einem Jahr. Folglich mußten 60 Mäuse immerhin ein Jahr lang gehalten werden, bis sich der Endpunkt, die gerade noch wirksame Verdünnung, bestimmen ließ. Wenn auch die Endpunkt-Titration bei Mäusen eine Verbesserung gegenüber der Arbeit mit Schafen und Ziegen bedeutete, so war sie doch immer noch langsamer und beschwerlicher als die Methode, die Louis Pasteur fast ein ganzes Jahrhundert früher für seine Arbeiten über Viren verwandt hatte.

Krankheit	Prionen als Erreger?	natürliche Wirtsarten	experimentelle Wirtsarten	Inkubationszeit
Skrapie	ja	Schafe, Ziegen	Mäuse, Hamster, Affen	2 Monate bis über 2 Jahre
Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose	ja	Mensch	Menschenaffen, Affen, Mäuse, Ziegen, Meerschweinchen	4 Monate bis über 20 Jahre
Kuru	vermutlich	Mensch	Menschenaffen, Affen	18 Monate bis über 20 Jahre
Gerstmann-Sträußler-Syndrom	vermutlich	Mensch	Menschenaffen, Affen	bis über 18 Monate
übertragbare Nerz-Enzephalopathie	vermutlich	Nerz	Affen, Ziegen, Hamster	5 Monate bis über 7 Jahre
chronischer Kräftezerfall	vermutlich	Großbohrhirsch, Wapiti	Frettchen	bis über 18 Monate

Bild 3: Mindestens sechs Krankheiten gehen mit unterschiedlicher Sicherheit auf Prionen zurück. Skrapie ist die „klassische“ Prionen-Infektion, und zahlreichen experimentellen Hinweisen nach wird die Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose (eine seltene von geistigem Zerfall begleitete Erkrankung des Menschen) ebenfalls von solchen Erregern hervorgerufen.

Prionen werden auch als mutmaßliche Ursache von mindestens vier weiteren Krankheiten angesehen, darunter zwei Störungen des menschlichen Zentralnervensystems. Alle vier sind übertragbar, ihre Symptome ähneln denen der Skrapie und der Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose, und alle führen zu ähnlichen pathologischen Veränderungen des Gehirngewebes.

Im Jahre 1978 fand ich mit meinen Mitarbeitern eine Alternative zur Endpunkt-Titration. Drei Jahre zuvor hatten Richard Marsh an der Universität von Wisconsin in Madison und Richard H. Kimberlin eine Form der Skrapie bei Hamstern beschrieben, die rund zweimal so schnell ausbrach wie die Mäuseform. Als wir die Hamster-Erkrankung untersuchten, entdeckten wir eine enge Korrelation zwischen der Konzentration des Skrapie-Erregers und der Inkubationszeit (der Zeit bis zum Ausbruch der Krankheit) beziehungsweise bis zum Tod der Tiere. Statt zu bestimmen, wie stark sich eine Probe verdünnen ließ, ohne ihre Ansteckungsfähigkeit einzubüßen, maßen wir nun, wie schnell eine Probe bekannter Verdünnung die Krankheits-symptome hervorrufen und den Tod herbeiführen konnte.

Dieser auf der Inkubationszeit beruhende Test lieferte, wie sich herausstellte, ein exaktes Maß für die Konzentration in Proben mit einem hohen Erreger-Titer (Bild 5 unten). Der Gewinn an Zeit und Geld war beträchtlich: Unsere Arbeit kam dadurch schätzungsweise hundertmal schneller voran. Statt 60 Tiere ein Jahr lang zu beobachten, können wir jetzt eine Probe mit nur vier Tieren in 60 Tagen testen.

Anreicherungsverfahren

Meine eigenen Forschungen über Skrapie begann ich in Zusammenarbeit mit Hadlow und Carl M. Eklund am Rocky-Mountain-Laboratorium. Für unsere Versuche, den Erreger anzureichern und zu isolieren, benutzten wir anfänglich Material aus der Mäusemilz, das wir durch Zentrifugation und Endpunkt-Titration bei Mäusen aufarbeiteten. Eine Zentrifuge trennt die Bestandteile eines Gemisches nach Größe und Gewicht. Bei der von uns gewählten Methode wurde eine Probe eine festgesetzte Zeit lang mit einer bestimmten Geschwindigkeit zentrifugiert und im Biotest dann bestimmt, wieviel sich von dem Erreger abgesetzt hatte und wieviel im Überstand verblieben war (Bild 4a). Dies alles geschah in einer ganzen Serie von Experimenten mit einer Vielzahl verschiedener Geschwindigkeiten und Zentrifugationszeiten. Als wir nach beinahe zwei Jahren damit fertig waren, wiederholten wir die ganze Prozedur, um sicherzustellen, daß unsere Ergebnisse auch reproduzierbar waren.

Bei diesen ersten Untersuchungen gelang es uns bestenfalls, den Skrapie-Erreger auf das rund Dreißigfache anzureichern. Das lag an mehreren Faktoren, und einer davon war zugleich eine unserer wichtigsten Entdeckungen: Die in-

fektiösen Teilchen waren, was Größe und Dichte anbelangt, äußerst unterschiedlich. Nach der Sedimentationsgeschwindigkeit in der Zentrifuge zu urteilen, mußten einige Partikel die Größe von Bakterien oder von Zellenorganellen wie Mitochondrien haben; andere schienen dagegen noch wesentlich kleiner als die kleinsten Viren zu sein.

Das breite Größenspektrum bedeutete, daß der Skrapie-Erreger in vielen molekularen Formen vorkommen kann. Eine Erklärung war, daß sich hier vielleicht winzige infektiöse Partikel zu viel größeren Aggregaten zusammenlagern.

Um einheitlichere Präparationen zu bekommen, fügten wir dem homogenisierten Gewebe Detergentien bei. Sie sollten zugleich das Abtrennen des Erregers von zellulären Molekülen erleichtern. Zwar wirkten sich die von uns eingesetzten Detergentien nur wenig auf die beobachtete Größenvielfalt aus, doch halfen sie bei der Anreicherung.

Die Bemühungen, den Skrapie-Erreger zu identifizieren, gingen dann in meinem Laboratorium an der Medizinischen Fakultät der Universität von Kalifornien in San Francisco weiter. Die Geschichte ist schnell erzählt. Und doch waren es zehn Jahre knochenharter und manchmal frustrierender Arbeit. Eine große Zahl von Wissenschaftlern hat dazu entscheidendes beigetragen, darunter Richard Baringer, Ronald Barry, Paul Bendheim, David Bolton, Karen Bowman, Patricia Cochran, Steve DeArmond, Darlene Groth, Michael McKinley und Daniel Stites.

Damals wechselten wir gerade von Mäusen auf Hamster über. Die Tiere ermöglichen nicht nur einen schnelleren Biotest, ihr Gehirn hat auch einen hundertmal höheren Titer an Skrapie-Erregern als eine Mäusemilz. Die Reinigungsprozedur begann wieder mit einer Detergens-Extraktion mit anschließender Zentrifugation, doch kamen drei weitere Schritte hinzu: eine Behandlung mit Nucleasen, also Enzymen, die Nucleinsäuren wie RNA und DNA abbauen, sowie eine Behandlung mit Proteasen, also proteinabbauenden Enzymen, und schließlich eine Analyse durch Gel-Elektrophorese (Bild 4b). Wir hatten nämlich festgestellt, daß die Infektionsfähigkeit des Skrapie-Erregers durch das Einwirken einer Nuclease nicht beeinträchtigt wird. Er blieb also intakt, während die zellulären Nucleinsäuren in unserem Ansatz größtenteils „verdaut“ wurden. Die Proteasen dienten entsprechend dazu, nicht zugehörige Proteine zu entfernen. (Der Erreger war, worauf ich später genauer eingehen werde, ungewöhnlich resistent gegen Proteasen.)

Der letzte Schritt unserer überarbeiteten Methode, die Gel-Elektrophorese,

trennt Moleküle nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem Gel auf, dem ein elektrisches Feld anliegt. Die Geschwindigkeit eines Moleküls wird in erster Linie durch seine elektrische Ladung bestimmt, doch spielen auch Form und Größe eine Rolle.

Das Ganze lieferte uns eine hundertfach angereicherte Präparation des Erregers – genug, um einige grundlegende Fakten festzustellen. Unser wichtigstes Ergebnis war aber eine überzeugende Demonstration, daß die biologische Aktivität des Skrapie-Erregers auf einem Protein beruht. Wir schufen dafür den neuen Begriff „Prion“ (nach dem englischen *proteinaceous infectious particle* für infektiöses Eiweißpartikel).

Heute steht die Zentrifugation wieder im Mittelpunkt unserer Probenaufbereitung, wenn sich auch die Technik im Vergleich zu unseren früheren Arbeiten etwas verändert hat (Bild 4c). Die Probe wird dabei auf eine Sucrose-, also Rohrzucker-Lösung geschichtet, die so zusammengesetzt ist, daß sie einen Gradienten mit zunehmender Dichte bildet. Beim Zentrifugieren wandern die Bestandteile der Probe durch den Gradienten, bis sie eine Ebene erreicht haben, in der ihre eigene Dichte mit der der umgebenden Lösung übereinstimmt.

Diese Art der Zentrifugation lieferte in ihrer ersten Version bereits eine tausendfach angereicherte Präparation des Skrapie-Erregers. Uns gelang es damit nachzuweisen, daß die Hauptmasse des Proteins aus einer einzigen Molekülart besteht, die von uns das Kürzel PrP für Prion-Protein erhielt.

Schließlich wurde noch eine auf größere Maßstäbe angelegte Version des Verfahrens entwickelt. Ihr Kernstück ist eine Zentrifuge mit einem Zonen-Rotor, einem großen Behälter, in dem sich beträchtliche Mengen von Material in einem Sucrose-Dichtegradienten auftrennen lassen (Bild 4d). Dieses neue Verfahren bringt außerdem eine 5000fache Anreicherung.

Der Durchbruch

Dank der höheren Reinheit des aufgearbeiteten Materials ließ sich zeigen, daß die infektiöseste Fraktion im wesentlichen nur ein einziges Protein enthält: PrP. Elektrophoretischen Untersuchungen nach lag sein Molekulargewicht zwischen 27 000 und 30 000. Dieser Wert ist, wie wir mittlerweile begründet annehmen dürfen, vermutlich zu hoch. Wir haben nämlich festgestellt, daß PrP ein Glykoprotein ist, also ein Protein, an dessen Aminosäure-Einheiten Zuckermoleküle gebunden sind. Die elektrophoretische Bestimmung des Molekular-

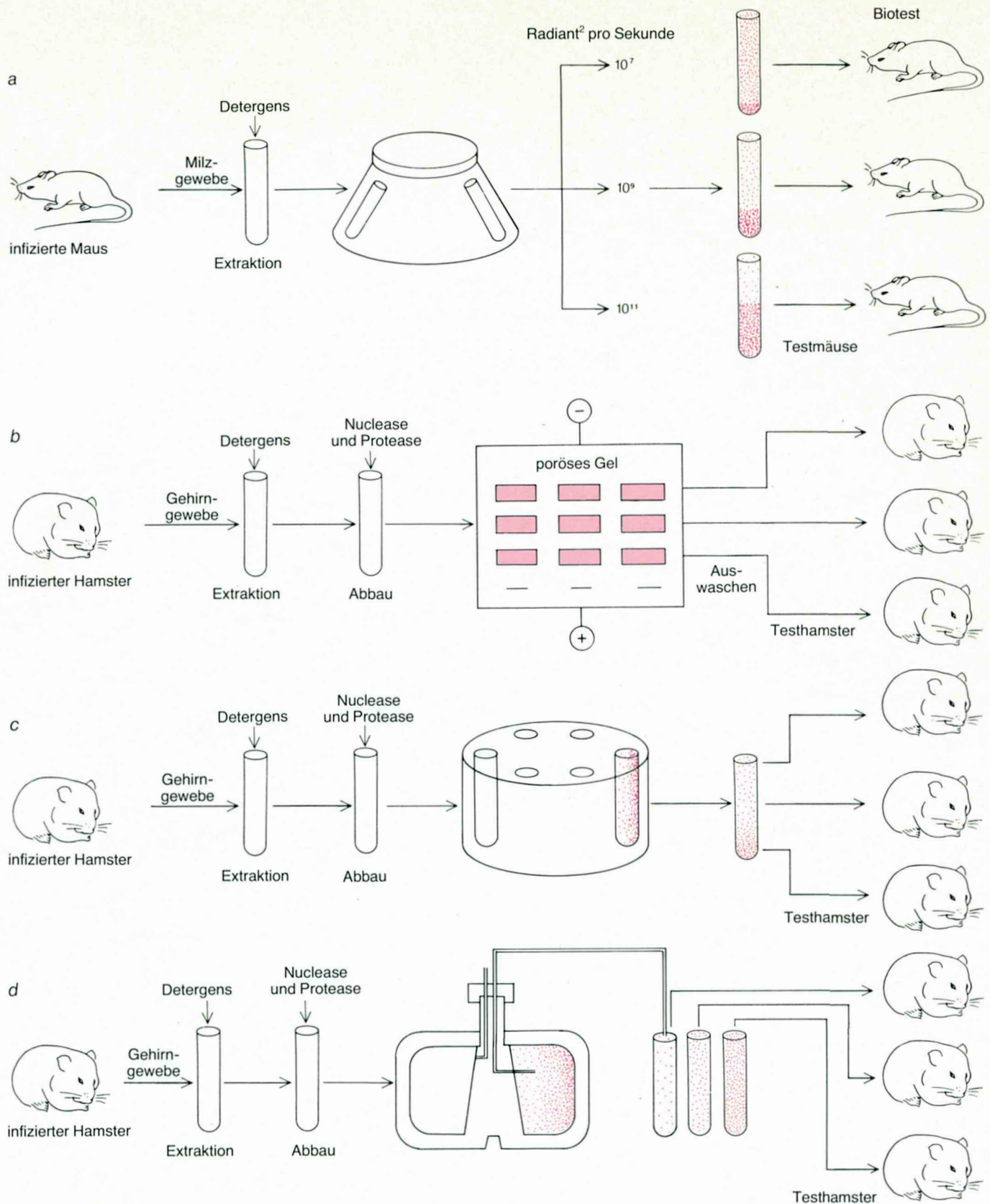


Bild 4: Die vom Autor und seinen Mitarbeitern eingesetzten Anreicherungsverfahren haben im Laufe der letzten zehn Jahre zunehmend bessere Ergebnisse erzielt. Die Detergens-Extraktion und Zentrifugation in einem Festwinkel-Rotor (a) trennte die Partikel einer Probe nach ihrer Größe in Fraktionen auf, was eine 30fache Anreicherung erbrachte. Die Gel-Elektrophorese (b) – sie trennt die Bestandteile einer Probe nach ihrer elektrischen Ladung und ihrer Größe – ergab in Verbindung mit einer Detergens-Extraktion und Enzymbehandlung eine 100fache Anreicherung. Sie ermöglichte es nachzuweisen, daß ein Protein für die Ansteckungsfähigkeit des Prions unbedingt notwendig ist. Beim nächsten

Verfahren, der Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten, wandern die Moleküle soweit durch die Schichten einer Rohrzuckerlösung, bis ihre eigene Dichte mit der der Lösung übereinstimmt. Zunächst wurde ein Vertikal-Rotor eingesetzt (c). Die damit erreichte 1000fache Anreicherung ermöglichte es, PrP zu identifizieren. Heute wird ein Zonen-Rotor verwendet (d), mit dem sich sehr viel größere Materialmengen aufarbeiten und sogar 5000fach anreichern lassen. Dank dem reineren und reichlichen Material konnte die Zusammensetzung und Struktur von PrP untersucht und spezifische Antikörper gewonnen werden. Inzwischen sind auch die ersten 15 Aminosäuren des Proteins identifiziert worden.

gewichts solcher Proteine ergibt oft fälschlich zu hohe Werte. Auf alle Fälle ist PrP ein verhältnismäßig kleines Protein, nicht einmal halb so groß wie der rote Blutfarbstoff Hämoglobin.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des gereinigten Materials ließen zahlreiche große stäbchenförmige Partikel erkennen, viel zu groß allerdings, als daß es sich um individuelle Prione handeln könnte. Die Stäbchen hatten wir bereits bei früheren Experimenten beobachtet, doch gelang es uns damals nicht, die auf der Hand liegende Hypothese zu bestätigen, die Stäbchen seien Aggregate von Prionen. Denn es war nicht auszuschließen, daß wir gar nicht den Krankheitserreger selbst, sondern nur das Produkt irgendeiner von der Krankheit hervorgerufenen Veränderung vor uns hatten. Mit unseren hochgereinigten Fraktionen konnten wir nun nachweisen, daß sich die Stäbchen tatsächlich aus PrP zusammensetzen und folglich als Prionen-Aggregate ansehen lassen.

Daß nun größere Mengen von annehmbar reinem Untersuchungsmaterial gewonnen werden konnten, erwies sich als Durchbruch, der uns viele verwirrende Fragen über das Prion beantworten half. Erst kürzlich gelang es uns damit, in Tieren gegen Prionen gerichtete Antikörper zu erzeugen – jahrelang hatten wir dies ohne den geringsten Erfolg versucht. Nun wissen wir, daß der kritische Faktor die dem Tier injizierte Menge ist, die wir – dank dem neuen Verfahren – auf das Zehnfache (auf ungefähr 100 Mikrogramm) steigern konnten.

Diese Antikörper dürften die Erforschung der Prionen gewaltig beschleunigen und ihr Instrumentarium gründlich verändern. So werden möglicherweise weit weniger Biotests als bislang gebraucht. Die Konzentration an Prionen in einer Probe ließe sich mit dem Antikörper statt in Monaten in Stunden bestimmen, indem man einfach seine Bindungsfähigkeit, seine Affinität zu Bestandteilen des Untersuchungsmaterials mißt. Auf dieser gezielten Bindungsfähigkeit könnte auch ein neues Reinigungsverfahren aufgebaut werden.

Die Untersuchungen unserer reineren Proben haben allerdings auch neue Fragen aufgeworfen, auf die ich später noch eingehen werde.

Ein Protein als Krankheitserreger

Der Schluß, daß ein Protein Bestandteil des Prions ist und dessen Ansteckungsfähigkeit bedingt, ergab sich direkt, als wir noch an geeigneten Anreicherungsverfahren arbeiteten. Im Laufe dieser Arbeit prüften wir zahlrei-

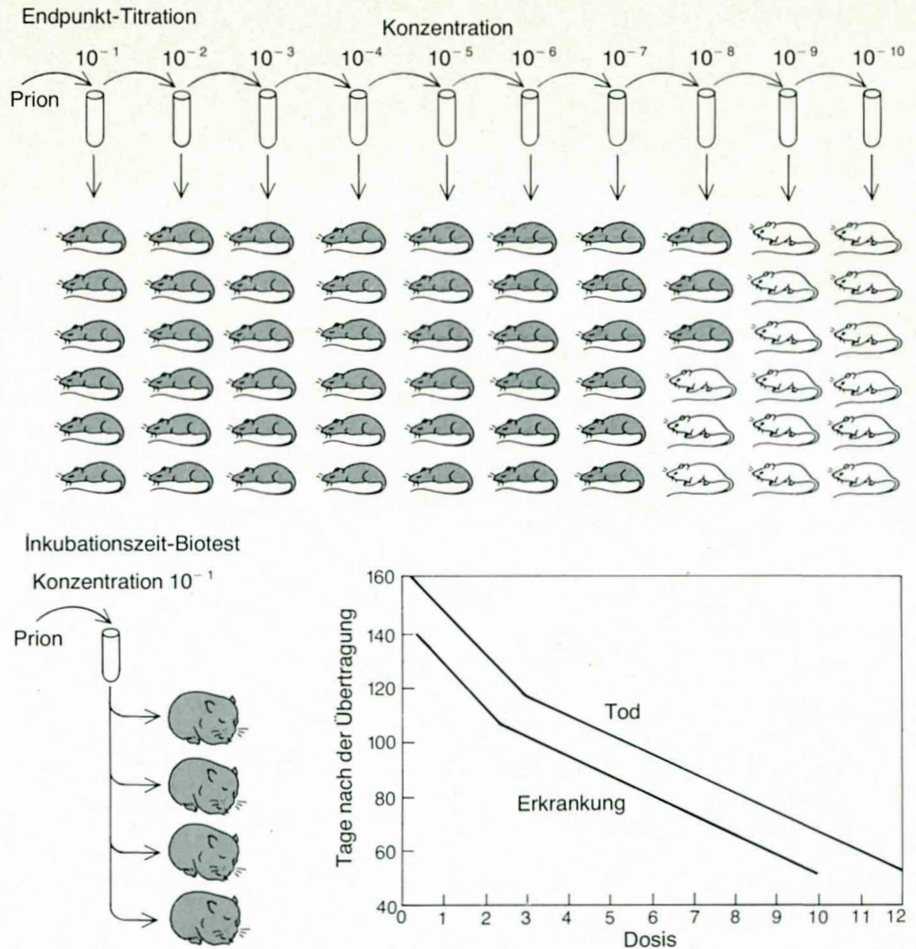


Bild 5: Auf der Ansteckungsfähigkeit aufbauende Biotests waren lange die einzige Möglichkeit, die Konzentration der Skrapie-Prionen in einer Probe zu bestimmen. Bei der sogenannten Endpunkt-Titration (oben) wurde die Ausgangslösung in zehn Schritten jeweils zehnfach verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde eine Probe sechs Mäusen injiziert, die bis zu einem Jahr beobachtet werden mußten, bis die neurologischen Symptome der Skrapie zu erkennen waren. Die gerade noch krankheitsauslösende Verdünnungsstufe lieferte dann ein Maß für die Konzentration des Erregers in der

unverdünnten Ausgangsprobe. Dank einer neueren Methode hat sich die Dauer solcher Tests und die Anzahl erforderlicher Tiere verringert. Ihr liegt die Beobachtung zugrunde, daß die Inkubationszeit, die Zeitspanne zwischen Infektion und Auftreten der ersten neurologischen Symptome, von der Dosis injizierter Erreger abhängt. Gleiches gilt auch für die Zeitspanne zwischen Infektion und Eintritt des Todes. Anhand der Inkubationszeit läßt sich mit hochreinen Präparaten bekannter Verdünnung die Konzentration des Skrapie-Erregers an vier Hamstern in nur 60 Tagen bestimmen.

che Chemikalien darauf, ob sie die Ansteckungsfähigkeit des Prions verändern oder nicht (Bild 6). Alles in allem haben dabei Substanzen, die bekanntermaßen Proteine zerstören, auch die Ansteckungsfähigkeit herabgesetzt, während Substanzen, die keine Proteine angreifen, sie nicht beeinträchtigten.

Den deutlichsten Hinweis lieferten die Versuche mit den Proteasen. Ein solches Enzym ist hochspezifisch: Andere Moleküle als Proteine greift es so gut wie gar nicht an. Anfangs, bei den Arbeiten mit unreinem Material, lieferte die Behandlung mit Proteasen widersprüchliche Ergebnisse. Später aber, mit den angereicherten Fraktionen, konnten wir überzeugend zeigen, daß Proteasen die Ansteckungsfähigkeit der Prionen herabsetzen.

Dabei klärte sich auch der Widerspruch früherer Befunde auf: Im Vergleich zu den meisten zellulären Proteinen ist PrP gegenüber Proteasen relativ widerstandsfähig. Solange es im Gemisch mit vielen anderen Proteinen vorliegt, werden bevorzugt solche abgebaut, die am leichtesten mit dem Enzym reagieren, und deshalb bleibt PrP praktisch ungeschoren. Diesen Umstand haben wir bei der Reinigung der Prionen ausgenutzt. Unerwünschtes Protein läßt sich auf diese Weise in den ersten Schritten enzymatisch verdauen, ohne daß das Prion-Protein dabei wesentlich angegriffen wird.

Einige andere Stoffe schädigen ebenfalls Proteine, doch spalten sie nicht deren verschlungene Aminosäure-Kette, sondern entfalten sie. Man sagt: Sie de-

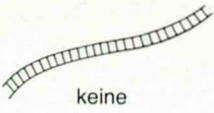
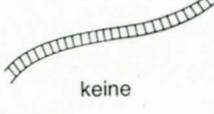
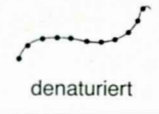
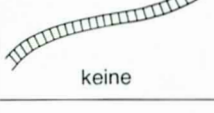
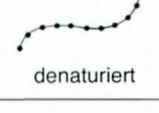
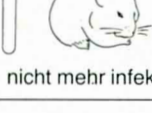
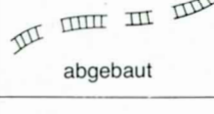
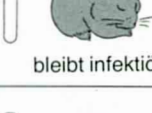
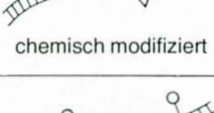
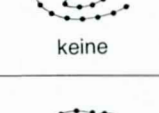
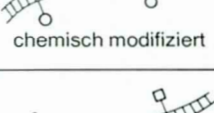
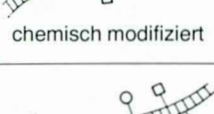
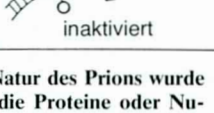
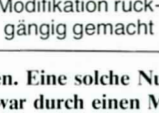
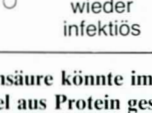
Behandlung	Auswirkung auf Nucleinsäuren	Auswirkung auf Proteine	Auswirkung auf Prionen
Protease	 keine	 abgebaut	 nicht mehr infektiös
Natrium-dodecylsulfat (SDS)	 keine	 denaturiert	 nicht mehr infektiös
Phenol	 keine	 denaturiert	 nicht mehr infektiös
Nuclease	 abgebaut	 keine	 bleibt infektiös
Ultraviolett-Bestrahlung	 geschädigt	 keine	 bleibt infektiös
Zink-Ionen	 abgebaut	 keine	 bleibt infektiös
Psoralen-Photoaddukte	 chemisch modifiziert	 keine	 bleibt infektiös
Hydroxylamin	 chemisch modifiziert	 keine	 bleibt infektiös
Diethylpyrocarbonat (DEP)	 chemisch modifiziert	 chemisch modifiziert	 nicht mehr infektiös
Hydroxylamin nach DEP	 inaktiviert	 Modifikation rückgängig gemacht	 wieder infektiös

Bild 6: Die chemische Natur des Prions wurde mit Stoffen untersucht, die Proteine oder Nucleinsäuren inaktivieren. Proteasen, also Enzyme, welche die Aminosäure-Kette eines Proteins spalten, können die Ansteckungsfähigkeit einer gereinigten Lösung von Prionen erheblich herabsetzen. Dasselbe gilt für gewisse Detergentien und andere Substanzen, die Proteine durch Entfalten der Aminosäure-Kette denaturieren. Im Gegensatz dazu beeinträchtigen Nucleasen, also Enzyme, welche die Nucleinsäuren DNA und RNA abbauen, die Ansteckungsfähigkeit nicht. Prionen sind auch gegen Ultraviolettstrahlen und Zink-Ionen sehr resistent, die hauptsächlich Nucleinsäuren angrei-

fen. Eine solche Nucleinsäure könnte im Prion zwar durch einen Mantel aus Protein geschützt sein, doch sind Stoffe wie Psoralene und Hydroxylamin, die den Proteinmantel der meisten Viren zu durchdringen vermögen, ebenfalls wirkungslos. Diethylpyrocarbonat (DEP) kann Proteine wie Nucleinsäuren modifizieren. Die Reaktion ist durch Hydroxylamin umkehrbar, allerdings nur bei den Proteinen. Prionen werden durch DEP inaktiviert und durch Hydroxylamin wieder reaktiviert. Diese chemischen und physikalischen Indizien weisen darauf hin, daß das Prion aus Protein ohne eine dafür codierende Nucleinsäure besteht, wenn auch eine kleine DNA oder RNA nicht auszuschließen ist.

natürlichen das Protein. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, nach dem englischen *sodium dodecyl sulfate*) ist eine solche Substanz. Eine mit SDS gekochte Prionenlösung verliert ihre Ansteckungsfähigkeit. Phenol, Harnstoff und einige Salze wirken ebenfalls denaturierend; auch sie setzen die biologische Aktivität der Prionen herab.

Alle diese Reaktionen sind irreversibel. Eine andere Substanz hingegen, Diethylpyrocarbonat (DEP), verändert Proteine in einer Weise, die sich durch Zusatz von Hydroxylamin rückgängig machen läßt. Wie die Proteasen lieferte uns auch DEP anfangs nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse. Mit den reineren Fraktionen jedoch konnten wir zeigen, daß DEP die Aktivität der infektiösen Partikel herabsetzt. Hydroxylamin stellt dann die ursprüngliche Aktivität wieder her.

Das mutmaßliche Angriffsziel all dieser Reaktionen ist zwar PrP. Doch blieb zunächst die Möglichkeit offen, daß PrP nicht ein struktureller Bestandteil des Prions, sondern ein pathologisches Produkt der Skrapie-Infektion war. Wir führten deshalb eine lange Reihe von Experimenten durch, deren Ergebnis – wie wir glauben – bestätigt, daß sich das Prion, zumindest teilweise, aus PrP-Molekülen zusammensetzt.

Das erste Indiz ist einfach, daß PrP in jeder Probe mit einem hohen Prionen-Titer vorkommt, gleich, ob sie durch Zentrifugation oder Elektrophorese aufgearbeitet wurde, ja sogar auch dann, wenn sie bereits vor dem Auftreten pathologischer Veränderungen aus Skrapie-infizierten Geweben gewonnen wurde. Außerdem verhält sich die Konzentration an PrP direkt proportional zum Titer der Prionen. Proteasen verdauen PrP und Prionen gleich schnell. Ebenso verändern andere Versuchsbedingungen, die den Prionen-Titer beeinflussen, auch gleichzeitig die Konzentration von PrP. Zudem bindet sich DEP, das Prionen inaktivieren kann, direkt an PrP. Und schließlich ist in gereinigtem, mit Proteasen behandeltem Material als einziges Protein PrP nachzuweisen, was darauf schließen läßt, daß Prionen nur ein einziges größeres Protein haben.

Vergebliche Suche nach Nucleinsäuren

Nachdem die Beteiligung eines Proteins bei der Infektion feststand, begannen wir, nach Nucleinsäure zu suchen. Es war ein von ständigen Enttäuschungen begleitetes Unterfangen.

Vor knapp 20 Jahren bestrahlten die Engländer Tikvah Alper, David Haig und Michael Clarke homogenisiertes

Skrapie-infiziertes Gewebe mit ultraviolettem Licht sowie mit kurzwelliger ionisierender Strahlung. Normalerweise zerstört diese Strahlung Zellen und Viren, weil sie die Nucleinsäuren darin schädigt. Die Treffer-Wahrscheinlichkeit ist dabei ungefähr proportional zur Größe des betroffenen Moleküls. Alper und ihre Mitarbeiter benötigten extrem hohe Strahlungsdosen, um den Skrapie-Erreger überhaupt zu inaktivieren. Daraus folgerten sie, daß der Skrapie-Erreger keine Nucleinsäuren besitzt und beträchtlich kleiner als ein Virus ist.

Dies wurde heftig angezweifelt. Doch haben wir mittlerweile in Zusammenarbeit mit James Cleaver von der Medizinischen Fakultät der Universität von Kalifornien in San Francisco die Versuche mit Ultraviolettstrahlung wiederholt und bei unseren gereinigten Präparationen ähnliche Ergebnisse erhalten (Bild 6 Mitte).

In vielen Experimenten haben wir versucht, Prionen mit einer Behandlung zu inaktivieren, die Nucleinsäuren chemisch angreift. So wurden entsprechend den Proteasen Nucleasen verwendet. Wir haben die Prionen-Lösungen dabei verschiedenen Nucleasen ausgesetzt, einschließlich solcher Enzyme, die sowohl DNA als auch RNA zerstören – ohne daß die Ansteckungsfähigkeit signifikant abnahm.

Möglicherweise konnten aber die Enzyme gar nicht an die Nucleinsäuren herankommen. So sind viele Viren gegen Nucleasen resistent, weil ihr Proteinmantel die DNA oder RNA schützt. Daher versuchten wir in Zusammenarbeit mit John E. Hearst von der Universität von Kalifornien in Berkeley, Prionen mit Psoralenen zu behandeln. Dies sind Moleküle, die durch den Proteinmantel der meisten Viren dringen, sich dann bei Ultraviolett-Bestrahlung an die Nucleinsäure binden und sie inaktivieren. Doch wieder blieb die Infektionsfähigkeit der Prionen erhalten. Zink-Ionen, die den Abbau von RNA katalysieren, erwiesen sich ebenfalls als unwirksam.

Unsere Arbeit mit DEP erbrachte weitere Befunde. DEP kann Proteine und ebenso Nucleinsäuren inaktivieren, aber nur die Funktionsfähigkeit der Proteine läßt sich mit Hydroxylamin wiederherstellen. Daß eine Behandlung mit Hydroxylamin die Ansteckungsfähigkeit dann wiederherstellte, zeigt an, daß DEP nicht mit einer Nucleinsäure reagiert hatte.

In Zusammenarbeit mit Theodor O. Diener vom Landwirtschaftsministerium der USA haben wir verglichen, wie sich verschiedene Stoffe auf Prionen und Viroide auswirken. Da beide Partikel viel kleiner als Viren zu sein scheinen, glaubte man ursprünglich, Prionen könnten

Sequenzierungsschritt:	am Aminoende gefundene Aminosäuren														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hauptsignal	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys
Nebensignal				Thr	His	Asn		Trp		Lys	Pro				
			Pro	Trp		Gln				Thr	His		Gln	Trp	

durch Verschieben erreichte Übereinstimmung														
Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys
		*	*	*	Thr	His	Asn	*	Trp	*	Lys	Pro		
*	*	Pro	Trp	*	Gln	*	*	*	Thr	His	*	Gln	Trp	

Bild 7: Dank ausreichender Mengen an hochreinem Material konnte begonnen werden, die Aminosäure-Sequenz von PrP zu bestimmen. Die ersten 15 Aminosäuren am Amino-Ende sind bereits identifiziert. Davon abweichende

Sequenzen lassen sich mit der Hauptsequenz (sie liefert das stärkste Signal) durch einfaches Vor- oder Zurückschieben in Deckung bringen. Ihre „ausgefranst“ Enden rühren vermutlich von der Proteasen-Behandlung her.

strukturell den Viroiden gleichen, das heißt, aus „nackter“ RNA bestehen. Tatsächlich verhielten sich beide genau gegensätzlich: Bedingungen, die Proteine verändern, inaktivieren Prionen, nicht aber Viroide; umgekehrt zerstört eine Nucleinsäuren angreifende Behandlung nur Viroide, nicht aber Prionen.

Kein Platz für DNA?

Die Frage nach der Größe der Prionen hängt ebenfalls mit dem Nucleinsäure-Problem zusammen. Einzelne Prionen scheinen sehr klein zu sein. Deshalb könnte jedes vermutlich auch nur eine recht begrenzte Menge an Nucleinsäure umschließen.

Den Bestrahlungsversuchen von Tikvah Alper und ihren Mitarbeitern nach dürfte der Skrapie-Erreger ein Molekulargewicht zwischen 60 000 und 150 000 haben. Die bemerkenswerte Verschiedenheit der Prionen erschwert es, die Größe des kleinsten infektiösen Partikels auf direktere Weise zu bestimmen. So haben wir die Prionen-Aggregate mit Detergentien und anderen Chemikalien aufgebrochen und dann die Größe der Partikel auf dreierlei Weise bestimmt: durch Zentrifugation in einem Sucrose-Dichtegradienten, nach ihrer Durchlaufzeit in einer chromatographischen Säule und mittels Filtration durch Membranen mit Poren bekannter Größe. Sämtliche Ergebnisse sprechen für ein Molekulargewicht zwischen 50 000 und 100 000, doch hat jede dieser Methoden ihre Tücken. Wegen der vielen Unsicherheitsfaktoren läßt sich bislang nur soviel sagen, daß die kleinste infektiöse Form des Prions möglicherweise hundertmal kleiner ist als das kleinste Virus.

Nimmt man für das Prion ein Molekulargewicht von 50 000 an, so müßte es

einen Durchmesser von ungefähr 5 Nanometern haben; das sind fünf Millionstel Millimeter. Sollte es wie ein konventionelles Virus aufgebaut sein, dann könnte es einen ungefähr kugelförmigen Proteinmantel um ein Zentrum aus Nucleinsäure haben. Dünner als ein Nanometer dürfte diese Hülle nicht sein, was im Inneren gerade Raum für ungefähr zwölf Nucleotide ließe.

Die maximale Größe irgendeiner im Prion vorhandenen Nucleinsäure läßt sich auch aus anderen Messungen ableiten. So ist die Widerstandsfähigkeit des Prions gegenüber einer Inaktivierung durch Ultraviolettstrahlung durchaus mit einer Nucleinsäure aus zwölf bis fünfzig Nucleotiden vereinbar; und bei weniger als vierzig Nucleotiden würden auch die von uns eingesetzten Psoralene eine Nucleinsäure „übersehen“.

Daß sich in den Prionen keine Nucleinsäure aufspüren ließ, darf aber nicht als Beweis dafür gelten, daß es tatsächlich keine gibt. Sie könnte auf irgendeine Weise in der sie umgebenden Struktur verborgen sein oder nur in Mengen vorkommen, die nicht mehr nachweisbar sind. Doch scheint die Annahme gerechtfertigt, daß die Nucleinsäure des Prions – sofern es eine besitzt – wahrscheinlich aus weniger als 50 Nucleotiden besteht. Der unter anderen Organismen übliche genetische Code benötigt drei Nucleotide als Codewort für eine Aminosäure. Demnach könnte das hypothetische Prionen-„Genom“ nur für ein Protein mit einem gutem Dutzend Aminosäuren codieren. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß PrP – seinem Molekulargewicht nach – aus ungefähr 250 Aminosäuren bestehen müßte.

Es gibt nur einen Weg, mit Sicherheit nachzuweisen, daß das Prion aus nichts anderem als aus Protein besteht: Man muß die vollständige Aminosäure-Se-

quenz des PrP aufklären, ein künstliches Protein mit der gleichen Sequenz synthetisieren und dann nachweisen, daß es die gleiche biologische Aktivität besitzt wie das natürliche Protein.

Die Aussicht auf Erfolg scheint seit den letzten Monaten überraschenderweise etwas nähergerückt, wiederum weil relativ reine Präparationen in genügenden Mengen zur Verfügung stehen: Wir haben in Zusammenarbeit mit Leroy E. Hood vom California Institute of Technology und Stephen B. H. Kent von der Firma Molecular Genetics die ersten 15 Aminosäuren von PrP identifiziert.

Bestimmt wurde diese Teilsequenz mittels einer Reihe von Reagentien, welche jeweils die letzte Aminosäure eines Proteins abtrennen. Die Prozedur wurde für jede „neue“ endständige Aminosäure wiederholt. Bei ungefähr der Hälfte aller Zyklen entdeckten wir – statt einer – gleich mehrere Aminosäuren, wobei ein starkes Signal von schwächeren begleitet war. Anfangs deuteten wir die Nebensignale als Anzeichen dafür, daß ein ganzes Spektrum von PrP-Molekülen mit geringfügig unterschiedlicher Aminosäure-Sequenz existierte. In der Folge fanden wir jedoch heraus, daß sich die Nebensequenzen nur in ihrem Anfangspunkt von der Hauptsequenz unterscheiden. Eine der Nebensequenzen läßt sich durch einfaches Vorrücken um vier Aminosäure-Positionen mit der Hauptsequenz in Übereinstimmung bringen (Bild 7). Eine andere Nebensequenz mußte dagegen um zwei Positionen zurückgenommen werden. Die Abweichungen treten auf, weil die PrP-Moleküle „abgerissene“ Enden haben – vermutlich infolge der Behandlung mit Proteasen während der Aufarbeitung.

Die Kenntnis dieser nur kurzen Aminosäure-Sequenz hat der weiteren Erforschung zwei entscheidende Wege eröffnet. Erstens sind – entsprechend der bekannten PrP-Sequenz – jetzt Aminosäure-Ketten synthetisiert worden, die als Antigene dienen sollen. Die gegen sie gebildeten Antikörper können zur Reinigung der Prionen wie zur Bestimmung ihrer Konzentration und zum Identifizieren ihrer Struktur eingesetzt werden. Zweitens sind Nucleinsäure-Abschnitte hergestellt worden, die für den bekannten Teil der Aminosäure-Sequenz von PrP codieren. Sie werden derzeit als Sonde eingesetzt, die selbsttätig irgendeine natürliche, für PrP codierende Nucleinsäure aufspüren soll. (Die Sonde bindet sich – wie der Antikörper an sein Antigen – an den dazu komplementären Abschnitt der Nucleinsäure.)

Die alles beherrschende Frage ist sicherlich, wie sich das Prion vermehrt. Dazu gibt es im wesentlichen drei Gruppen von Hypothesen.

Zur ersten zählt die Hypothese, daß das Prion, trotz aller gegenteiliger Hinweise, ein herkömmliches (konventionelles) Virus ist – mit einem Genom aus DNA oder RNA, das für das gesamte Prion-Protein codiert. Nach dem Eintritt in eine Zelle würde die Nucleinsäure in eine Boten-RNA abgeschrieben, die dann als Matrize für die Synthese des Prion-Proteins dient (Bild 8a).

Vermehrung der Prionen

Die Tatsache, daß ein Prion-Protein für die Skrapie-Infektion unbedingt notwendig ist, ließe sich mit der Annahme erklären, daß das Prion ein „Minus-Strang-Virus“ ist, also ein Virus, dessen Nucleinsäure allein nicht ausreicht, die Krankheit zu verursachen; ein als Enzym wirkendes virales Protein ist nötig, um die virale Nucleinsäure in Boten-RNA abzuschreiben, zu transkribieren. Angesichts der Fülle von Informationen, die wir heute über die chemische und physikalische Beschaffenheit des Prions haben, ist die Virus-Hypothese allerdings wenig wahrscheinlich.

In gewissem Sinne ist sie die konservativste Hypothese; die radikalste ist, daß die Aminosäuren von PrP irgendwie selbst ihre Sequenz bestimmen, wenn sich die Prion-Partikel vermehren. Dies könnte indirekt durch eine „reverse Translation“, eine Rückübersetzung des Proteins in RNA oder DNA geschehen (Bild 8f). Der zelluläre Synthese-Apparat würde dann diese Nucleinsäuren in der üblichen Weise zur Herstellung von neuem Protein verwenden. Eine solche Rückübersetzung ist allerdings noch niemals beobachtet worden. Sie würde überdies eindeutig das zentrale Dogma der Molekularbiologie verletzen, das besagt, der Informationsfluß in der Zelle führe immer von den Nucleotiden zu den Proteinen.

Man kann sich auch einen Mechanismus vorstellen, bei dem die Aminosäure-Sequenz von PrP direkt als Matrize für den Aufbau eines neuen Protein-Moleküls dient (Bild 8g). Aber auch eine solche proteingesteuerte Protein-Synthese ist niemals beobachtet worden; ebenso wenig sind Enzyme bekannt, die ein komplexes Protein auf diesem Wege aufbauen könnten.

Zur dritten Gruppe gehören hypothetische Vermehrungsmechanismen, die mir am glaubwürdigsten erscheinen. Bei ihnen gibt es ein DNA-Gen, das für die Aminosäure-Sequenz des Prion-Proteins codiert. Doch steckt es nicht im Prion, sondern ist Bestandteil des normalen Genoms einer Säugerzelle. Die Infektion mit Prionen würde dieses Gen irgendwie aktivieren oder vielleicht verändern.

Falls das Prion doch ein kleines Stück Nucleinsäure enthält, so könnte das die Aktivierung auslösen – beispielsweise indem es sich (in Leserichtung gesehen) unmittelbar vor dem PrP-Gen einnistet, also genau vor dem Punkt, wo die Transkription, die Abschrift des Gens beginnt (Bild 8b). Die eingefügte Nucleotid-Sequenz könnte dann als Promotor oder Verstärker der Genexpression dienen.

Falls das Prion aber ausschließlich aus Protein besteht, könnte sich PrP selbst an die zelluläre DNA binden, und zwar an eine Region, welche die Transkription des PrP-Gens steuert (Bild 8d). Die meisten DNA-bindenden Proteine unterdrücken die Gen-Expression; doch gibt es auch Proteine, die auf diese Weise ihre eigene Synthese anregen.

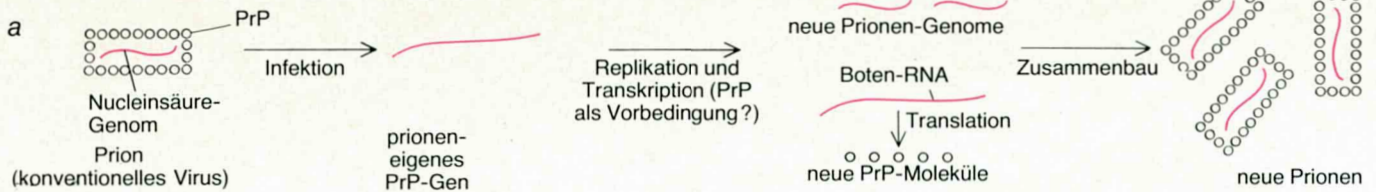
Ein Einwand gegen die Wirtsgen-Hypothese stützt sich auf die Beobachtung, daß es verschiedene Stämme von Prionen zu geben scheint. Wenn die Vermehrung des krankheitsauslösenden Agens auf der bloßen Aktivierung eines Wirtsgens beruht, wie können dann Tiere derselben Zuchtlinie verschiedenen Prionen als Wirt dienen? Jegliche Antwort ist zwar heute noch zwangsläufig reine Spekulation, aber die Umgruppierung von Genen bietet eine mögliche Erklärung. Die enorme Vielfalt der Antikörper entspringt beispielsweise einem solchen „Neumischen“ der Gene und Genabschnitte, die für die Proteinketten der Antikörper codieren.

Die Frage, ob das Wirtstier tatsächlich ein eigenes Gen für PrP besitzt, dürfte in den kommenden Monaten geklärt werden. Wir haben, wie erwähnt, eine DNA-Sonde hergestellt, die für die von uns bestimmte Teilsequenz von PrP codiert. Sie sollte sich an jegliche dazu komplementäre DNA-Sequenz binden und damit ein in der Zelle vorhandenes PrP-Gen identifizieren. Wenn solche wirtseigenen Gene wirklich existieren, dann sollte man bei der Synthese neuer Prionen besser von einer Vervielfachung (Amplifikation) statt von einer Vermehrung (Replikation) sprechen.

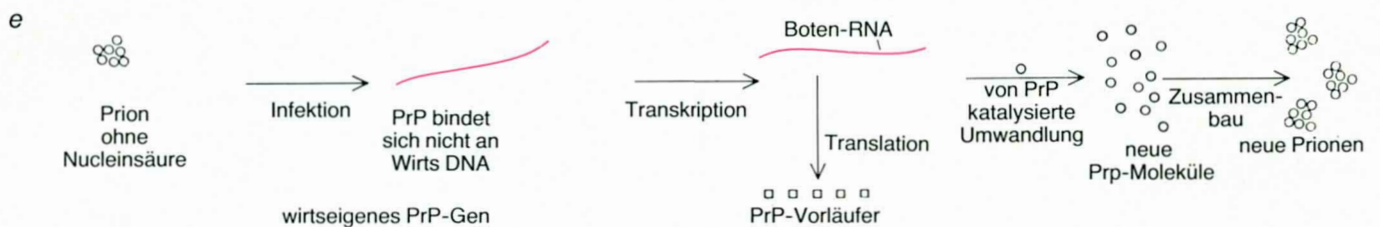
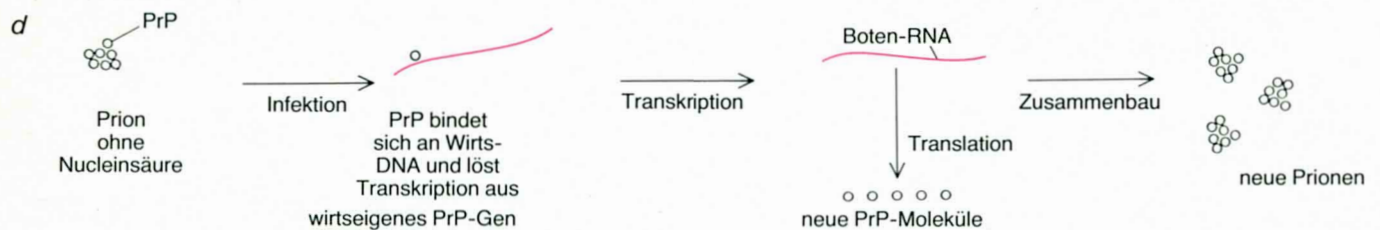
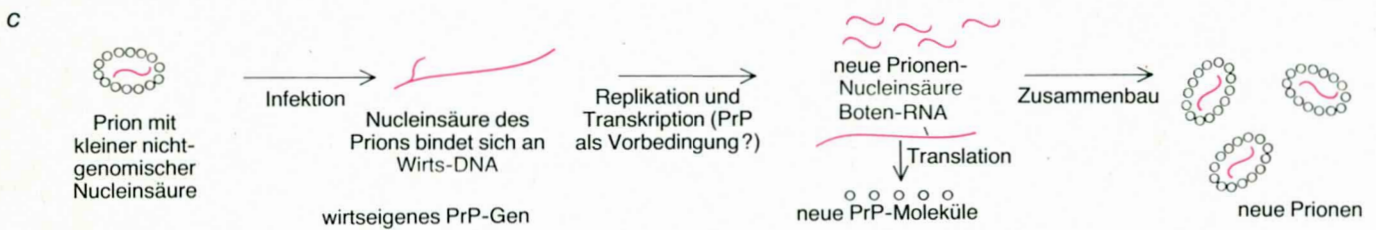
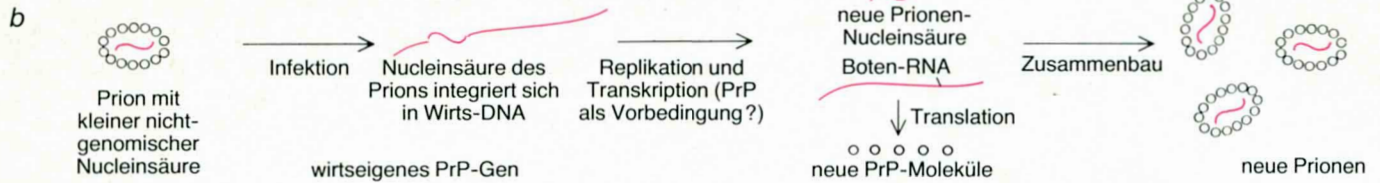
Prionen-Stäbchen

Da die Elektronenmikroskopie soviel über die Struktur und den Zusammenbau von Virus-Partikeln zutagegebracht hat, haben auch viele Forscher versucht, auf diesem Wege für Skrapie-Infektionen spezifische Partikel zu entdecken. So wurden kugelige und zylindrische Teilchen in Gewebeschnitten und Gewebeextrakten beschrieben. H. K. Narang fand in Schnitten von infiziertem Gehirngewebe stäbchenförmige Partikel. Sie lassen sich, wie er zeigte, mit Substanzen färben, die sich selektiv an Zuk-

Hypothese: Das Prion ist ein Virus mit einem DNA- oder RNA-Genom



Hypothese: Prion-Proteine werden von einem Gen des Wirtstieres bestimmt



Hypothese: Prion-Proteine werden nicht von Nucleinsäuren bestimmt

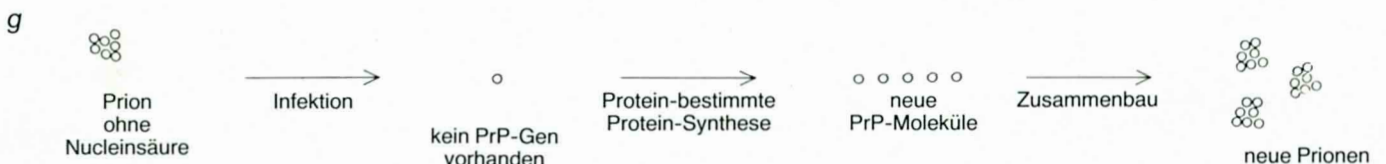
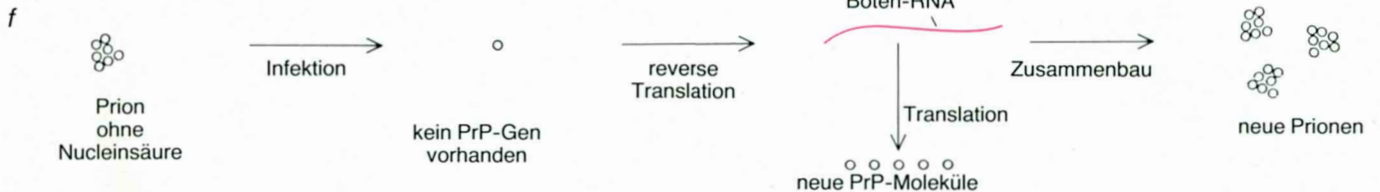


Bild 8: Wie sich Prionen vermehren könnten, dafür gibt es mehrere Hypothesen. Unwahrscheinlich ist, daß es sich beim Prion um ein herkömmliches Virus mit einer für PrP codierenden DNA oder RNA handelt (a). Nach diversen anderen Hypothesen codieren Gene des Wirtstieres für PrP. So könnte das Prion eine kleine Nucleinsäure enthalten, die sich in die wirtseigene DNA einfügt (b) oder einfach daran bindet (c) und dadurch die Expression der PrP-Gene fördert. Sofern das Prion überhaupt keine Nucleinsäure enthält, könnte sich das PrP selbst an die Wirts-DNA binden und so das gleiche bewirken (d). Daß biologisch aktive PrP-Mole-

küle für die Synthese neuer Prion-Partikel unerlässlich sind, ließe sich auch damit erklären, daß PrP die Umwandlung eines PrP-Vorläufermoleküls zu PrP katalysiert (e). Die beiden letzten Hypothesen schließlich verletzen das zentrale Dogma der Molekularbiologie, wonach die genetische Information stets von den Nucleinsäuren zu den Proteinen fließt. So könnte über eine reverse Translation, eine noch nie beobachtete Rückübersetzung, die Aminosäure-Sequenz von PrP zu einer entsprechenden Nucleotid-Sequenz führen (f) oder das PrP vielleicht sogar selbst – ganz ohne Nucleinsäure – die Matrize für seine eigene Synthese abgeben (g).

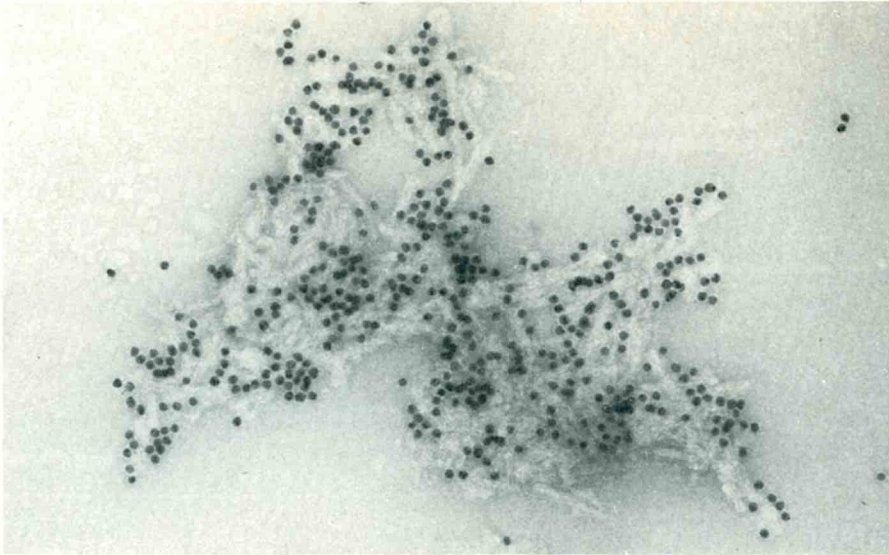


Bild 9: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt eine Zusammenballung von Prionen-Stäbchen in 100 000facher Vergrößerung. An die Stäbchen haben sich spezifische gegen

PrP gerichtete Antikörper gebunden, die selbst wieder mit kolloidalen Goldkörnchen markiert sind (dunkle Punkte). Solche Zusammenballungen ähneln auffallend den Amyloid-Plaques.

kermoleküle binden. Narangs Befunde sind deshalb so interessant, weil sich PrP zu Stäbchen zusammenlagert und – wie man heute weiß – ein Glykoprotein ist.

Henryk M. Wisniewski und seine Mitarbeiter am Downstate Medical Center der Staatsuniversität von New York haben in Gehirngewebe, das mit Skrapie und der Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose infiziert war, lange Fibrillen entdeckt. Sie glauben, daß sich diese Fasern von Amyloid unterscheiden und ein fadenförmiges Tiervirus sind, das Skrapie verursacht und eine langgestreckte Form der Prionen-Stäbchen darstellt.

Die Prionen-Stäbchen haben uns erst kürzlich weitere Aufschlüsse über die biologische und medizinische Bedeutung der Prionen gegeben. Sie sind in Präparationen zu finden, die aus einem einzigen Protein, nämlich PrP, bestehen. Folglich müssen sie weitgehend aus PrP-Molekülen zusammengesetzt sein. Unsere jüngsten Arbeiten mit PrP-Antikörpern bestätigen dies, denn die Antikörper binden sich spezifisch an die Stäbchen (Bild 9). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Stäbchen im typischen Fall 10 bis 20 Nanometer dick und 100 bis 200 Nanometer lang. Demnach dürfte ein einzelnes aus nicht weniger als 1000 PrP-Molekülen bestehen, die wahrscheinlich in kristalliner Form übereinandergestapelt sind.

Der vielleicht wichtigste und interessanteste Punkt ist die Ähnlichkeit der Prionen-Stäbchen mit Amyloid. In Gewebeschnitten wird Amyloid üblicherweise mit dem Farbstoff Kongorot nachgewiesen. Es bindet ihn und erscheint im Lichtmikroskop rot. Bei Betrachtung durch Polarisationsfilter zeigt das Amy-

loid dann die optischen Eigenschaften der Doppelbrechung: Die Farbe wechselt von Grün nach Gold, wenn man die Filter verdreht. Zusammen mit George G. Glenner von der Universität von Kalifornien in San Diego haben wir deshalb Anhäufungen von Prionen-Stäbchen mit Kongorot gefärbt: Bei normaler Beleuchtung erschienen sie rot, zwischen Polarisationsfiltern zeigten sie dagegen die grün-goldene Doppelbrechung.

Über 60 Jahre lang hat man die Amyloid-Plaques im Zentralnervensystem für Ablagerungen von Abfallstoffen gehalten, gebildet als Folge irgendeines Krankheitsprozesses. Unsere Befunde legen eine völlig andere Erklärung nahe: daß die Flecken möglicherweise fast-kristalline Aggregate von Prionen sind. Sie könnten den für viele virale Erkrankungen charakteristischen Einschlußkörperchen entsprechen, die kristalline Anordnungen von Viruspartikeln sind.

PrP in Amyloid-Plaques

Dank der Antikörper gegen PrP konnten wir zeigen, daß die Amyloid-Plaques im Gehirn von Skrapie-infizierten Hamstern Prion-Proteine enthalten. Die Gehirnschnitte wurden mit enzym-markierten Antikörpern behandelt, die eine zunächst farblose Substanz sichtbar machen (Bild 1), und dann mit Kongorot gefärbt. Dieselben Strukturen, die den Antikörper banden, nahmen auch das Kongorot an und zeigten die grün-goldene Doppelbrechung (Bild 2).

In Zusammenarbeit mit David T. Kingsbury von der Universität von Kalifornien in Berkeley und dem Laborato-

rium für Meeres-Biowissenschaften der USA haben wir die Antikörper gegen Skrapie-PrP auch benutzt, um bei der Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose solche Proteine zu finden. Tatsächlich gab es im Gehirn von Tieren und Patienten, die mit dem Erreger infiziert waren, Proteine mit den Eigenschaften von PrP. Auch sie lagern sich zu stäbchenförmigen Partikeln zusammen, welche die Merkmale von Amyloid aufweisen.

Amyloid-Plaques sind ein fast sicheres Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit: Mit ihrer Zahl steigt auch der Grad der geistigen Störung. Der Gedanke, daß auch diese Erkrankung ein Prionen-Infekt sein könnte, ist faszinierend; doch gibt es keinerlei verlässliche Hinweise, daß sie übertragbar oder ansteckend ist. Sie wird nicht durch Kontaktpersonen verbreitet. Gajdusek und Gibbs haben wiederholt versucht, die Krankheit durch Impfung auf Versuchstiere zu übertragen – bis auf zwei mögliche, aber nicht reproduzierbare Fälle ohne Erfolg.

Wenn die Alzheimersche Erkrankung tatsächlich durch Prionen verursacht wird, ließe sich das offensichtliche Mißlingen solcher Übertragungsexperimente möglicherweise mit zwei Hypothesen erklären: Erstens, der Erreger kann sich in den für die Versuche gewählten Tierarten nicht vermehren; und zweitens, die Inkubationszeit ist einfach zu lang, so daß die Tiere möglicherweise an Alter sterben, ehe die Erkrankung ausbricht. Verschiedenen Berichten nach beträgt die Inkubationszeit für Kuru und die Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose immerhin zwei bis drei Jahrzehnte. Bemerkenswert ist deshalb, daß vorwiegend ältere Menschen an Morbus Alzheimer erkranken und daß die Häufigkeit des Auftretens mit zunehmendem Alter steigt. Freilich bleibt auch die Möglichkeit, daß die Krankheit nicht von Prionen oder irgendeinem anderen Erreger hervorgerufen wird; viele andere Ursachen sind noch im Gespräch.

Die Übertragbarkeit der Jakob-Creutzfeldt-Pseudosklerose wirft ganz andere Fragen auf. Daß sich die Krankheit in Laborversuchen übertragen läßt, steht außer Zweifel, aber es ist unklar, wie die Infektion in einer natürlichen Population weiterbesteht. Weltweit ist jeder millionste Mensch daran erkrankt. Das scheint jedoch zu wenig, um eine Infektionskette von Mensch zu Mensch aufrechtzuerhalten.

Vielleicht lassen sich diese Rätsel lösen, wenn erst die Biochemie des Prions genauer bekannt ist. Wenn es sich tatsächlich als ein einzelnes Protein und das Produkt eines wirtseigenen Gens erweist, dann mag die Zeit reif sein zu überdenken, was denn eigentlich unter „Infektion“ zu verstehen ist.