

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. P. Kühnl

**Anti-prionin Antikörper, als möglicher Marker für die Detektion
der varianten Creutzfeldt-Jakob Krankheit bei Blutspendern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg vorgelegt

von
ANNIKA SCHÖN
aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am : 03.06.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am :

Prüfungsausschuss der/die Vorsitzende: PD Dr. K. Gutensohn

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. E.-P. Horn

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. R. Köster

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	6
1.1 Allgemein	6
1.2 Ziele der Studie	7
2 Einleitung	8
2.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE)	8
2.1.1 Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	10
2.1.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	12
2.1.3 Variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit (vCJD)	16
2.2 Übertragbarkeit transmissibler spongiformer Enzephalopathien durch Blut	19
2.3 Prionen	21
2.4 Prionine	26
2.5 <i>Enzyme linked immunosorbent assays</i> (ELISA)	30
3 Material und Methoden	33
3.1 Blutspenderkollektiv	33
3.2 Probenentnahme bei Blutspendern	33
3.3 Probenaufbereitung	34
3.4 Laboruntersuchungen bei Blutspendern	34
3.5 Patientenkollektiv	35
3.6 Probenentnahme bei Patienten	35
3.7 Liquordiagnostik bei Patienten	36
3.8 BSE Plus TM (hc)-Test	38
3.9 Statistische Auswertung	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Spenderkollektiv	41
4.2 Hämatologische Parameter	41
4.2.1 Hämoglobinkonzentration	43
4.2.2 Erythrozytenzahl	43
4.2.3 Leukozytenzahl und Differentialblutbild	43
4.2.4 Thrombozytenzahl	45

4.3	BSE PLUS™ (hc)-Test	45
4.3.1	CJAS-Epitop	46
4.3.2	BSAS-Epitop	48
4.3.3	SCRAPAS-Epitop	50
4.4	Patientenkollektiv	52
4.5	Liquoranalytik	53
4.5.1	Globalparameter	53
4.6	Serum/Liquor Quotienten	55
4.7	Neuronen spezifische Enolase im Liquor	56
4.8	BSE PLUS™ (hc)-Test	56
4.8.1	CJAS-Epitop	57
4.8.2	BSAS-Epitop	58
4.8.3	SCRAPAS-Epitop	59
4.9	Kontrollen BSE PLUS™ (hc)-Test	61
4.9.1	Positive Kontrollen	61
4.9.2	Negative Kontrollen	62
5	Diskussion	64
5.1	Allgemein	64
5.2	Bluttests für vCJD	66
5.2.1	Anti-Prionin ELISA	68
5.3	Validierung positiver Proben	70
5.4	Blutspender	71
5.4.1	Hämatologische Parameter	71
5.4.2	BSE Plus (hc) Test bei Blutspendern	73
5.5	Patienten	77
5.5.1	Allgemeine Parameter	77
5.5.2	BSE PLUS (hc) Test bei Patienten	78
5.6	Prionin-Hypothese	78
6	Zusammenfassung	80
7	Literaturverzeichnis	82
8	Anhang	94
8.1	Abbildungsverzeichnis	94
8.2	Tabellenverzeichnis	95
9	Danksagung	96

10 Lebenslauf	97
11 Eidesstattliche Versicherung	98

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
BSAS	<i>bovine spongiform encephalopathy associated prionin</i>
BTD	Bluttransfusionsdienst
CJAS	<i>Creutzfeldt-Jakob associated prionin</i>
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>
CWD	<i>chronic wasting disease</i>
DGTI	Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immun- hämatologie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
fCJD	<i>familliar Creutzfeldt-Jakob disease</i>
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträusler-Scheinker-Syndrom
HGH	<i>human growth hormon</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
iCJD	<i>iatrogen Creutzfeldt-Jakob disease</i>
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
L	Liter
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
MRT	Magnetresonanztomografie
NSE	Neuronen spezifische Enolase
nvCJD	<i>new variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>

OD	optische Dichte
OPD	Orthophenyldiamin
PMCA	<i>protein misfolding cyclic amplification</i>
PNP	Polyneuropathie
Prion	<i>proteinaceous infectious particle</i>
PrP	Prionprotein
PrP ^c	zelluläres Prionprotein
PrP ^{sc}	pathogenes Prionprotein
PWSC	<i>periodic sharp and slow wave complexes</i>
RBC	<i>red blood cell count</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SCRAPAS	<i>scrapie associated prionin</i>
SD	Standardabweichung
TME	<i>transmissible mink encephalopathy</i>
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathien
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vCJD	<i>variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>
WBC	<i>white blood cell count</i>
WHO	<i>world health organisation</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

1.1 Allgemein

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) sind eine schon seit langer Zeit bekannte Gruppe von bei Menschen und Tieren auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen. Als Auslöser der Krankheiten gilt ein in seiner Konformation verändertes Protein, das so genannte Prion-Protein (98). In das Blickfeld der breiten Öffentlichkeit gelangten die TSEs erst durch die Mitte der 1980er Jahre erstmalig in Großbritannien beschriebene bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) (123). Die populär auch als Rinderwahnsinn bezeichnete Krankheit ist heute fast weltweit in Rinderbeständen nachweisbar (68). Ihre Übertragbarkeit auf den Menschen in Form der varianten Creutzfeldt-Jakob Krankheit (*variant Creutzfeldt-Jakob disease*; vCJD) gilt aufgrund identischer Erregereigenschaften als belegt (22, 111).

Während primäre vCJD Infektionen über die Nahrungskette durch rückläufige BSE Fallzahlen und konsequente Maßnahmen des Verbraucherschutzes, wie dem Verbot der Verwendung von hochinfektiösen Rindermaterialien zur Lebensmittelherstellung und die umfassende Durchführung von BSE-Schnelltests bei Schlachtrindern, heute als weitgehend ausgeschlossen gelten (107), bleibt das Risiko von Sekundärinfektionen durch die Übertragung der Krankheit von Mensch zu Mensch weiterhin bestehen. Neben chirurgischen Instrumenten gelten hier insbesondere Blut und Blutprodukte als mögliche Infektionsquellen (81). Bis heute wurden drei Fallberichte über eine wahrscheinliche Übertragung der vCJD durch Erythrozytenkonzentrate in Großbritannien publiziert (80, 93, 130).

Zur Minimierung dieses durch Blut bedingten Übertragungsrisikos wurden trotz der weltweit niedrigen Fallzahlen, umfangreiche Schutzmaßnahmen ergriffen. Hierzu gehört im deutschen Blutspendewesen neben der seit September 2000 vorgeschriebenen Leukozytendepletion auch der Ausschluss von Personen mit erhöhtem Risiko für primäre vCJD Infektionen von der Blutspende (9). Hiervon sind alle Blutspender die sich in der Zeit von 1980 bis 1996 länger als 6 Monate am Stück

in Großbritannien aufgehalten haben, sowie Personen die in Großbritannien operiert oder transfundiert wurden, betroffen. Die Möglichkeit von Sekundärinfektionen bleibt jedoch trotz dieser Maßnahmen weiter bestehen (102).

Zum heutigen Zeitpunkt existiert keine Möglichkeit die vCJD bereits im präklinischen Stadium zu diagnostizieren und so Sekundärinfektionen sicher zu verhindern. Als problematisch erweisen sich hier das Fehlen zuverlässiger Surrogatmarker und die niedrige Konzentration von krankheitsspezifischen Prionen im Blut (1, 16). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit einem Bluttest der, basierend auf einer von der bekannten Prion-Theorie abweichenden und diese ergänzende Hypothese, dazu in der Lage sein soll, so genannte anti-Prionin Antikörper als möglichen Marker der vCJD im präklinischen Stadium der Krankheit nachzuweisen. Da der verwendete Test auf einem herkömmlichen Immunoassayverfahren basiert, kann er die labortechnischen Anforderungen an einen routinemäßig im Spenderscreening eingesetztes Testsystem erfüllen. Aufgrund der Schlüsselposition von kontaminiertem Blut und Blutprodukten für die sekundäre Ausbreitung der Krankheit, haben wir in der vorliegenden Studie primär Proben von Blutspendern mit einem anti-Prionin ELISA getestet.

1.2 Ziele der Studie

Kontaminiertes Blut und Blutprodukte gelten als eine Quelle möglicher vCJD Sekundärinfektionen. Primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, Aufschlüsse über das Vorhandensein von Prioninen im Blut einer Population von Blutspender zu erlangen. Hierfür wurden Blutproben von 520 männlichen und 420 weiblichen gesunden Blutspendern, welche die Kriterien der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) sowie die des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Blutspende erfüllten, mit dem BSE PLUS™ (hc) Testkit der Firma Altegen (Altegen Corp., Hamburg, Deutschland), einem anti-Prionin ELISA, getestet. Um einen möglichst großen Personenquerschnitt zu gewährleisten, erfolgte die Auswahl der Spender zufällig.

Neben dem Blut gesunder Spender wurden außerdem Proben von Patienten der neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) mit dem BSE PLUS™ (hc) Test (Altegen) untersucht. Alle untersuchten Patientenproben stammten von Patienten, bei denen während eines stationären Aufenthaltes eine Liquordiagnostik im Liquorlabor der neurologischen Klinik durchgeführt wurde.

Des Weiteren sollten Handhabung und Praktikabilität des verwendeten BSE PLUS™ (hc) Testsystems überprüft werden. Das Testkit sollte auf seine Einsetzbarkeit im Rahmen des routinemäßigen Blutspenderscreenings hin geprüft werden.

2 Einleitung

2.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien sind eine Gruppe von sowohl bei Menschen, als auch bei Tieren auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen. Die Krankheiten können spontan, genetisch oder auch infektiös bedingt sein. Die bekanntesten TSE bei Tieren sind die seit dem 18. Jahrhundert bekannte Scrapie, die bei Schafen und Ziegen auftritt und die 1986 erstmalig in Großbritannien beschriebene bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) des Rindes. Weitere bei Tieren auftretende TSE sind die feline spongiforme Enzephalopathie (FSE), die transmissible Mink Enzephalopathie (TME), die bei nordamerikanischen Langohrhirschen und Wapitis auftretende *chronic wasting disease* (CWD) und die *exotic ungulate encephalopathie* (spongiforme Enzephalopathie der exotischen Wiederkäuer). Beim Menschen sind die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (*Creutzfeldt-Jakob disease*; CJD), die variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK), die fatale familiäre Insomnie (FFI), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und Kuru bekannt (43, 74).

All diesen Krankheiten gemein sind ihre lange Inkubationszeit, der immer tödliche Verlauf und ihre Übertragbarkeit. Das klinische Bild der humanen TSE ist von unterschiedlich stark ausgeprägter Demenz und unspezifischen Verhaltensänderungen gekennzeichnet. Dazu treten verschiedenste neurologische Symptome wie Ataxie, Myoklonien oder auch Dysarthrie auf (99). Histopathologisch ist eine lichtmikroskopisch erkennbare spongiöse Degeneration des Parenchyms von Groß- und Kleinhirn typisch. Begleitet wird diese Degeneration von Nervenzellverlust, gesteigerter Astrozytenproliferation und Mikrogliaaktivierung (46). Zeichen einer zellulären Immunantwort fehlen dagegen völlig. Als spezifisches Merkmal können je nach Krankheitstyp verschieden stark ausgeprägte amyloide Ablagerungen, die so genannten Kuru-Plaques, nachgewiesen werden (75). Der Ausprägungsgrad dieser Veränderungen ist jedoch einer starken Variationsbreite unterworfen.

Die Übertragbarkeit transmissibler spongiformer Enzephalopathien konnte für Scrapie bereits 1936 auf experimentellem Weg gezeigt werden (39). 1959 führte dann die von Hadlow diskutierte neuropathologische Ähnlichkeit zwischen Scrapie und Kuru zu weiteren Übertragungsexperimenten (55). Kuru ist eine bei den Fore, einem steinzeitlichen Volksstamm in Papua-Neuguinea auftretende TSE. Die Krankheit wurde wahrscheinlich durch rituellen Kannibalismus, bei dem auch die Gehirne Verstorbener verzehrt wurden, innerhalb des Stammes übertragen. Seit dem Verbot dieser Praktiken in den späten 1950er Jahren waren die Fallzahlen stark rückläufig und es konnten keine neuen Fälle bei Personen, die nach der vollständigen Durchsetzung des Kannibalismusverbotes geboren wurden, beobachtet werden (33). Durch Inokulationsexperimente konnte Kuru auf Schimpansen übertragen werden. Die Affen wurden hierbei durch das Gehirnhomogenat von Kuru Patienten mit der Krankheit infiziert (45). Ebenfalls an Primaten konnte 1968 die Übertragbarkeit der CJK gezeigt werden (42). Auch für das 1936 erstmalig beschriebene Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die erst seit 1992 als eigenständiges Krankheitsbild bekannte Fatale Familiäre Insomnie ist die Übertragbarkeit heute belegt (32, 82).

Als Ursache der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wurde aufgrund der langen Latenzzeiten bis zum Krankheitsausbruch zunächst eine so genannte *slow virus*-Infektion mit einem sich sehr langsam vermehrenden Virus als Erreger

vermutet (119). Neben den ungewöhnlich langen Inkubationszeiten, fiel jedoch auch die Resistenz des Erregers gegenüber herkömmlichen Sterilisierungsverfahren auf. So blieb die Infektiosität nach Bestrahlung mit UV-Licht, der Behandlung mit Nukleasen und dem Autoklavieren bei 121°C über 20 Min. erhalten. Dagegen führten proteindenaturierende Methoden, wie zum Beispiel die Behandlung mit Harnstoff, Natronlauge oder auch Proteasen zum Verlust der Infektiosität (2, 3).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde bereits 1967 von Griffith die Hypothese aufgestellt, dass der Erreger der Scrapie sich ohne Nukleinsäuren vermehren kann (54). Hierauf aufbauend, entwickelte Stanley Prusiner die Prion-Hypothese. Gemäß dieser Hypothese besteht der Erreger der TSE aus einem in seiner Sekundärstruktur veränderten körpereigenen Protein, dem so genannten Prion-Protein. Prion steht hierbei für *proteinaceous infectious particle*, ein von Prusiner geschaffener Begriff, um den neuen Erreger von bereits bekannten Erregern wie Viren und Viroiden abzugrenzen (97).

2.1.1 Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Die bovine spongiforme Enzephalopathie ist die bekannteste TSE bei Tieren. Die betroffenen Rinder fallen zunächst durch Verhaltensänderungen wie erhöhte Unruhe und Schreckhaftigkeit auf. Eine Überempfindlichkeit der Tiere gegenüber sensorischen Reizen wie Lärm und Licht ist typisch. Auffällig sind außerdem Abmagerung und ein Rückgang der Milchleistung. Begleitet wird dies von im Verlauf immer stärker werdenden ataktischen Bewegungsstörungen, die bis zum plötzlichen Niederstürzen der Tiere führen können (126). Der Verlauf der Krankheit ist immer tödlich. Die mittlere Inkubationszeit der BSE liegt bei 5 Jahren (43). Erstmalig beschrieben wurde BSE 1986 bei Rindern in Großbritannien (123). Man nimmt an, dass seitdem über 2 Millionen Tiere mit BSE infiziert wurden (41). In Großbritannien erreichte die Seuche im Jahr 1992 mit 37.000 Fällen ihren Höhepunkt.

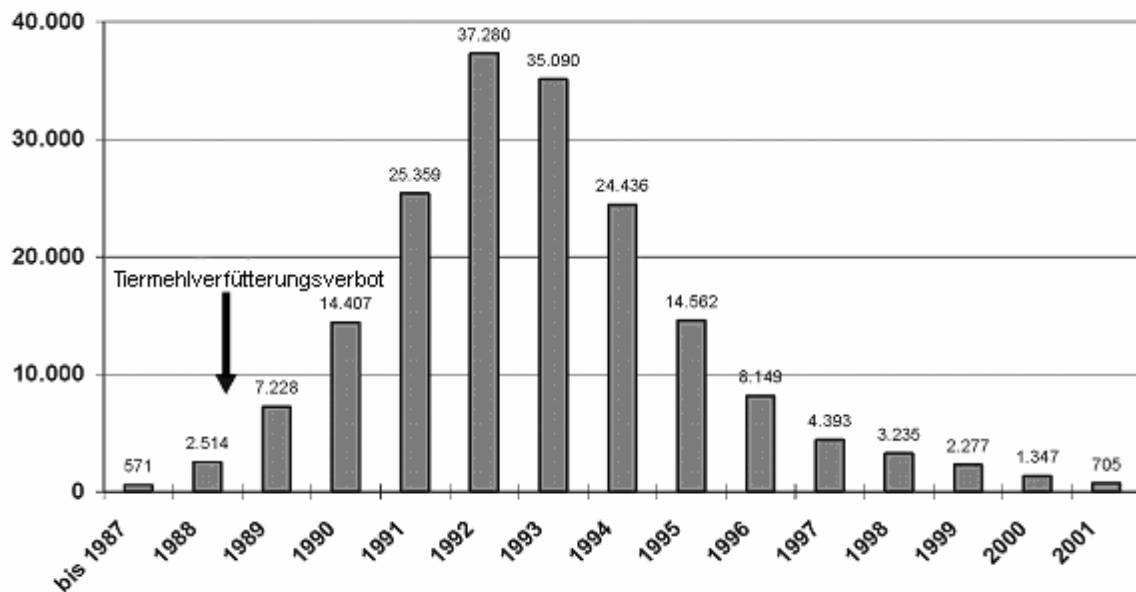


Abbildung 1: Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien
(Quelle: www.defra.gov.uk)

Die Ausbreitung der BSE lässt sich auf die Verfütterung von unzureichend desinfizierten Tiermehlen an Rinder zurückführen. Es werden dabei zwei mögliche Quellen als Ursprung der Epidemie diskutiert. Zum einen könnte durch die Verarbeitung von an Scrapie verendeten Schafen der Scrapie Erreger auf Rinder übertragen worden sein und dadurch BSE ausgelöst haben. Zum anderen könnte BSE in niedrigen Fallzahlen schon immer in der Rinderpopulation vorhanden gewesen sein und durch die Verarbeitung von erkrankten Rindern zu Tiermehl und dessen anschließender Verfütterung weiter in der Population gestreut worden sein (20). Begünstigt wurde die Verbreitung der Krankheit durch eine Veränderung der Herstellungsmethoden von Tiermehl in England. Anfang der 1980er Jahre wurde die Temperatur im Herstellungsprozess auf unter 120°C abgesenkt und die Fettextraktion durch organische Lösungsmittel als Verarbeitungsschritt ausgelassen. Hierdurch wurden im Tiermehl vorhandene BSE-Erreger vermutlich nicht mehr ausreichend inaktiviert. Verstärkt wurde die epidemische Ausbreitung der Krankheit außerdem durch die lange Zeit fortgesetzte Verarbeitung von an BSE verendeten Rindern zu weiterem Tiermehl (125). Ein Beleg hierfür ist der Verlauf der BSE-Fallzahlen in Großbritannien. Diese sind seit dem so genannten *feed ban*,

dem Verbot der Verfütterung von Tiermehl an Rinder im Jahr 1988, massiv rückläufig (4). Der zunächst beobachtete Anstieg der Fallzahlen lässt sich auf Rinder, die zu Beginn des Verbotes der Tiermehlverfütterung bereits infiziert waren und sich noch in der Inkubationsphase der Krankheit befanden zurückführen. 2006 wurden in Großbritannien nur noch 115 Fälle gemeldet.

Deutschland galt lange Zeit als frei von BSE, da allein Fälle, die sich auf aus Großbritannien stammende Tiere oder importiertes Futter zurückführen ließen, beobachtet wurden. Mit dem Ende der passiven Überwachung und der verpflichtenden Einführung von BSE Tests für Schlachtrinder im Jahr 2000 wurden jedoch auch heimische Fälle nachgewiesen. Seit dem ersten einheimischen Fall am 26.11.2000 wurden in Deutschland 408 Kühe positiv auf BSE getestet (Stand Juni 2007). Inzwischen wurden auch in fast allen anderen europäischen und einigen außereuropäischen Ländern wie Japan oder Kanada BSE Fälle nachgewiesen. Die Fallzahlen liegen hier jedoch deutlich unter denen in Großbritannien und sind auch hier rückläufig. Seit Ende 2000 gilt ein europaweites Verfütterungsverbot von Tiermehlen an Wiederkäuer (9).

2.1.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die zunächst als spastische Pseudosklerose bezeichnete Creutzfeldt-Jakob Krankheit (*Creutzfeldt-Jakob disease*; CJD) wurde erstmalig 1920/21 von den deutschen Neurologen Hans Gerhardt Creutzfeldt und Alfons Maria Jakob beschrieben (38, 70). Die Krankheit tritt weltweit mit einer Inzidenz von etwa 1:1.000.000 Einwohner auf (84). Es kann dabei zwischen einer sporadischen, einer familiär-hereditären und einer iatrogen bedingten Krankheitsform unterschieden werden. Mit einem Anteil von etwa 90% der Erkrankungen überwiegt die sporadische Form der CJD, familiär-hereditär bedingt sind etwa 10-15% der Fälle. Der Altersgipfel der sporadischen CJD liegt im 7. Lebensjahrzehnt, Patienten mit familiärer oder iatrogen bedingter Form erkranken häufig früher (43).

Die klinisch-symptomatische Phase der Krankheit beginnt oft zunächst mit Schlafstörungen, Gewichtsabnahme und depressiven Persönlichkeitsveränderungen. Das Leitsymptom sind kontinuierlich zunehmende Gedächtnisstörungen. Diese gehen, begleitet von Aphasie und räumlicher Orientierungsstörung, im Verlauf rasch in eine progrediente Demenz über. Parallel können sich eine Vielzahl von Symptomen wie Visusminderung, Diplopie, Dysarthrie, Dysphagie, Tremor, choreoathetotische Hyperkinesen und ataktische Gangstörungen zeigen. Typisch sind außerdem spontane oder durch akustische und sensible Stimuli auslösbare Myoklonien. Der Krankheitsverlauf ist nach dem Auftreten der ersten Symptome schnell progredient und führt im Durchschnitt innerhalb von 6 Monaten zum Tod des Patienten (44, 84). Das Finalstadium der Krankheit ist durch zunehmenden Rigor und Spastik des Patienten gekennzeichnet. Der Tod tritt zumeist als Folge von Begleiterkrankungen wie Pneumonien oder durch vegetative Regulationsstörungen ein.

Das mikroskopische Bild der CJD zeigt die für alle TSEs typischen spongiformen Veränderungen im Neuropil, Nervenzellverlust, astrozytäre Gliose und Mikrogliaaktivierung. Amyloide Ablagerungen sind im Vergleich zu anderen TSE eher selten und nur in 10-15% der Fälle nachweisbar (75). Entzündungszeichen fehlen auch im akuten Stadium der Erkrankung vollständig.

Die Diagnose der CJD *ante mortem* ist schwierig, da differentialdiagnostisch eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen wie M. Alzheimer, Chorea Huntington und M. Parkinson in Betracht kommen. Typischerweise lassen sich im Vollbild der Erkrankung charakteristische Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG), bestehend aus periodischen bi- und triphasischen Komplexen (*periodic sharp and slow wave complexes*, PSWC), nachweisen. Die Sensitivität des EEG liegt bei etwa 66% (115). Ein früh im Krankheitsverlauf beobachtetes Auftreten von PSWC geht mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten einher (17). Bildgebende Verfahren zeigen eine diffuse Hirnatrophie mit begleitender Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume. In der T2 gewichteten Magnetresonanztomografie (MRT) können zudem bei etwa 67% der Erkrankten signalintense Läsionen im Stammganglienbereich nachgewiesen werden (131). Der Anstieg von 14-3-3 Protein, neuronenspezifischer Enolase (NSE), S100-Protein oder Tau-Protein im

Liquor, als unspezifische Marker für den Untergang von Neuronen, kann bei der Diagnosefindung helfen (65, 89, 90). Den größten diagnostischen Wert für die Differentialdiagnose der CJD hat hierbei, mit einer Sensitivität von 94% bei einer Spezifität von 93%, das 14-3-3 Protein.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der CJD (nach WHO)

	Kriterien
Sicher	Neuropathologisch gesicherte spongiforme Enzephalopathie
Wahrscheinlich	<ol style="list-style-type: none"> 1. Rasch progrediente Demenz 2. Krankheitsdauer unter 2 Jahren 3. Typische EEG-Veränderungen oder Nachweis von 14-3-3-Protein im Liquor Mindestens 2 der 4 folgenden klinischen Zeichen: <ul style="list-style-type: none"> - Myoklonien - Sehstörungen oder zerebelläre Zeichen - Pyramidenbahnzeichen oder extrapyramidale Störungen - Akinetischer Mutismus
Möglich	<ol style="list-style-type: none"> 1. Klinische Kriterien erfüllt 2. Keine typischen EEG-Veränderungen und Kein 14-3-3-Protein im Liquor

Die in Tabelle 1 dargestellten Diagnosekriterien der Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*; WHO) unterscheiden zwischen sicheren, wahrscheinlichen und möglichen Fällen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Die endgültige Diagnose kann allerdings nur *post mortem*, durch den immunhistochemischen Nachweis der pathologischen Form des Prionproteins gestellt werden.

Die Ursache für das Auftreten der sporadischen CJD ist unbekannt. Es ist jedoch bekannt, dass das homozygote Vorkommen von Methionin oder Valin im Codon 129 des Prionprotein-Gens (PRNP) ein prädisponierender Faktor für ein mögliches Erkranken ist. Homozygote Genotypen sind bei Patienten mit sporadischer CJD

(71,6% MM, 16,7% VV) im Vergleich zur Normalbevölkerung (37% MM, 12% VV) deutlich überrepräsentiert (92).

Die familiären Formen der CJD (*familiar Creutzfeldt-Jakob disease*; fCJD) sind von der sporadischen oft weder klinisch noch pathologisch abgrenzbar. Bei betroffenen Patienten finden sich jedoch häufig längere Krankheitsverläufe und ein früherer Krankheitsbeginn. Die E200K-Mutation, eine Punktmutation im Codon 200 des PRNP, stellt mit ca. 50% der Fälle die häufigste Ursache der fCJD dar. Daneben sind noch verschiedene weitere Punkt- und Insertionsmutationen, die eine fCJD auslösen, bekannt. Die Penetranz dieser PRNP Mutationen beträgt nach heutiger Erkenntnis 100 % (51). Auch das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die fatale familiäre Insomnie lassen sich auf Mutationen im Prionproteingen zurückführen.

Der erste Fall einer iatrogenen Übertragung der CJD (*iatrogen Creutzfeldt-Jakob disease*; iCJD) wurde 1974 veröffentlicht. Die Krankheit wurde hierbei durch das Korneatransplantat eines an CJD erkrankten Spenders übertragen (42). Heute sind außerdem Fälle von iatrogenen Übertragung durch neurochirurgische Instrumente, EEG-Tiefenelektroden, Dura mater-Transplantate und durch aus Leichenhypophysen gewonnenes Gonadotropin und humanes Wachstumshormon (*human growth hormone*; HGH) bekannt (19). Den zahlenmäßig größten Anteil an iatrogen übertragener CJD hat dabei die Transmission durch kontaminiertes HGH. Die Inkubationszeit bei iatrogenen Übertragung ist in ihrer Dauer abhängig vom Ort des Kontaktes mit kontaminiertem Material. So beträgt die Inkubationszeit bei intracerebralem Kontakt durch neurochirurgische Instrumente im Mittel 20 Monate, während bei peripherem Kontakt mit infektiösem Material, wie durch die Applikation von Hypophysenhormonen, eine mehrere Jahre dauernde Inkubationszeit folgt. Auch klinisch äußert sich eine periphere Infektion zunächst durch Symptome wie Gangunsicherheit und Ataxie, während Demenz erst später im Krankheitsverlauf auftritt. Bei zentraler Infektion steht dagegen zunächst eine fortschreitende Demenz im Vordergrund der Symptome (43).

2.1.3 Variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit (vCJD)

Die 1996 erstmals beschriebene variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit (*variant Creutzfeldt-Jakob disease*; vCJD) gilt aufgrund von epidemiologischen und experimentellen Beobachtungen als die humane Form der bovinen spongiformen Enzephalopathie. Dieser Zusammenhang wurde schon von den Erstbeschreibern der Krankheit aufgrund des zeitlichen und örtlichen Zusammentreffens der BSE-Epidemie mit dem erstmaligen Auftreten der vCJD in Großbritannien postuliert (128). Auch unterschied sich das klinische Bild der ersten beobachteten Fälle so deutlich von dem der bekannten sCJD, dass der Verdacht einer neuen, durch BSE ausgelösten, Variante der Krankheit nahe lag. Durch verschiedene experimentelle Befunde gilt diese Hypothese heute als weitgehend bestätigt. So ruft die intrazerebrale Inokulation von vCJD und BSE Material in genetisch homogene Inzuchtmäuse ein in seinen histopathologischen Eigenschaften und der Inkubationszeit identisches Krankheitsbild hervor, welches sich von den durch sCJD oder Scrapie hervorgerufenen Läsionsprofilen deutlich unterscheidet (22). Auch in transgenen Mäusen, welche das bovine Prionprotein exprimieren, konnten diese Befunde bestätigt werden (111). Des Weiteren zeigen Western-Blot Analysen von nach Proteinase-K-Behandlung aus BSE und vCJD Material isolierten Prionen, ein fast identisches Bandenmuster, welches sich vom Glykolisierungsmuster bei anderen TSEs unterscheidet (59).

Neuropathologisch zeigen sich bei der vCJD wie bei anderen TSE Nervenzellverlust, astrozytäre Gliose und spongiforme Degeneration. Spongiforme Veränderungen lassen sich insbesondere in Nucleus caudatus, Putamen und Cerebellum nachweisen (61). Amyloide Ablagerungen treten bei der vCJD besonders ausgeprägt auf. Typischerweise findet sich hier eine zentrale Amyloidplaque, welche von einem Ring von Vakuolen umgeben ist. Aufgrund dieses „blütenartigen“ Erscheinungsbildes werden die Ablagerungen auch als floride Plaques bezeichnet. Bei anderen Formen der CJD wurden Plaques in dieser Ausprägung bisher nicht beobachtet, sie scheinen somit spezifisch für die vCJD zu sein (74, 129). Im Gegensatz zu anderen TSEs lässt sich bei vCJD pathologisches Prionprotein in größerer

Konzentration auch in peripheren lymphoretikulären Geweben wie Tonsillen oder auch darmassoziiertem lymphatischem Gewebe nachweisen (60, 121).

Auch das klinische Bild der vCJD unterscheidet sich von dem der sporadischen Creutzfeldt-Jakob Krankheit. So sind die Patienten im Vergleich deutlich jünger, der Altersmedian zum Zeitpunkt des Auftretens von Krankheitssymptomen beträgt 26 Jahre. Zum Zeitpunkt des Todes sind die Patienten im Schnitt 28 Jahre alt (61). Die sCJD kommt dagegen im Alter unter dem 40. Lebensjahr kaum vor. Im Gegensatz zur klassischen Creutzfeldt-Jakob Krankheit stehen im klinischen Verlauf der vCJD anfänglich psychiatrische Symptome im Vordergrund. Die Betroffenen fallen oft zunächst durch psychiatrische Symptome wie plötzliche Zurückgezogenheit, neu auftretende Angstzustände, Apathie oder auch Depressionen auf (127). Im weiteren Verlauf entwickeln die Patienten distal betonte Par- und Dysästhesien, die den gesamten Krankheitsverlauf über persistieren. Zur Entwicklung einer Demenz kommt es erst im späteren Verlauf. Auch Ataxie, Myoklonien und choreoatiforme Bewegungsstörungen treten erst nach durchschnittliche neunmonatiger Krankheitsdauer auf. Im Endstadium der vCJD sind die Patienten akinetisch mutistisch, sie reagieren nicht auf äußere Reize und zeigen keinerlei Spontanbewegungen. In diesem Stadium ist klinisch keine Unterscheidung zu anderen Formen der Creutzfeldt-Jakob Krankheit mehr möglich. Der Tod tritt ebenso wie bei anderen Formen der CJD als Folge inkurrenter Infektionen, oder auch als Folge thrombembolischer Komplikationen ein. Die Krankheitsdauer der vCJD ist mit einem Median von 13 Monaten etwa doppelt so lang wie bei der sporadischen Form (96, 129).

Die klinische Diagnose der vCJD ist im Vergleich zur Diagnose anderer CJD Formen erschwert. So lassen sich im Krankheitsverlauf keine der für die sCJD typischen EEG Veränderungen nachweisen. Auch die sonst zur Diagnose herangezogene Veränderung der Liquorproteine tritt bei der vCJD deutlich seltener auf. Erhöhte 14-3-3 Konzentrationen im Liquor konnten im Gegensatz zur sCJD nur bei 45 % der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (53). Spezifische, für die vCJD typische Befunde, die eine Abgrenzung zur sCJD ermöglichen können, zeigen sich jedoch in der Kernspintomographie. Hier lassen sich bei 78% der Patienten bilaterale Signalanhebungen im hinteren Thalamus nachweisen

(129). Dieses als *pulvinar sign* bezeichnete Signalmuster gehört aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensitivität zu den offiziellen Diagnosekriterien der WHO. Zur Diagnose der vCJD am Lebenden lassen sich außerdem Tonsillenbiopsien heranziehen. Im Gegensatz zur sCJD, bei der nur sehr geringe Konzentrationen von Prionen in extraneuralen Geweben nachgewiesen werden können (50), lässt sich bei der vCJD regelhaft pathologisches Prionprotein in lymphoretikulären Geweben nachweisen (58).

Anhand dieser Befunde wurden auch für die vCJD eigene Diagnosekriterien aufgestellt. Neben einer Kombination klinischer Symptome beinhalten diese als einzige technische Untersuchung die Kernspintomografie (Tabelle 3).

Tabelle 2: Diagnosekriterien der vCJD (nach WHO)

I

- a) fortschreitende neuropsychiatrische Erkrankung
- b) Krankheitsdauer > 6 Monate
- c) Ausschluss alternativer Diagnosen durch Routineuntersuchungen
- d) Ausschluss einer iatrogenen Erkrankungsform
- e) kein Hinweis auf eine familiäre/genetische Prionerkrankung

II

- a) psychiatrische Symptome früh im Verlauf
- b) persistierende schmerzhafte Dysästhesien
- c) Ataxie
- d) Myoklonien, choreatiforme Bewegungen oder Dystonie
- e) Demenz

III

- a) keine PSWC im EEG oder EEG nicht erhoben
- b) Signalanhebungen im posterioren Thalamus im MRT

IV

- a) positive Tonsillenbiopsie
-

Die Diagnose der vCJD gilt als gesichert, wenn Ia vorliegt und eine vCJD neuropathologisch bestätigt ist. Die Diagnose ist wahrscheinlich, wenn I, 4 von 5 Kriterien aus II und III erfüllt sind oder wenn I und IV erfüllt sind. Eine mögliche Diagnose liegt vor, wenn I, IIIa und 4 von 5 Kriterien aus II vorliegen.

Die primäre Infektion des Menschen mit vCJD erfolgte nach heutiger Erkenntnis über die Nahrungskette durch die Aufnahme von mit BSE belastetem Rindermaterial (122). So lässt sich das Auftreten von so genannten Clustern, also Gebieten mit deutlich höheren vCJD Fallzahlen, in Großbritannien wahrscheinlich auf regionale Methoden der Fleischverarbeitung zurückführen. Hierbei sollen insbesondere hochinfektiöse Risikomaterialien wie Hirn und Rückenmark in den Verarbeitungsprozess mit eingeflossen sein (40).

Alle bisher aufgetretenen klinischen vCJD Fälle wurden bei Patienten, welche homozygot für Methionin im Codon 129 des Prionprotein Gens waren, beobachtet. In einem Fall konnte vCJD spezifisches Prion-Protein bei einem Patienten mit heterozygotem Genotyp nachgewiesen werden. Dieser zeigte jedoch keine klinischen Symptome der Krankheit (79). Darüber, ob Personen mit heterozygotem oder Valin-homozygotem Genotyp erst nach längerer Inkubationszeit Krankheits-symptome zeigen oder möglicherweise einen anderen klinisch-pathologischen Phänotyp entwickeln, liegen zum heutigen Zeitpunkt keine Erkenntnisse vor. Auch ein asymptomatischer Trägerstatus erscheint hier möglich.

2.2 Übertragbarkeit transmissibler spongiformer Enzephalopathien durch Blut

Für das Risiko der Übertragbarkeit transmissibler spongiformer Enzephalopathien durch Blut und Blutprodukte existieren widersprüchliche Ergebnisse. Für die schon lange bekannte sCJD ergeben epidemiologische Beobachtungen keinerlei Hinweise auf eine Übertragung der Krankheit durch Blut oder Blutprodukte. So bleibt die weltweite Inzidenz der Krankheit mit einer Zahl von 1:1 Million trotz eines steigenden Verbrauches von Blutkonserven seit Jahren konstant. Weiterhin lässt sich

auch in Fallkontrollstudien kein erhöhtes Auftreten der Krankheit bei Personen, die Bluttransfusionen oder Blutprodukte erhielten, beobachten (35).

Im Gegensatz zur sCJD lässt sich bei der vCJD ein deutlich erhöhter Erregergehalt in peripheren Geweben nachweisen, wodurch das Risiko für eine Weiterübertragung der Krankheit erhöht wird (21, 56). Hohe Erregerkonzentrationen finden sich insbesondere in lymphatischen Geweben wie der Milz, den Tonsillen und im darmassoziierten lymphatischen Gewebe. Das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) ist hier bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung, vor dem Auftreten von PrP^{Sc} im ZNS nachweisbar (121). Es wird angenommen, dass insbesondere follikulärdendritische Zellen als Reservoir für pathologisches Prionprotein im lymphatischen Gewebe dienen (15). Im Blut sind wahrscheinlich vor allem zirkulierende Lymphozyten und dendritische Zellen für den Transport und damit die Ausbreitung des PrP^{Sc} verantwortlich (12, 66).

Es existiert eine Vielzahl von tierexperimentellen Untersuchungen zur Frage der Infektiosität von Blut und Blutprodukten bei transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. Hierbei konnte eine Übertragung von TSEs bei natürlich infizierten Tieren nie nachgewiesen werden. Bei experimentell infizierten Tieren war in verschiedenen Versuchsanordnungen die Infektiosität von Blut prinzipiell nachweisbar. Viele dieser Übertragungsexperimente fielen jedoch durch methodische Ungenauigkeiten, wie zum Beispiel die Verwendung von intrazerebraler statt intravenöser Inokulation oder Speziesbarrieren innerhalb der Versuchsanordnung auf (6). Auch waren die Ergebnisse oft nicht reproduzierbar. Durch die Verwendung von Nagetieren als Versuchstiere bestand weiterhin das Problem, dass nur sehr geringe Mengen von infektiösem Material transfundiert werden konnten (16). In einer Versuchsanordnung mit Schafen, bei denen aufgrund der Körpergröße größere Mengen transfundiert werden können, konnte die Übertragbarkeit von Scrapie und BSE durch Transfusion von Vollblut und *buffy coat* Präparaten gezeigt werden (64). Die Übertragung der Krankheiten gelang hier auch mit innerhalb der Inkubationszeit der Krankheiten gewonnenen Spenderpräparaten (67).

Die Übertragung der vCJD von Mensch zu Mensch durch Transfusion gilt inzwischen in drei Fällen als wahrscheinlich. Alle drei Patienten hatten Bluttransfusio-

nen von Spendern, die später an vCJD erkrankten, erhalten und wurden im Rahmen der *national CJD surveillance unit* in Großbritannien beobachtet (80, 93, 130). Alle der transfundierten Erythrozytenkonzentrate waren nicht leukozytenreduziert. Zwei der Empfänger entwickelten eine klinische vCJD. Diese beiden Patienten waren Methionin homozygot am Codon 129 des Prionprotein-Gens. Der dritte Patient verstarb 5 Jahre nach Transfusion eines Erythrozytenkonzentrates an einem rupturierten Aortenaneurysma. In der anschließend durchgeführten Autopsie konnte pathologisches Prion-Protein in Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden. In diesem Fall fand sich am Codon 129 des Prionprotein Gens ein heterozygoter Genotyp. Die Fallberichte können als Beleg für eine Übertragbarkeit der vCJD durch Blut bereits in der präklinischen Phase der Krankheit angesehen werden (57).

2.3 Prionen

Die 1982 erstmalig veröffentlichte Prionenhypothese besagt, dass der Erreger der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien vorwiegend oder ausschließlich aus einem in seiner Konformation veränderten körpereigenen Protein, dem Prionprotein (PrP) besteht (97). Die Umwandlung der normalen zellulären Isoform des Prionproteins (PrP^C) in seine in der Sekundärstruktur veränderte Form, das Scrapie PrP (PrP^{Sc}) stellt nach der Prionhypothese den initialen Faktor für die Entstehung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien dar. PrP^{Sc} ist gemäß dieser Hypothese das übertragbare Agens der TSEs.

Stanley Prusiner gelang es 1982, aus dem Gehirn von mit Scrapie infizierten Hamstern, ein infektiöses Agens, welches ausschließlich aus Protein zu bestehen schien, nachzuweisen (85). Aus dem Gehirnhomogenat der Tiere wurde nach Aufreinigung mit Proteinase K ein 27-30 kDa schweres Protein, das PrP₂₇₋₃₀ isoliert. Sequenzierung des N-terminalen Endes dieses Proteins ermöglichte den Nachweis der entsprechenden Messenger RNA und dadurch die Identifizierung des korespondierenden Gens, welches vom wirtseigenen Genom kodiert wird (88). Das Prionproteinogen (PRNP) ist auch im gesunden Organismus aktiv, es

wird also auch hier Prion-Protein gebildet, ohne eine Erkrankung auszulösen (28). Obwohl sich das zelluläre Prion-Protein in seiner Primärstruktur nicht von der infektiösen Form unterscheidet (113), besitzen beide Proteinformen stark unterschiedliche biochemische und biophysikalische Eigenschaften. Zelluläres PrP ist im Gegensatz zu PrP^{sc} empfindlich gegenüber Proteinase K und löslich in nicht-ionischen Detergentien. Außerdem ist es nie infektiös (88). Durch spektroskopische Strukturanalysen ließen sich deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur der Proteine nachweisen. So besitzt PrP^c einen α -helikalen Anteil von 42% und nur etwa 3% β -Faltblätter. PrP^{sc} dagegen liegt in einer von β -Faltblättern dominierender Struktur vor (91). In dieser Konformationsänderung liegen nach Prusiner die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Proteinformen begründet. Mit dem Überwiegen der β -Struktur verändert sich das Löslichkeitsverhalten von PrP^{sc} und es verliert die Empfindlichkeit gegenüber Proteinase K. Die veränderte Struktur begünstigt außerdem eine Tendenz zur Aggregatbildung. PrP^{sc} lagert sich im Gehirn der betroffenen Individuen ab und führt hier zu den bekannten makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen wie spongiöser Degeneration und Amyloidablagerung (85).

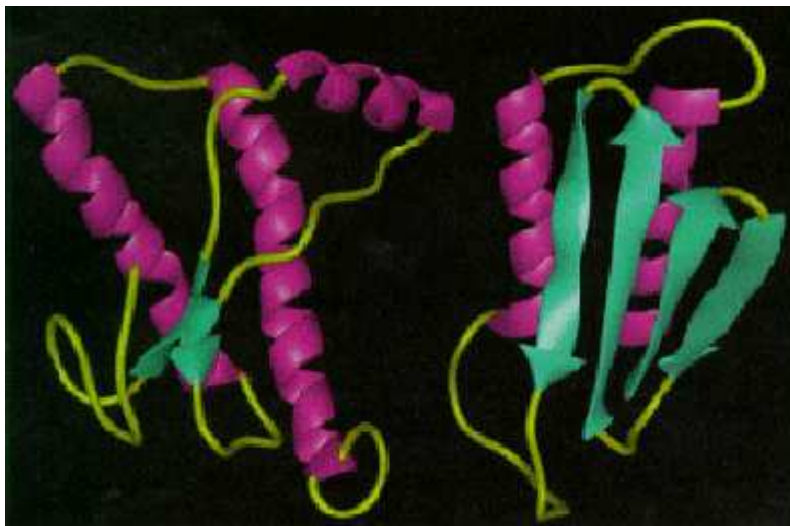


Abbildung 2: Sekundärstruktur von PrP^c (links) und PrP^{sc} (rechts); PrP^{sc} besitzt gegenüber PrP^c eine deutlich ausgeprägte β -Faltblattstruktur (in türkis dargestellt; entnommen aus (31))

Das PRNP lässt sich bei allen untersuchten Säugetieren und auch bei weiter entfernten Arten, wie Vögeln nachweisen. Das Gen weist dabei einen hohen Grad an Homologie auf, so besteht auf Aminosäurenebene unter Primaten eine Übereinstimmung von 93-99% (109). Das PRNP gehört damit zu den hochkonservierten Genen, was auf eine wichtige Funktion des kodierten Proteins hindeutet.

Das PRNP verschiedener untersuchter Spezies ist sehr ähnlich aufgebaut. Das Gen besitzt immer eine relativ einfache Struktur und besteht je nach Spezies aus 2 bis 3 Exons, wobei der proteinkodierende Teil nie durch ein Intron unterbrochen wird (63). Das humane PRNP ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 lokalisiert und besitzt zwei Exons und ein Intron. Der *open reading frame* und damit der gesamte proteinkodierende Teil des Gens liegt auf dem zweiten Exon (101).

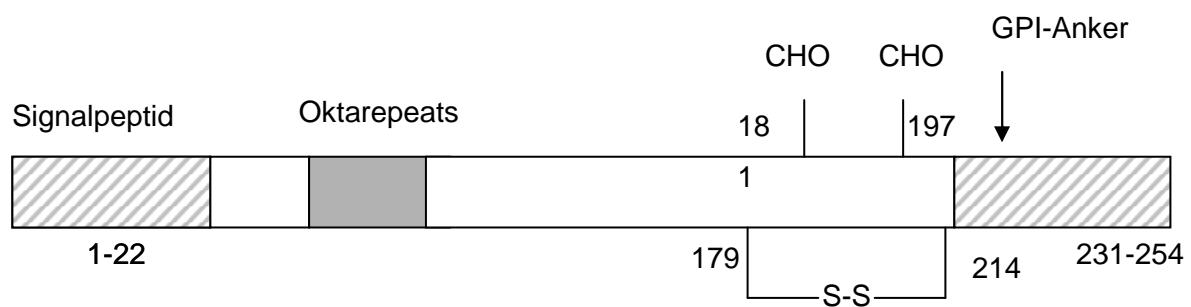


Abbildung 3: Primärstruktur des humanen Prion-Protein Gens; CHO= Glykosylierungsstellen; SS= Disulfidbrücke. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäureposition (modifiziert nach (63)).

Das primäre Translationsprodukt des PRNP, das PrP^c besteht beim Menschen aus 253 Aminosäuren. Am N-terminalen Ende besitzt das humane PrP^c eine 22 Aminosäuren lange Signalsequenz mit deren Hilfe es in das endoplasmatische Retikulum transportiert wird. Hier wird die Signalsequenz abgespalten und das C-terminale Ende des Proteins beim Anhängen eines Glycophosphatidylinositol-(GPI)-Ankers am Serinrest 231 um 23 Aminosäuren verkürzt (114). Im Golgi-

Apparat erfolgen weitere posttranslationale Modifikationen. So wird zwischen Cystein 179 und 214 eine stabilisierende Disulfidbrücke ausgebildet und es kommt zur Glykosylierung von Asparagin an Position 181 und 197. Am N-terminalen Ende befinden sich außerdem in der Aminosäurenregion 51-90 fünf hintereinander liegende, glycin- und prolinreiche Wiederholungssequenzen (Oktarepeats). Das reife PrP^c wird an die Zelloberfläche transportiert und mit Hilfe des GPI-Ankers an der Zellmembran verankert, wo es in cholesterinreichen, caveolae-ähnlichen Regionen vorliegt (116). PrP^c wird vorwiegend an der Oberfläche von Neuronen exprimiert, die höchste Konzentration liegt dabei am synaptischen Spalt vor. Hohe Konzentrationen von PrP^c lassen sich außerdem in lymphatischen Geweben nachweisen. Das Protein wird hier vor allem von follikulärdendritischen Zellen und Lymphozyten exprimiert (83).

Die Konversion von PrP^c zu PrP^{sc} ist vermutlich ein späterer posttranslationeller Prozess. Es ist zum heutigen Zeitpunkt noch unklar in welchem Zellkompartiment diese Umfaltung stattfindet. Diskutiert werden späte endosomale Kompartimente und Lysosomen (5, 77) oder auch die direkte Umfaltung an der Zellmembran (25). Der genaue Mechanismus, der zu dieser Umwandlung führt, ist unbekannt und es existieren verschiedene Modelle zur Erklärung. Die am häufigsten diskutierten Modelle sind das von Prusiner entwickelte Heterodimer- oder Umfaltungsmodell und das Keimbildungs- oder Nukleationsmodell nach Lansbury (36).

Das von Lansbury entwickelte Modell geht davon aus, dass ein natürliches Gleichgewicht zwischen PrP^c und PrP^{sc} besteht. Dabei ist im Normalzustand die PrP^c Form begünstigt. PrP^{sc} Monomere können jedoch zur gegenseitigen Stabilisation Aggregate bilden. Wenn dieses initiale PrP^{sc} Aggregat eine kritische Masse überschreitet und einen so genannten „Kristallisationskeim“ ausbildet, kommt es zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zu Gunsten von PrP^{sc}. Es kommt nun zu einer stetigen Bildung und Anlagerung von weiteren PrP^{sc} Monomeren (24).

Das Heterodimer- oder Umfaltungsmodell nach Prusiner beruht auf der Annahme, dass ein PrP^{sc} Molekül ausreicht, um eine Kettenreaktion in Gang zu bringen und dadurch PrP^c in die infektiöse Form zu konvertieren. Gemäß Prusiner liegt PrP^c im

Gleichgewicht mit einer metastabilen Konformation, dem PrP*. Der Übergang in die metastabile Konformation ist energetisch stark erschwert. PrP* kann jedoch an einen bis heute nicht identifizierten, spezifischen Faktor binden (72). Dieser als Faktor X bezeichnete Faktor stabilisiert den metastabilen Zustand, und ermöglicht es so PrP^{sc} an diesen Komplex zu binden. Durch die Interaktion mit PrP^{sc} wird PrP* ebenfalls in PrP^{sc} umgewandelt. Der Komplex zerfällt und das neu entstandene PrP^{sc} kann nun in einer Kettenreaktion weiteres PrP^c umwandeln. Das initial benötigte PrP^{sc} kann exogen zugeführt werden, zum Beispiel im Rahmen einer Infektion, oder endogen gebildet werden. Hier kann die PrP^{sc} Entstehung durch Mutationen, welche die Struktur des PrP^c destabilisieren, ausgelöst werden. Durch die Einführung von Faktor X als notwendigen Faktor für die Prionen-Replikation, lassen sich auch die in Übertragungsexperimenten beobachteten Speziesbarrieren erklären. Wenn Faktor X als speziesspezifischer Faktor bevorzugt Komplexe mit „eigenen“ Prionen bildet, so kann dadurch die Komplexbildung mit artfremden Prionen erschwert sein (100).

Die genaue Funktion des PrP^c ist bis heute unbekannt. So waren PrP^c Knock-out Mäuse (PrP0/0-Mäuse), also Tiere ohne endogene Prionprotein Expression, phänotypisch unauffällig. Im Vergleich zu normalen Mäusen waren sowohl das Verhalten der Tiere, als auch ihre Lebenszeit normal (23). In weiteren Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass der zirkadiane Rhythmus der PrP 0/0-Mäuse gestört war (118). Nach einer Arbeit von Collinge et al. sind die neuronalen Aktionspotentiale gegenüber denen normaler Mäuse verzögert (34). Dies konnte in späteren Arbeiten jedoch nicht bestätigt werden (79). Aufgrund seiner Fähigkeit, Kupferionen zu binden, könnte PrP^c eine Funktion in der Regulation des Kupferhaushaltes spielen. In Abhängigkeit von der Menge gebundener Kupferionen scheint PrP^c außerdem über eine antioxidative Funktion zu verfügen (13). Weiterhin werden die Funktion als Superoxiddismutase und auch eine mögliche Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion für PrP^c diskutiert (14, 85).

2.4 Prionine

Die Prionintheseorie beruht auf einem die Priontheorie ergänzenden und weiterführenden Ansatz. Prionine sind nach dieser Hypothese das antigen wirkende Proteinprodukt eines alternativen, im Bereich des Prionprotein-Gens lokalisierten Gens. Die Expression dieses Gens ist nach der Prionin-Hypothese der initiale, krankheitsauslösende Faktor für transmissible spongiforme Enzephalopathien. Die gebildeten Prionine können sich an vorhandenes PrP^C anlagern, und so die Konformationsänderung zu PrP^{Sc} bewirken.

Mit Hilfe computergestützter Analysen lässt sich im offenen Leserahmen des Prion-Gens verschiedener untersuchter Spezies ein komplettes inneres Gen mit Regulations- und Transkriptionssequenzen nachweisen. Gemäß der Prionintheseorie bewirkt eine *frameshift* Mutation im Prion-Gen die Expression dieses alternativen Gens. Als auslösende Ursache hierfür werden Spontanmutationen, virale oder bakterielle Infekte, Umwelttoxine oder auch die Anwesenheit von Fremdprioninen postuliert.

Prionine besitzen spezifische antigene Sequenzen, die die Unterscheidung zwischen Prioninen verschiedener Spezies ermöglichen. Nach ihrer Herkunft und der vermuteten Assoziation mit Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien werden Schaf-Prionine als *scrapie associated prionin* (SCRAPAS), Rinder-Prionine als *bovine spongiform encephalopathy associated prionin* (BSAS) und menschliche Prionine als *Creutzfeldt-Jakob associated prionin* (CJAS) bezeichnet. Prionine rufen im Gegensatz zur fehlgefalteten Prion-Protein Form eine Immunantwort des betroffenen Organismus hervor, da sie als normalerweise nicht gebildetes Protein vom Immunsystem nicht als körpereigen erkannt werden. Die bei Kontakt mit Prioninen gebildeten Antikörper richten sich gegen die spezifischen antigenen Sequenzen der verschiedenen Prionin Epitope. Da diese Antikörper schon sehr früh als Reaktion auf den Kontakt mit Prioninen gebildet werden, können sie als empfindlicher Marker für den Krankheitsverlauf genutzt werden.

Aus der Proteinstruktur des Prionin-Proteins lassen sich für das Verständnis der Hypothese wichtige Eigenschaften der Prionine ableiten. So besitzen die Moleküle mit etwa 28% einen hohen Anteil an Tryptophan, welcher stark hydrophobe Eigenschaften bedingt. Die Proteine sind dadurch nur schlecht wasserlöslich, dagegen löslich in Fett und Zellmembranen. In den tryptophanreichen Bereichen besitzen Prionine außerdem eine deutliche β -Faltblattstruktur. Hieraus ergibt sich gemäß der Prionin-Hypothese die Eigenschaft der Prionine, sich an andere Proteine anzulagern, und diesen möglicherweise eine β -Faltblattstruktur aufzuzwingen. Alle untersuchten Prionine besitzen eine repetitive Sequenz von 9 Aminosäuren mit Homologie zur Sequenz des Prionproteins. Dies ist der wahrscheinlichste Bereich für die von der Prionin-Hypothese geforderte Interaktion zwischen Prioninen und Prionen. Der homologe Bereich ist in der α -Struktur des PrP genau dem Bereich gegenüberliegend, an den laut Prusiner Protein X bindet und damit die Umwandlung von PrP^c zu PrP^{sc} katalysiert (72). Außerdem ist er identisch mit der Sequenz, an die im Experiment der rekombinante Antikörper D 18 bindet, und damit die Umwandlung von PrP^c zu PrP^{sc} verhindert (94). Die Prionin-Hypothese geht aufgrund dieser Eigenschaften der Prionine davon aus, dass diese mit Faktor X identisch sind. Der Antikörper D 18 verhindert demnach die Entstehung von PrP^{sc}, indem er sich an Prionine anlagert und damit ihre Bindung an PrP^c verhindert. Weiterhin besitzen Prionine eine Sequenz von 22 Aminosäuren mit großer Homologie zu einem transkriptionsaktivierenden Faktor der Schilddrüse. Dieser Bereich der Proteine kann möglicherweise eine Selbstaktivierung des Prioningens bei Kontakt mit Prioninen bewirken.

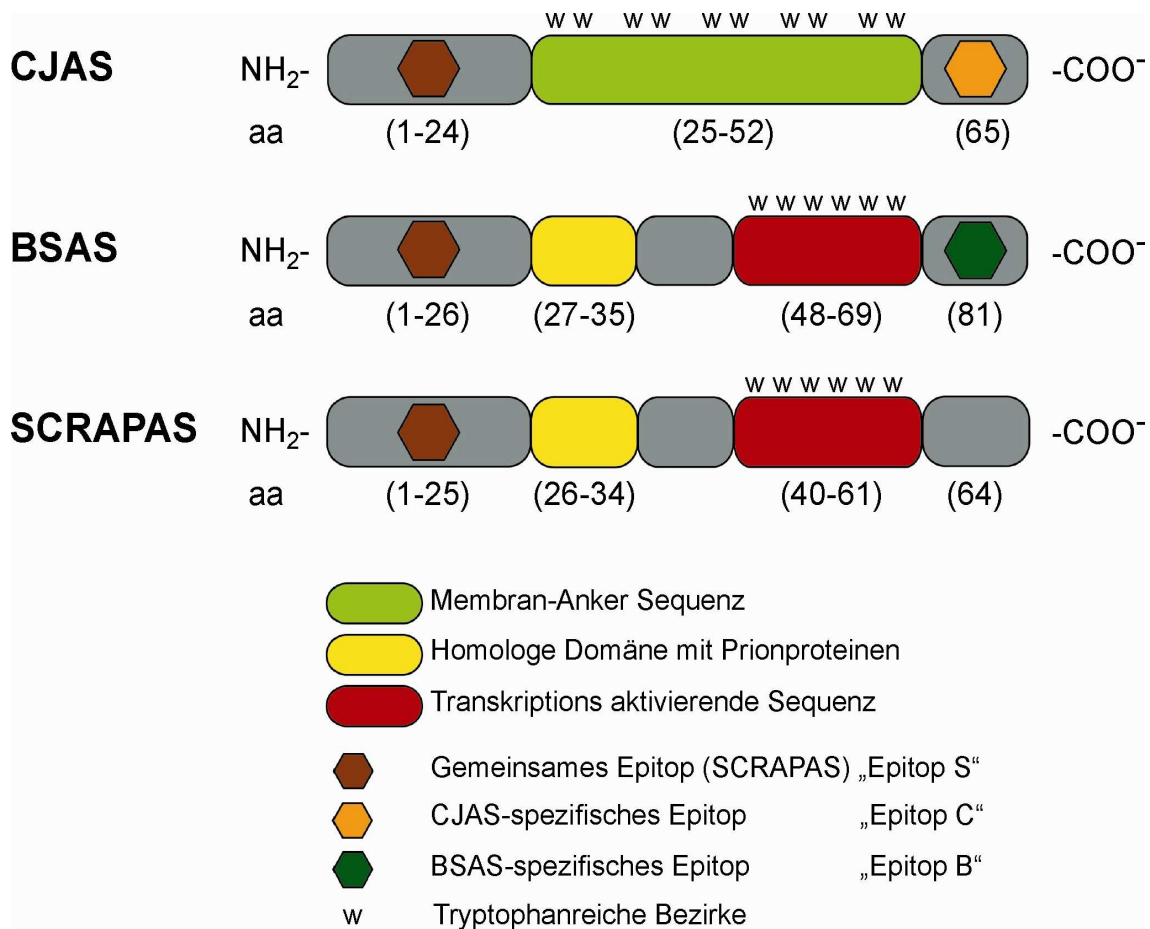


Abbildung 4: Struktur der Prioninepitope

Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in Wasser lassen sich Prionine nur sehr schwer direkt in Körperflüssigkeiten nachweisen. Wie bereits erläutert bildet das Immunsystem jedoch spezifische, gegen die Prionine gerichtete Antikörper. Diese lassen sich mit Hilfe synthetisch hergestellter Prionin-Epitope nachweisen und dienen damit auch als Zielmolekül des in dieser Arbeit verwendeten BSE PlusTM (hc) Tests (Altegen).

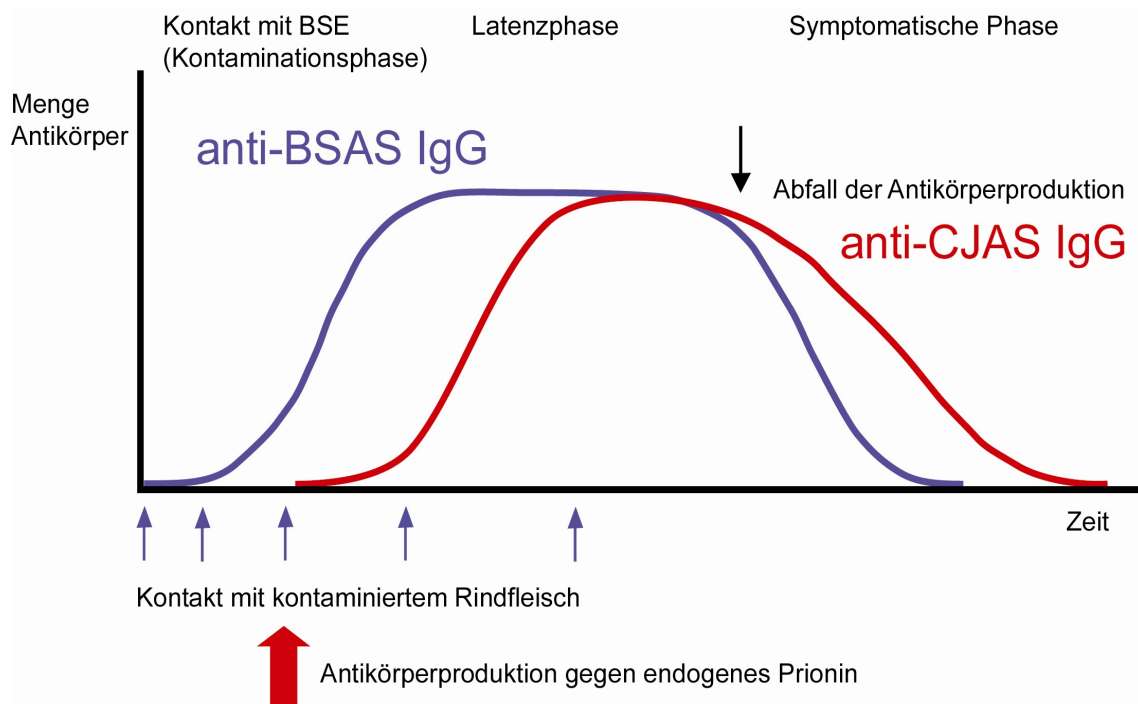


Abbildung 5: Postulierter Verlauf der Antikörperreaktion bei vCJD

An Versuchstieren konnte gezeigt werden, dass anti-prionin Antikörper bereits sehr früh nach dem ersten Kontakt des Organismus mit Prioninen gebildet werden. Diese Antikörper verhindern wahrscheinlich zunächst den Ausbruch der Krankheit und modulieren so die Latenzzeit von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. Der Beginn der symptomatischen Krankheitsphase ist jedoch durch einen Abfall der Antikörperproduktion gekennzeichnet. Somit scheint das Nachlassen der Immunreaktion den Ausbruch der Krankheit zu begünstigen. Im Falle der Infektion des Menschen durch Rinder-Prionine liegen nach der Prionin-Hypothese zunächst Antikörper gegen bovines Prionin (anti-BSAS IgG) vor. Wird durch diese Kontamination die variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit ausgelöst und es kommt zur endogenen Bildung von Prioninen, so lassen sich auch Antikörper gegen humanes Prionin (anti- CJAS IgG) nachweisen.

2.5 *Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)*

Immunoassays sind quantitative analytische Methoden, die die Spezifität der Antigen/Antikörper-Reaktion zum Nachweis von Analyten nutzen. Durch die Markierung eines der Reaktionspartner wird dabei die Empfindlichkeit des Testsystems erhöht. Die ersten zu Beginn der 1960er Jahre entwickelten Assays arbeiteten mit radioaktiven Markierungen, was aufgrund des schwierigen Umgangs mit radioaktivem Material die Anwendbarkeit der Tests stark einschränkte. Als Alternative wurden zu Beginn der 70er Jahre die ersten Enzymimmunoassays (EIA), die enzymmarkierte Antikörper nutzten, entwickelt (87). Die Enzymmarkierung führte zusammen mit der Möglichkeit der Immobilisierung von Antikörpern auf festen Oberflächen zur Etablierung des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit, kombiniert mit hoher Spezifität und Sensivität, gehören ELISAs heute zu den Standardverfahren der medizinischen Analytik (95).

ELISAs werden auch als heterogene Enzymimmunoassays bezeichnet, da sie eine Trennung von gebundenen und ungebundenen Reaktionspartnern erfordern. Es liegt also immer einer der Reaktionspartner in immobilisierter, oberflächengebundener Form vor. Man unterscheidet hierbei zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Verfahren. Beim kompetitiven Testprinzip konkurriert der Analyt mit einem markierten Antigen um eine begrenzte Anzahl von gebundenen Antikörpern (direktes Verfahren) oder mit einem immobilisierten Antigen um einen begrenzten in Lösung vorliegenden, markierten Antikörper (indirektes Verfahren). In beiden Fällen ist die Intensität, der in einem zweiten Schritt durch Zugabe eines Substrates bestimmten Enzymreaktion, umgekehrt proportional zur Menge an Analyt in der untersuchten Probe. Bei nicht-kompetitiven Verfahren liegen Fänger-Antikörper oder Fänger-Antigen im Überschuss an eine feste Phase gebunden vor. Im ersten Inkubationsschritt bindet der in der Probe enthaltene Analyt an den Fänger, andere Proteine der Probe werden durch Waschen entfernt. Im zweiten Schritt wird mit einem markierten Antikörper (Tracer), der mit einer spezifischen Antigenen Domäne (Epitop) des gebundenen Antigens oder Antikörpers reagiert inkubiert. Da der Analyt bei diesen Testsystemen von zwei Schichten umgeben ist,

spricht man auch von „Sandwich-Immunoassays“ oder „Sandwich-ELISAs“ (120). Die Aktivität oder Konzentration des gebundenen Tracers ist hier direkt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Analyten. Testsysteme mit oberflächengebundenen Antikörpern (*capture*-Antikörper) werden auch als *antigen capture assay* bezeichnet. Sie dienen dem Nachweis von spezifischen Antigenen in der Probe. Tests mit gebundenem Fänger-Antigen (*capture*-Antigen) weisen in der Probe enthaltene Antikörper nach, und werden als *antibody capture assay* bezeichnet.

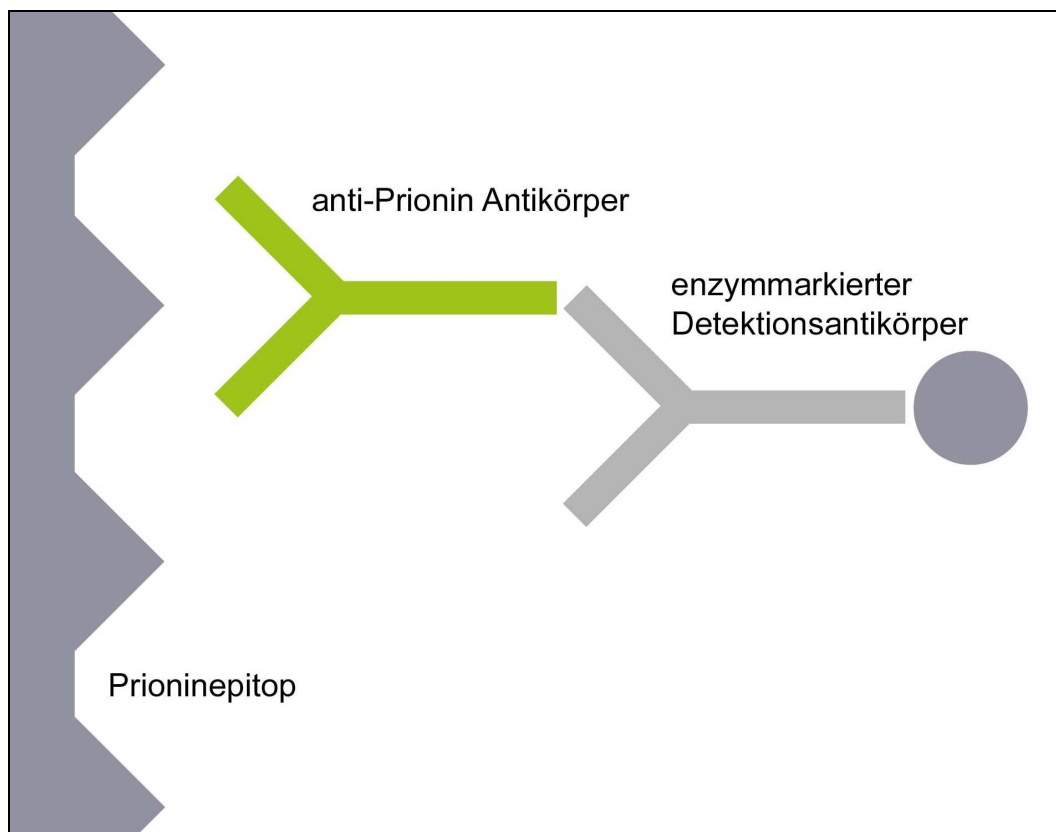


Abbildung 6: Anti-Prionin ELISA

Die direkte Bindung des Fängers an die feste Phase kann zum Verlust von Sensitivität und Spezifität des Testsystems führen. Um dies zu vermeiden, werden Systeme zur indirekten Fixierung verwendet. Beispielhaft hierfür steht die Streptavidin-Biotin-Technologie. Die feste Phase wird mit Streptavidin, einem 60 kD schwerem Protein aus *Streptomyces avidinii*, beschichtet. Das Protein besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin und kann daher leicht biotinbeschichtete Antikörper

oder Antigene binden. Diese Biotinylierung führt zu keiner Veränderung der Eigenschaften von gebundenem Antigen oder Antikörper. Um unspezifische Reaktionen des Analyten mit der festen Phase zu vermeiden, wird diese nach dem coating mit kleineren Proteinen abgesättigt. Hierfür kann zum Beispiel Rinderse- rumalbumin verwendet werden.

Zur Markierung des Tracers kommen verschiedene Enzyme zum Einsatz. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und ihrer Robustheit gilt die Markierung mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) als Methode der Wahl (95). Für die Indikatorreaktion stehen verschiedene chromogene, fluorogene oder auch luminogene Substanzen zur Verfügung. Aufgrund der einfachen Testauswertung mittels Photometer werden zumeist chromogene Substanzen, wie zum Beispiel Tetramethylbenzidin als Substrat eingesetzt.

Der in dieser Studie verwendete anti-prionin Antikörper Immunoassay ist ein Sandwich ELISA mit oberflächengebundenem Antigen. Durch die Verwendung von drei verschiedenen spezifischen Antigenen können durch das Testsystem Antikörper gegen Schafprionine, bovines Prionin und humanes Prionin nachgewiesen werden. Als Tracer wird ein mit HRP markierter monoklonaler Mausantikörper eingesetzt. Als Substrat in der Indikatorreaktion wird hier das chromogene Substrat OPD verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Blutspenderkollektiv

In die Studie wurden gesunde Blutspender und Blutspenderinnen des Bluttransfusionsdienstes (BTD) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) aufgenommen. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und wurden anhand eines Aufklärungsbogens über Hintergründe und Ziele der Studie informiert. Neben der regulären Einwilligungserklärung des BTD wurde von jedem Probanden eine weitere, studienbezogene schriftliche Einwilligung eingeholt. Die Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg zur Studie lag vor Beginn der Untersuchungen vor.

Alle Probanden erfüllten die Spenderkriterien des BTD sowie die Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) zur Blutspende. Die Auswahl der Blutspender erfolgte zufällig, um ein möglichst breites Spektrum an Probanden in die Studie einzuschließen. Als Kriterien für den Ausschluss aus der Studie galten das Fehlen der unterschriebenen Einwilligungserklärung sowie der spätere Widerruf der Einwilligung durch den Blutspender. Auch Probanden, bei denen die Blutspende abgebrochen werden musste, wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Die Probensammlung erfolgte von Juli 2001 bis März 2002.

3.2 Probenentnahme bei Blutspendern

Die Entnahme von Blutproben erfolgte im Rahmen der regulären Blutspende der Probanden. Hierbei wurde neben den bei jeder Spende routinemäßig entnommenen Proben zur Bestimmung von infektionsserologischen, hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern noch eine zusätzliche Serum-Monovette[®] (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zur Durchführung des BSE-Plus[™] (hc) Tests (Altegen) abgenommen. Venenpunktion, Überwachung der Blutspende und Ent-

nahme der Probenröhrchen wurde vom Personal des BTB durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte zum Ende der Blutspende direkt nach dem Abklemmen des gefüllten Blutbeutels aus dem noch in der Vene des Spenders liegenden Ende des Entnahmeschlauchsystems.

3.3 Probenaufbereitung

Zur weiteren Verwendung wurden die gesammelten Proben möglichst schnell der Aufbereitung zugeführt. Die Probenröhrchen wurden zur Serumgewinnung bei 2800 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde mittels Pasteur-Pipetten (Rudolf Ranke Labortechnik, Hamburg, Deutschland) abpipettiert und in Cryotube[®]-Röhrchen (NalgeNunc International, Wiesbaden, Deutschland) umgefüllt. Jede Probe wurde dabei in 5 Aliquots von jeweils etwa 1 ml aufgeteilt. Die so gewonnenen Proben wurden bei einer Temperatur von -20°C tiefgefroren und aufbewahrt.

3.4 Laboruntersuchungen bei Blutspendern

Als hämatologische Parameter wurden die Erythrozytenkonzentration (RBC), die Hämoglobinkonzentration (HGB), die Leukozytenkonzentration (WBC), die Konzentration der neutrophilen Granulozyten, die Monozyten-, die Lymphozyten- sowie die Thrombozytenkonzentration bestimmt. Die Messung dieser Differentialblutbilder erfolgte an einem automatischen Analysegerät, dem Cell-Dyn 4000[®] (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Hierbei galten die in Tabelle 3 dargestellten Richtwerte.

Tabelle 3: Referenzbereiche für hämatologische Parameter bei Blutspendern

	Männer	Frauen
Hämoglobin (g/dl)	13,5-18,0	13,0-16,0
Erythrozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	4,2-6,0	3,5-5,2
Leukozyten gesamt ($10^3/\mu\text{l}$)	3,5-10,0	
Neutrophile ($10^3/\mu\text{l}$)	1,5-6,9	
Monozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	0,0-0,9	
Lymphozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	0,6-3,4	
Thrombozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	140-440	

3.5 Patientenkollektiv

In die Studie wurden ferner Patienten der neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aufgenommen, bei denen im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes eine Untersuchung von Blut- und Liquorproben im Liquorlabor der Klinik erfolgte. Alle Patienten nahmen freiwillig an der Studie teil und wurden anhand eines Merkblattes über die Studie aufgeklärt. Von jedem Patienten wurde eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie eingeholt. Als Ausschluss- Kriterien galten das Fehlen der unterschriebenen Einwilligungserklärung oder der Rückzug der Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

3.6 Probenentnahme bei Patienten

Blut- und Liquorproben wurden durch die die Patienten betreuenden Ärzte abgenommen. Die Entnahme der Proben erfolgte möglichst zeitnah, um einen Vergleich zwischen Serum und Liquorkonzentrationen zu ermöglichen. Die Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte in eine Serum-Monovette[®] (Sarstedt).

Die Liquorproben wurden durch Punktion des Spinalkanals gewonnen und so schnell wie möglich der weiteren Auswertung im Liquorlabor zugeführt.

3.7 Liquordiagnostik bei Patienten

Die Untersuchung der Liquorparameter erfolgte im Liquorlabor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Als Globalparameter gelangten dabei die Glukose- und Laktatkonzentration im Liquor, die Liquorzellzahl, das Gesamteiweiß sowie die Albumin und IgG-Konzentration zur Auswertung. Weiterhin wurden die Liquor/Serum-Quotienten von Albumin und der Immunglobuline IgG, IgM und IgA als Marker für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke berechnet und in ReiberSchemata aufgetragen. Bei 5 Patienten wurde außerdem die Neuronenspezifische Enolase (NSE) als Marker für den Untergang von Nervenzellgewebe bestimmt. Die für die Beurteilung der Liquorparameter notwendige Bestimmung von Glukose, Gesamtprotein, Albumin und Immunglobulinen im Serum wurde vom Zentrallabor der Klinik durchgeführt.

3.7.1.1 Glukose im Liquor

Die Ermittlung der Liquorglukosekonzentration erfolgte als quantitative Bestimmung mittels der als Referenzmethode geltenden Hexokinase (HK) Methode. Die enzymatische Methode nutzt als enzymatische Methode die durch HK katalysierte Phosphorylierung von Glukose durch ATP. Das hierbei in einer Indikatorreaktion gebildete NADPH ist direkt proportional zur Glukosekonzentration in der Probe. Es wurde das Gluco-quant Glucose/Hk Testkit verwendet (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Als Richtwert galt eine Liquorglukosekonzentration von etwa 50 % der Serumglukosekonzentration, bzw. 320-820 mg/l.

3.7.1.2 Laktat im Liquor

Die Bestimmung der Laktatkonzentration im Liquor erfolgte mittels enzymatischer Bestimmungsmethode. Der hierfür verwendete L-Milchsäure UV-Test (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) nutzt die Oxidierung von Laktat zu Pyruvat und NADH durch das Enzym Laktatdehydrogenase unter Anwesenheit von NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid). Die während der Indikatorreaktion gebildete NADH Menge ist äquivalent zur Laktatkonzentration in der Liquorprobe und wurde photometrisch bestimmt. Als Referenzbereich galt hier eine Laktatkonzentration von 1,2-2,1 mmol/L.

3.7.1.3 Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden zunächst 90 µl Liquor mit 10 µl Samsonscher Lösung verdünnt. Die mikroskopische Auszählung der Zellen erfolgte in der Fuchs-Rosenthal-Kammer. Als Referenzbereich galt eine Zahl von 0-5 Leukozyten/µl.

3.7.1.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, des Albumins und der Immunglobuline im Liquor erfolgte nephelometrisch nach Fällung des Proteins mit Trichloressigsäure (Dosacat[®]-Streulichtphotometer; DOSATEC GmbH; München; Deutschland). Für die Funktionsbeurteilung der Blut-Hirn-Schranke wurde der Liquor-Serum-Quotient der Albuminkonzentration (Q_{Alb}) berechnet:

$$Q_{Alb} = \text{Albumin (Liquor)} / \text{Albumin (Serum)} \times 10^3$$

Der Referenzbereich des Albuminquotienten ist aufgrund unterschiedlicher Liquorproduktion altersabhängig. Werte von $\leq 6,5$ im Alter von 15 bis 40 Jahren und ≤ 8 bei über 40 jährigen gelten als physiologisch.

Die Quotienten für IgG, IgM und IgA wurden nach demselben Schema berechnet. Zur weiteren Analyse wurden die errechneten Quotienten in Reiberdiagrammen graphisch dargestellt. Reiberschemata stellen Liquorproteinprofile anhand von hyperbolen Verlaufskurven dar. Durch Auftragung der Immunglobulinquotienten gegen den Albuminquotienten als Kenngröße für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen es die Diagramme Schrankenstörungen und intrathekale Immunglobulinsynthesen darzustellen.

3.7.1.5 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Die NSE wurde mittels eines Elektrochemielumineszenz-Immunoassays bestimmt. Für den verwendeten NSE Elecsys Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) galten 0 bis 3 ng/ml als Referenzbereich für NSE im Liquor. Der Referenzbereich für NSE im Serum lag bei 0 bis 15,2 ng/ml.

3.8 BSE PlusTM (hc)-Test

Das verwendete BSE PlusTM (hc) Testkit (Altegen Inc., Wilmington, USA) besteht pro Set aus zwei Mikrotiterplatten mit je 96 Vertiefungen. Pro Platte sind jeweils 32 Vertiefungen mit dem BSAS, dem SCRAPAS oder dem CJAS Epitop beschichtet. Die jeweilige Beschichtung ist anhand einer Farbkodierung der Platten erkennbar (BSAS: grün, SCRAPAS: blau, CJAS: rot). Das Testkit enthält außerdem einen Beutel Phosphatpuffer (0,01 M *sodium phosphate buffer*, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20), ausreichend zur Herstellung von 1 L (Liter) ELISA Puffer, zwei Sets SIGMA FASTTM OPD (Orthophenyldiamin) Tabletten (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zur Herstellung der Substrat-Lösung sowie eine positive und eine negative Kontrolle. Die positive Kontroll-Lösung besteht aus Kanninchenserum, von zuvor mit SCRAPAS, BSAS und CJAS immunisierten Tieren. Die negative Kontroll-Lösung besteht aus einem wiederholt negativ getesteten Humanserum. Zur Detektion der gebundenen anti-Prionin Antikörper sind anti-humanes Maus-

IgG, sowie gegen die positive Kontrolle gerichtetes anti-Kaninchen IgG enthalten. Beide Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase markiert.

Bei der Durchführung des Tests wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verfahren. Zur Herstellung der Pufferlösung wurde zunächst ein Beutel Phosphatpuffer in 1 L destilliertem Wasser aufgelöst. Hiermit wurden dann die Vertiefungen der Mikrotiterplatte einmal gewaschen. Nach sorgfältigem Ausklopfen der Waschflüssigkeit wurde jede Vertiefung mit 100 µl ELISA-Puffer befüllt und 1,5 µl der zuvor bei Raumtemperatur (21 °C) aufgetauten Proben hinzupipettiert. Pro Epitop wurde jeweils eine Vertiefung mit 5 µl positiver Kontrolle und eine mit 5 µl negativer Kontrolle befüllt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Im Anschluß wurde die Platte fünfmal mit ELISA-Puffer gewaschen, verbliebene Flüssigkeit wurde ausgeklopft.

Zur Herstellung der Detektionsantikörperlösung wurde der anti-human Antikörper 1:1.000 mit ELISA-Puffer verdünnt. Hierfür wurden für eine Platte 13 µl Antikörperlösung mit 13 ml ELISA-Puffer gemischt. Für die Identifizierung der positiven Kontrollen wurden 30 µl Antikörper mit 70 µl ELISA-Puffer gemischt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden nun je 100 µl der entsprechenden Antikörperlösung pipettiert und die Platten erneut bei 37°C für 30 Min. inkubiert.

Nach dieser Inkubationsphase wurden die Platten fünfmal mit ELISA-Puffer gewaschen und danach ausgeklopft. Zur Herstellung der Substratlösung wurde 1 Set Sigma Fast™ Tabletten in 20 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl dieser Substratlösung befüllt und für mindestens 30 Minuten im Lichtdunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beendigung der während der Inkubation ablaufenden Farbreaktion wurden je 50 µl Stopplösung (1,8 M H₂SO₄) zu den Proben hinzupipettiert.

Die Auswertung des Tests erfolgte photometrisch. Hierfür wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem Behring ELISA-Processor II (Behring Diagnostika, Frankfurt, Deutschland) gemessen. Dabei galten alle Extinktionen über 0,250 OD als positiv.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institute Incorporated, Cary, USA). Der p-Wert wurde mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben errechnet. Dabei galt ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Spenderkollektiv

In die Studie wurden 940 Blutspender des BTD des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eingeschlossen. 420 dieser Blutspender waren Frauen, 520 der Spender Männer. Das Durchschnittsalter der Blutspender betrug 41,2 Jahre. Hierbei war der jüngste Spender 18 Jahre alt, das Alter des ältesten Spenders betrug 69 Jahre (Tabelle4). Das Durchschnittsalter der männlichen Blutspender lag mit 43,1 Jahren leicht über dem der Blutspenderinnen, bei denen das Durchschnittsalter 38,7 Jahre betrug. Bei allen Spendern konnte die Blutspende regulär durchgeführt werden. Alle Blutspender erfüllten die Einschlusskriterien der Studie. Kein Spender zog seine Einwilligung im Verlauf der Studie zurück. Tabelle 6 zeigt die nach dem Geschlecht aufgegliederte Altersverteilung des Spenderkollektivs.

Tabelle 4: Spenderkollektiv nach Alter und Geschlecht

	Anzahl Spender	Alter in Jahren	Durchschnittsalter In Jahren
weiblich	420	18 bis 69	38,7
männlich	520	19 bis 69	43,1
gesamt	940		41,1

4.2 Hämatologische Parameter

Bei allen Probanden wurde die im Rahmen der Blutspende vorgeschriebene routinemäßige Kontrolle der hämatologischen Parameter durchgeführt. Die Variationsbreite der hämatologischen Parameter ist mit Mittelwert und Standardabweichung

(SD) in Tabelle 7 für Frauen und in Tabelle 8 für Männer dargestellt. 86 % der gemessenen Werte lagen innerhalb der Referenzbereiche des BTB.

Tabelle 5: Variationsbreite der hämatologischen Parameter bei Blutspenderinnen

	Minimum	Maximum	Mittelwert ± Standartabweichung
Hb (g/dl)	10,09	16,1	13,01 ±0,83
Ery (x 10 ⁶ /μl)	3,41	5,46	4,31 ±0,33
WBC (x 10 ³ /μl)	2,94	14,30	5,75 ±1,58
Neutro (x 10 ³ /μl)	1,21	11,60	3,36 ±0,47
Lympho (x 10 ³ /μl)	0,83	3,60	1,79 ±1,05
Mono (x10 ³ /μl)	0,13	1,07	0,40 ±0,13
Plt (x10 ³ /μl)	82,90	486,00	256,90 ±53,40

Tabelle 6: Variationsbreite der hämatologischen Parameter bei Blutspendern

	Minimum	Maximum	Mittelwert ± Standartabweichung
Hb (g/dl)	11,01	17,60	14,48 ±1,02
Ery (x 10 ⁶ /μl)	3,81	5,87	4,76 ±0,35
WBC (x 10 ³ /μl)	2,96	11,90	5,45 ±1,39
Neutro (x 10 ³ /μl)	1,39	8,01	3,16 ±1,06
Lympho (x 10 ³ /μl)	0,71	3,71	1,66 ±0,48
Mono (x 10 ³ /μl)	0,17	1,12	0,44 ±0,13
Plt (x 10 ³ /μl)	70,60	556,00	233,60 ±52,40

4.2.1 Hämoglobinkonzentration

Die bei den Blutspendern gemessene Hämoglobinkonzentration betrug im Mittel 13,82 g/dl \pm 1,19 SD. Bei Blutspenderinnen betrug der Mittelwert 13,01 g/dl \pm 0,83 SD. Männliche Spender erreichten im Mittel einen Hb-Wert von 14,48 g/dl \pm 1,02 SD. 69 Blutspender unterschritten den unteren Grenzwert des Referenzbereiches. 61 dieser Spender waren Frauen. Der obere Grenzwert des Referenzbereichs wurde von keinem Spender überschritten.

4.2.2 Erythrozytenzahl

Die Erythrozytenzahl der Blutspender lag im Mittel bei $4,56 \times 10^3 \pm 0,41$ SD. Der Mittelwert bei Blutspenderinnen betrug $4,31 \times 10^3 \pm 0,33$ SD. Bei männlichen Spendern betrug der Mittelwert $4,76 \times 10^3 \pm 0,35$ SD. Bei 2 Blutspendern lag die gemessene Erythrozytenzahl unterhalb des Referenzbereichs des BTB. Diese beiden Spender waren Frauen. Bei keinem der Blutspender wurde der obere Referenzbereich überschritten.

4.2.3 Leukozytenzahl und Differentialblutbild

Die Leukozytenzahl betrug im Mittel $5,58 \times 10^3 \pm 1,49$ SD. Bei Blutspenderinnen betrug der Mittelwert $5,75 \times 10^3 \pm 1,58$ SD. Bei männlichen Spendern betrug der Mittelwert $5,45 \times 10^3 \pm 1,39$ SD. Der Referenzbereich des BTB wurde von 12 Spendern überschritten. 4 dieser Spender waren Frauen, 8 Spender Männer. Bei 7 Spendern mit erhöhter Leukozytenzahl ergab die Betrachtung des Differentialblutbildes erhöhte neutrophile Granulozyten. Bei 2 dieser Spender waren parallel die Monozyten erhöht (Tabelle 7). Bei 19 Blutspendern lag die Leukozytenzahl unterhalb des Referenzbereiches. 16 dieser Spender waren Männer, 3 Frauen.

Die Zahl der neutrophilen Granulozyten betrug bei allen Spendern im Mittel $3,25 \times 10^3 \pm 1,16$ SD. Der Mittelwert bei Blutspenderinnen betrug $3,36 \times 10^3 \pm 0,47$ SD. Bei

den männlichen Blutspendern betrug der Mittelwert $3,16 \times 10^3 \pm 1,06$ SD. Bei 8 Blutspendern lagen die gemessenen Werte oberhalb des Referenzbereiches des LTD. 6 dieser Spender waren Männer, 2 Frauen. Der untere Grenzwert des Referenzbereiches wurde von 7 Spendern unterschritten. Hiervon waren 2 Spender Männer, 5 waren Frauen.

Tabelle 7: Blutspender mit erhöhten Leukozytenparametern

Spender	Geschlecht	Leuk (x 10 ³)	Neutro (x10 ³)	Lymph (x 10 ³)	Mono (x 10 ³)	Anamnese
B01	Frau	10,8	6,88	3,17	0,535	leer
VII01	Frau	10,1	6,67	2,12	0,852	Infekt
RII17	Frau	14,1	11,1	1,94	0,816	Infekt
M11	Frau	14,3	11,6	1,55	1,0	leer
I04	Mann	10,1	5,74	3,37	0,636	leer
U16	Mann	10,2	6,86	2,40	0,565	leer
HII09	Mann	10,1	6,52	2,80	0,569	leer
CII13	Mann	10,6	7,57	2,33	0,542	leer
KII18	Mann	10,5	7,19	2,07	1,12	leer
LII08	Mann	10,5	8,01	3,16	0,633	Infekt
PII19	Mann	10,6	7,91	1,94	0,509	leer
QUI13	Mann	11,5	7,78	1,86	0,534	leer
AIIO8	Frau	9,82	7,34	2,16	0,255	Infekt
BII01	Frau	9,26	6,95	1,68	0,507	leer
XII03	Mann	9,56	7,02	1,82	0,487	Kreuzband- riss
B13	Mann	5,82	1,39	3,71	0,584	Pollenallergie
K17	Frau	8,23	4,06	3,56	0,380	leer
KII16	Frau	8,60	4,58	3,55	0,350	leer
QUI02	Frau	9,69	4,63	3,60	0,631	leer
P14	Mann	7,48	4,71	1,67	1,02	leer
E10	Frau	8,64	4,82	2,64	1,07	leer

Die Lymphozytenzahl betrug bei allen Spendern im Mittel $1,74 \times 10^3 \pm 0,79$ SD. Der Mittelwert bei Blutspenderinnen betrug $1,79 \times 10^3 \pm 1,05$ SD. Bei den männlichen Blutspendern betrug der Mittelwert $1,66 \times 10^3 \pm 0,48$ SD. Bei 4 Spendern lagen die gemessenen Werte oberhalb des Referenzbereiches des BTD (Tabelle 7). 2 dieser Spender war männlich, 3 Frauen. Kein Blutspender unterschritt den unteren Referenzbereich.

Die Monozytenzahl der Blutspender betrug im Mittel $0,42 \times 10^3 \pm 0,13$ SD. Der Mittelwert bei Blutspenderinnen betrug $0,40 \times 10^3 \pm 0,13$ SD. Bei männlichen Blutspendern betrug der Mittelwert $0,44 \times 10^3 \pm 0,13$ SD. 4 Blutspender überschritten den Referenzbereich des BTD. Davon waren je 2 Männer und 2 Frauen (Tabelle 7). Kein Blutspender unterschritt den unteren Referenzbereich.

4.2.4 Thrombozytenzahl

Bei 6 Spendern konnte die Thrombozytenzahl aufgrund eines Defektes des Analysegerätes nicht bestimmt werden. Bei den Spendern bei denen die Messung ordnungsgemäß durchgeführt werden konnte betrug der Mittelwert $244,00 \times 10^3 \pm 54,10$ SD. Der Mittelwert bei Blutspenderinnen betrug $256,90 \times 10^3 \pm 53,40$ SD. Bei männlichen Blutspendern betrug der Mittelwert $233,60 \times 10^3 \pm 52,40$ SD. 2 Spender überschritten den Referenzbereich des BTD. Einer dieser Spender war weiblich, einer männlich. Der untere Grenzwert des Referenzbereiches wurde von 6 Spendern unterschritten. 5 dieser Spender waren Männer, einer weiblich.

4.3 BSE PLUS™ (hc)-Test

Alle Spenderproben wurden auf Antikörper gegen die drei Prionin-Epitope CJAS, BSAS und SCRAPAS hin untersucht. Als Inkubationszeiten wurden dabei 30 Minuten (Min.), 45 Min. und 90 Min. gewählt. Alle Proben wurden bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Es konnte für keine der untersuchten Proben ein

positives Testergebnis nachgewiesen werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse nach Epitopen getrennt dargestellt.

4.3.1 CJAS-Epitop

Die für CJAS-Antikörper gemessene Extinktion der Spenderproben lag im Mittel bei 0,043 OD \pm 0,027 SD. Die niedrigste gemessene Extinktion betrug 0,002 OD, die höchste 0,218 OD. Eine Probe erreichte bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten eine Extinktion von 0,260 OD. Bei der daraufhin durchgeführten Kontrollmessung ergab sich bei selber Inkubationszeit eine Extinktion von 0,042 OD. Die Messung einer zweiten von diesem Spender eingefrorenen Probe ergab die Extinktion von 0,029 OD. Die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Extinktionen für anti-CJAS zeigt Abbildung 5.

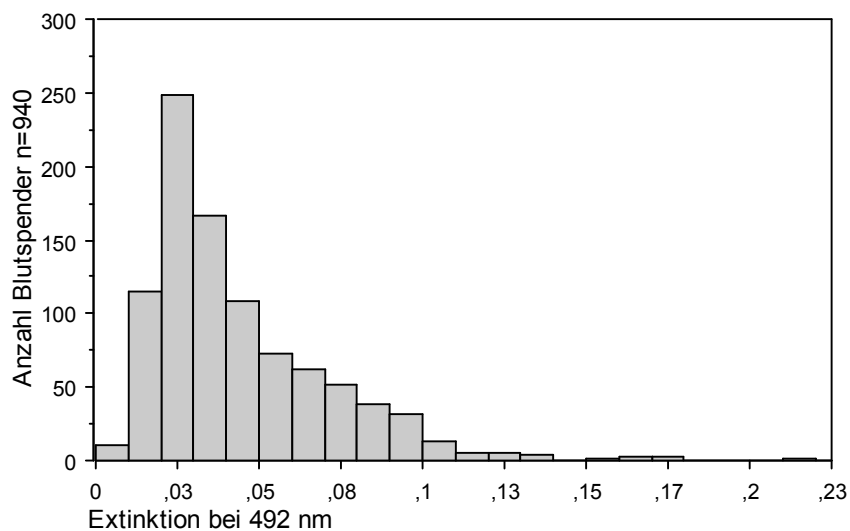


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für CJAS-AK gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern

Abbildung 8 zeigt die Extinktion für CJAS-AK getrennt nach Geschlecht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben männlicher und denen weiblicher

cher Blutspender gezeigt werden. Bei Frauen betrug die Extinktion im Mittel 0,045 OD \pm 0,028 SD, bei Männern lag der Mittelwert bei 0,042 OD \pm 0,026 SD.

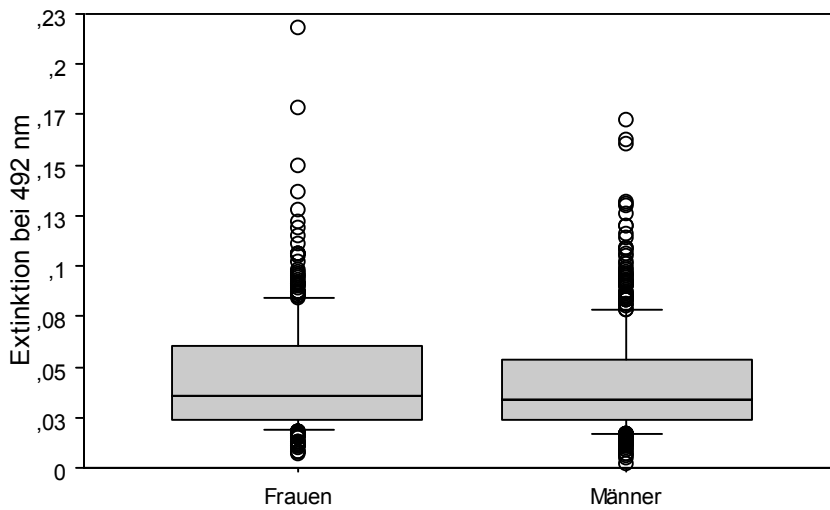


Abbildung 8: Extinktion für CJAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht

Es zeigte sich jedoch eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Höhe der Extinktion und der Inkubationszeit der Proben ($p \leq 0,05$).

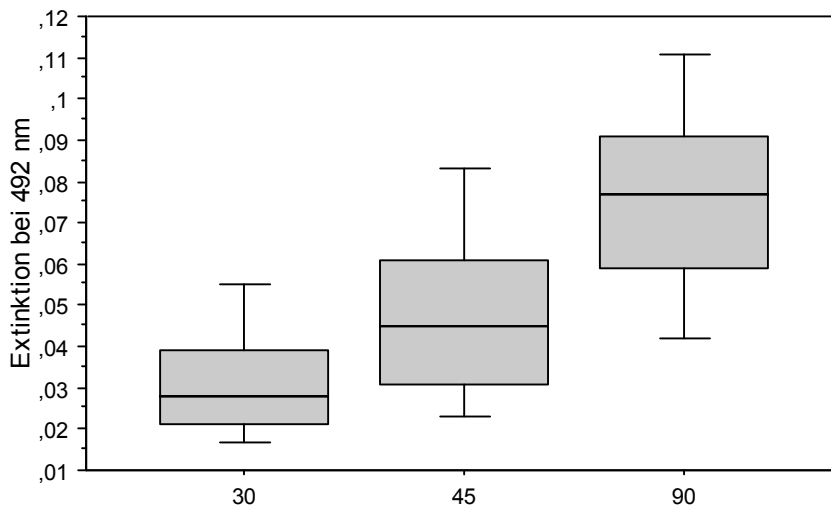


Abbildung 9: Extinktion für CJAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten

So lag die Extinktion bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Mittel bei 0,032 OD \pm 0,016 SD, das gemessene Maximum betrug hier 0,111 OD. Bei einer Inkuba-

tionszeit von 45 Minuten lag die mittlere Extinktion bei $0,0049 \text{ OD} \pm 0,023 \text{ SD}$, das Maximum betrug $0,150 \text{ OD}$. Bei der längsten Inkubationszeit von 90 Minuten betrug die Extinktion im Mittel $0,077 \pm 0,031 \text{ SD}$. Der höchste gemessene Extinktionswert betrug hier $0,218 \text{ OD}$. Von den Proben, bei denen eine Extinktion von $0,1 \text{ OD}$ und mehr gemessen wurde, waren $87,88\%$ über 90 Minuten inkubiert worden. Bei einer Inkubationszeit von 45 und 30 Minuten lagen je 2 Proben oberhalb der Extinktion von $0,1 \text{ OD}$.

4.3.2 BSAS-Epitop

Die für BSAS-Antikörper gemessene Extinktion der Spenderproben lag im Mittel bei $0,042 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$. Die niedrigste gemessene Extinktion betrug $0,004 \text{ OD}$, die höchste $0,150 \text{ OD}$.

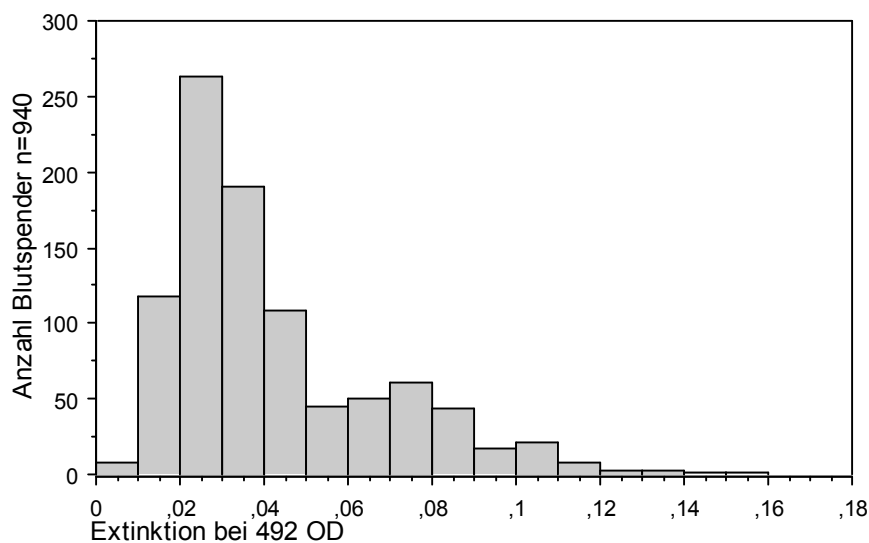


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für BSAS-Antikörper gemessenen Extinktion bei Blutspendern

Auch für BSAS-Antikörper konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Testergebnissen für männliche und weibliche Blutspender festgestellt werden. Bei Frauen lag die mittlere Extinktion bei $0,043 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$, bei den männlichen Probanden betrug der Mittelwert $0,040 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$ (Abbildung 11).

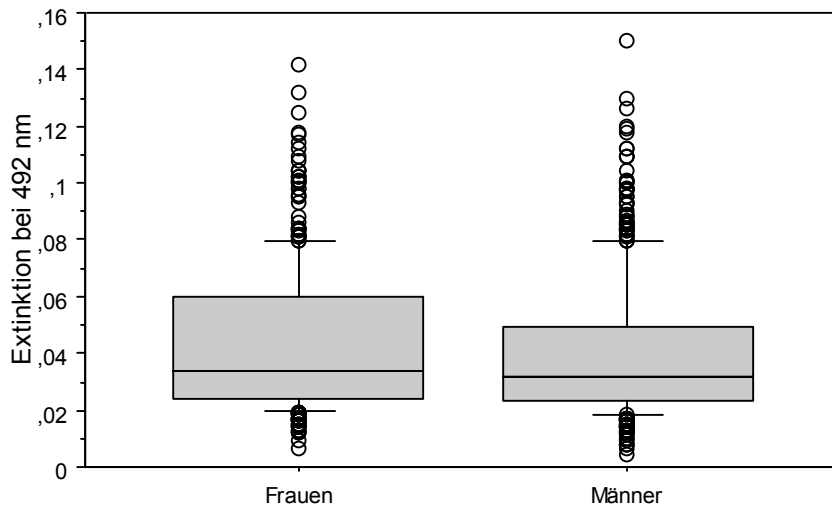


Abbildung 11: Extinktion für BSAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht

Der Verlauf der Extinktionswerte zeigte auch für BSAS-AK eine deutliche Abhängigkeit von der Dauer der Inkubationszeit ($p \leq 0,05$).

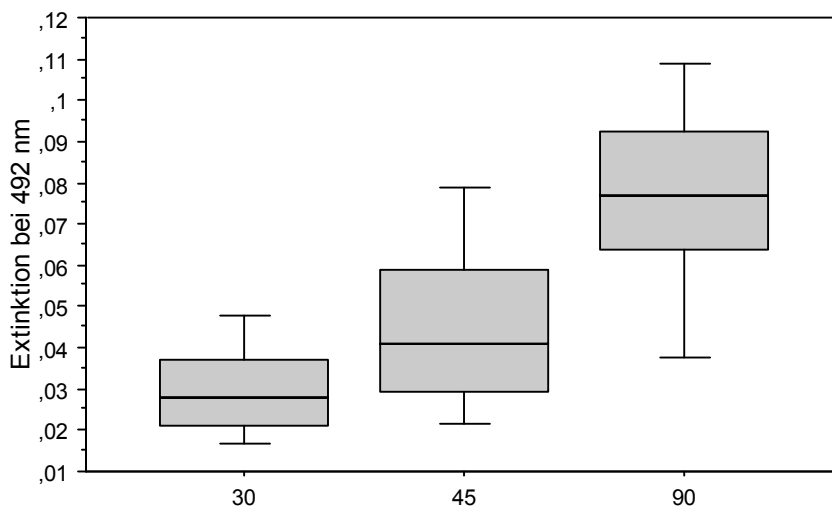


Abbildung 12: Extinktion für BSAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten

Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten betrug die Extinktion im Mittel 0,031 OD $\pm 0,014$ SD, das Maximum lag bei 0,090 OD. Die über 45 Minuten inkubierten Proben erreichten eine mittlere Extinktion von 0,046 $\pm 0,022$ SD, das gemessene Maximum betrug 0,104 OD. Für die über 90 Minuten inkubierten Proben lag der

Mittelwert bei 0,076 OD, das Maximum betrug 0,150 OD. 88,89% der Proben mit einer gemessenen Extinktion von 0,100 OD und mehr waren über eine Zeit von 90 Min inkubiert worden. Bei der Inkubationszeit von 45 Minuten lagen 4 Proben oberhalb der Extinktion von 0,100 OD. Keine der über 30 Minuten inkubierten Proben erreichte die Extinktion von 0,100 OD.

4.3.3 SCRAPAS-Epitop

Die für SCRAPAS-Antikörper gemessene Extinktion lag im Mittel bei 0,036 OD \pm 0,022 SD. Das gemessene Maximum betrug 0,162 OD, der niedrigste gemessene Wert lag bei 0,001 OD. Abbildung 13 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Extinktionswerte.

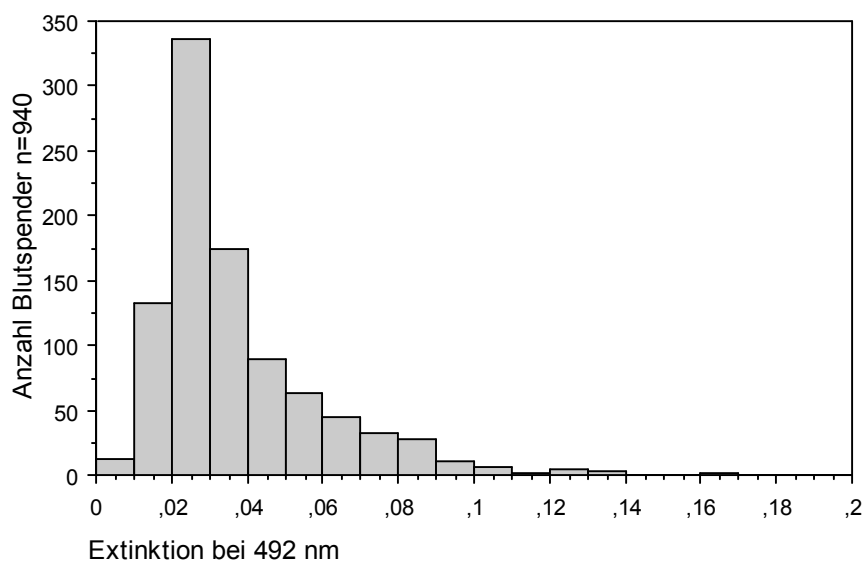


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für SCRAPAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern

Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Extinktionswerten für männliche und weibliche Blutspender festgestellt werden. Bei Frauen betrug die Extinktion im Mittel 0,038 OD \pm 0,022 SD. Bei den männlichen Blutspendern lag der Mittelwert bei 0,035 OD \pm 0,022 SD. Abbildung 14 zeigt die für anti-SCRAPAS Antikörper gemessene Extinktion getrennt nach Geschlechtern.

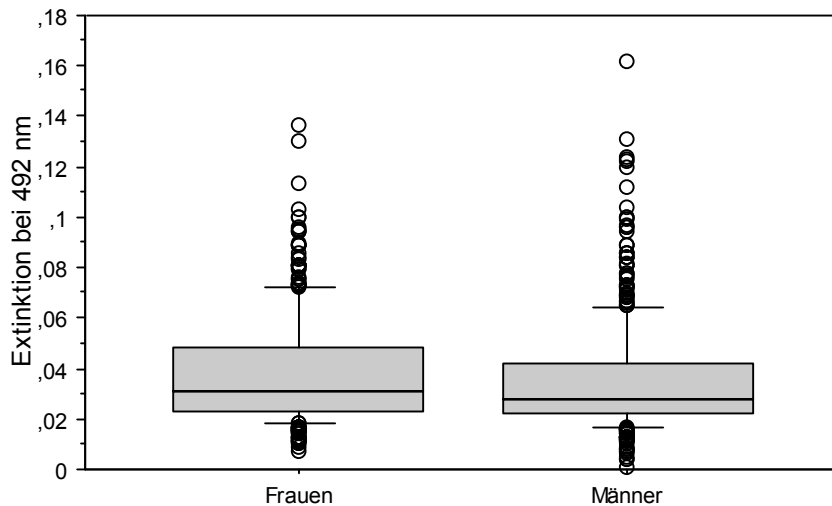


Abbildung 14: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht

Die Abhängigkeit der Extinktionswerte von der Inkubationszeit war auch hier signifikant ($p \leq 0,05$). Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten lag die mittlere Extinktion bei $0,028 \text{ OD} \pm 0,012 \text{ SD}$, das Maximum betrug $0,084 \text{ OD}$. Bei den über 45 Minuten inkubierten Proben betrug der Mittelwert $0,039 \text{ OD} \pm 0,020 \text{ SD}$, die maximal gemessene Extinktion lag hier bei $0,100 \text{ OD}$. Bei der längsten Inkubationszeit von 90 Minuten lag das Extinktionsmittel bei $0,064 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$, der größte gemessene Extinktionswert betrug $0,162 \text{ OD}$ (Abbildung 15). 93,75% der Proben welche eine Extinktion von $0,100 \text{ OD}$ und mehr erreichten waren über eine Zeit von 90 Minuten inkubiert worden. Bei einer Inkubationszeit von 45 Minuten lag 1 Probe oberhalb der Extinktion von $0,100 \text{ OD}$. Keine der über 30 Minuten inkubierten Proben erreichte diesen Wert.

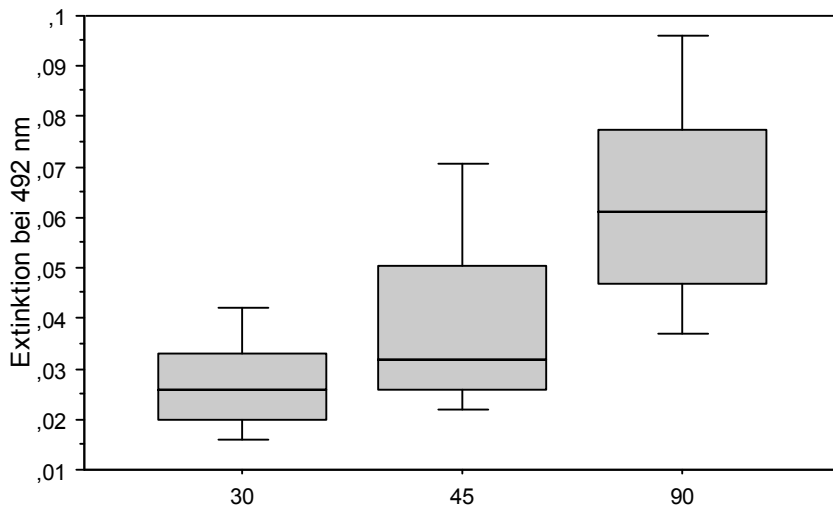


Abbildung 15: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten

4.4 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 16 Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eingeschlossen. Bei allen Patienten wurde im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes eine Liquorpunktion mit Untersuchung der Probe im Liquorlabor der Klinik durchgeführt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 47,8 Jahre. Der älteste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 80 Jahre, der jüngste 18 Jahre alt (Tabelle 8). Keiner der Patienten musste im Verlauf aufgrund des Rückzugs der Einwilligungserklärung aus der Studie ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Patientenkollektiv nach Alter und Geschlecht

	Patientenzahl	Alter in Jahren	Durchschnittsalter
weiblich	6	von 18 bis 80	53,8
männlich	10	Von 25 bis 73	44,2
gesamt	16		47,8

Die Liquoranalytik wurde aus verschiedenen Gründen durchgeführt. Den zahlenmäßig größten Anteil (n=7) am Patientenkollektiv stellen Patienten, bei denen die Analyse zum Ausschluss eines entzündlichen Prozesses im zentralen Nervensystem durchgeführt wurde. 3 Patienten wurden aufgrund einer progredienten Demenz untersucht. Tabelle 9 zeigt das gesamte Patientenkollektiv nach Art der Grunderkrankung.

Tabelle 9: Patientenkollektiv nach Art der Grunderkrankung

Diagnose	Anzahl
V. a. Lymphom	1
Kribbelparästhesien	1
V. a. granulomatösen Prozess	1
V. a. progrediente Demenz	3
Kryptokokkenmeningitis	1
V. a. Borreliose	1
Ausschluss Entzündung	2
bei fokaler Epilepsie	2
bei V. a. organische Psychose	1
bei Myopathie	1
bei motorischer Polyneuropathie	1
Ohne Angabe der Diagnose	1

4.5 Liquoranalytik

4.5.1 Globalparameter

4.5.1.1 Glukose im Liquor

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Liquor wurde bei 12 Patienten (7 Männer, 5 Frauen) durchgeführt. Die mittlere Glukosekonzentration des Liquors betrug 559,17 mg/l \pm 136,88 SD. Der höchste gemessene Wert lag bei 830 mg/l

bei einem Patienten mit motorischer Polyneuropathie, der niedrigste betrug 240 mg/l bei einem Patienten mit Verdacht auf Lymphom. Aufgegliedert nach Geschlechtern betrug der Mittelwert bei Patientinnen 548,00 mg/l \pm 43,24 SD, bei den männlichen Patienten lag der Mittelwert bei 567,14 mg/l \pm 181,45 SD.

4.5.1.2 Laktat im Liquor

Die Bestimmung der Laktatkonzentration im Liquor erfolgte bei 11 Patienten (4 Männer, 7 Frauen). Die mittlere Laktatkonzentration des Liquors betrug 1,71 mmol/l \pm 0,29 SD. Der höchste gemessene Wert betrug 2,30 mmol/l bei einem Patienten mit Kryptokokkenmeningitis, der niedrigste lag bei 1,10 mmol/l bei einem Patienten mit Verdacht auf Borreliose. Alle anderen Werte lagen im Referenzbereich. Der Mittelwert der Laktatkonzentration betrug bei Patientinnen 1,66 mmol/l \pm 0,18 SD, bei den männlichen Patienten lag der Mittelwert bei 1,75 mmol/l \pm 0,37 SD.

4.5.1.3 Gesamteiweiß

Bei allen Patienten erfolgte die Bestimmung des Gesamteiweißes im Liquor. Die mittlere Eiweißkonzentration betrug 495,81 mg/l \pm 229,09 SD. Der höchste gemessene Wert lag bei 1043 mg/l, der niedrigste betrug 293 mg/l. Nach Geschlechtern getrennt betrug der Mittelwert bei Patientinnen 473,33 mg/l \pm 270,22 SD, bei männlichen Patienten 509,30 mg/l \pm 215,33 SD. Der Referenzbereich des Liquorlabors wurde von 4 Patienten und 1 Patientin überschritten.

4.5.1.4 Leukozytenzahl im Liquor

Die Auszählung der Leukozyten im Liquor wurde bei 14 Patienten durchgeführt. Bei einer Patientin und einem Patienten war die Bestimmung aufgrund der zu großen Zeit zwischen Abnahme des Liquors und dem Erreichen des Labors nicht

mehr möglich. Bei 4 Patienten erbrachte die Auszählung erhöhte Leukozytenzahlen im Liquor. Eine Übersicht über diese Patienten gibt Tabelle 10. Bei allen anderen Patienten lagen die Leukozyten im Liquor im Normbereich. Im Mittel lag die Leukozytenzahl hier bei $1/\mu\text{l} \pm 0,94 \text{ SD}$.

Tabelle 10: Patienten mit erhöhten Leukozytenzahlen im Liquor

Diagnose	Geschlecht	Leukozyten/ μl
Kryptokokkenmeningitis	männlich	56
V. a. Lymphom	männlich	118
V.a. granulomatösen Prozess	weiblich	11
ohne Diagnose	weiblich	29

4.6 Serum/Liquor Quotienten

Die Analyse der Liquorproteine mit Hilfe der Reiber-Schemata ergab bei 9 Patienten normale Liquorbefunde. Bei 6 Patienten, 2 Frauen und 4 Männern, zeigte sich eine Störung der Blut/Liquorschranke ohne intrathekale Immunglobulinsynthese (Tabelle 11) Bei einem Patienten mit Kryptokokkenmeningitis bei HIV lag eine Schrankenstörung kombiniert mit einer intrathekalen Immunglobulinsynthese vor.

Tabelle 11: Patienten mit Störung der Blut/Liquorschranke ohne intrathekale Immunglobulinsynthese.

Diagnose	Geschlecht	Alter
V. a. progrediente Demenz	männlich	73
V. a. Lymphom	männlich	30
Motorische PNP	männlich	58
V. a. Enzephalitis	männlich	37
V.a. granulomatösen Prozess	weiblich	17
ohne Diagnose	weiblich	40

4.7 Neuronen spezifische Enolase im Liquor

Die NSE wurde bei 3 Patientinnen und 2 Patienten bestimmt. Bei den Frauen wurde die Bestimmung bei Verdacht auf eine ZNS Entzündung, aufgrund von Kribbelparästhesien und aufgrund des Verdachtes auf progrediente Demenz durchgeführt. Bei beiden männlichen Patienten bestand ebenfalls der Verdacht auf progrediente Demenz. Bei keinem dieser Patienten war die NSE positiv.

4.8 BSE PLUS™ (hc)-Test

Alle Patientenproben wurden auf Antikörper gegen die drei Prionin-Epitope CJAS, BSAS und SCRAPAS hin untersucht. Alle Proben wurden für 45 Minuten inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Dabei konnte für keine der untersuchten Patientenproben ein positives Testergebnis nachgewiesen werden.

4.8.1 CJAS-Epitop

Die für CJAS-Antikörper der Patientenproben gemessene Extinktion betrug im Mittel 0,063 OD \pm 0,012 SD. Die niedrigste gemessene Extinktion betrug 0,047 OD. Das Maximum lag bei 0,086 OD.

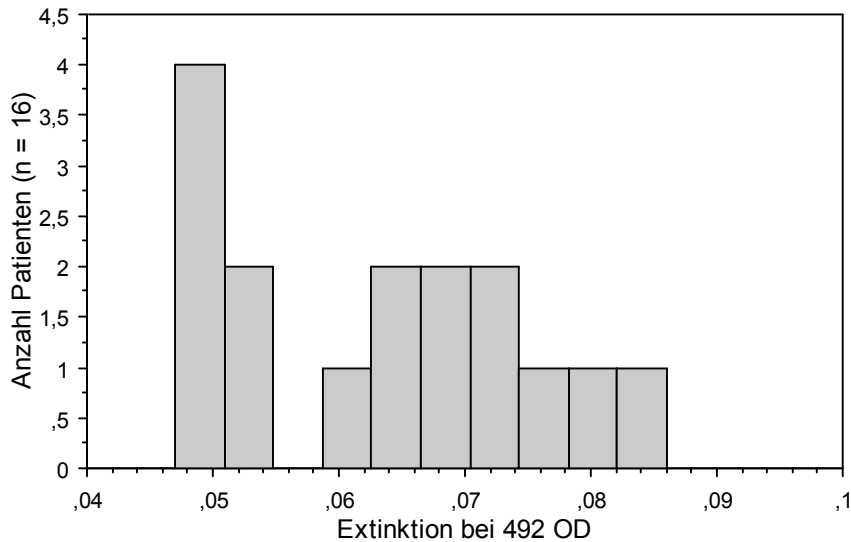


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für CJAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Patienten

Nach Geschlechtern aufgetrennt lag die mittlere Extinktion bei Patientinnen bei 0,061 OD \pm 0,013 SD. Bei Männern betrug sie 0,065 \pm 0,012SD. Hier lag also wie bei den Proben der Blutspender kein signifikanter Unterschied zwischen den Extinktionswerten bei Männern und Frauen vor. Abbildung 17 zeigt die gemessenen Extinktionen nach Geschlechtern getrennt.

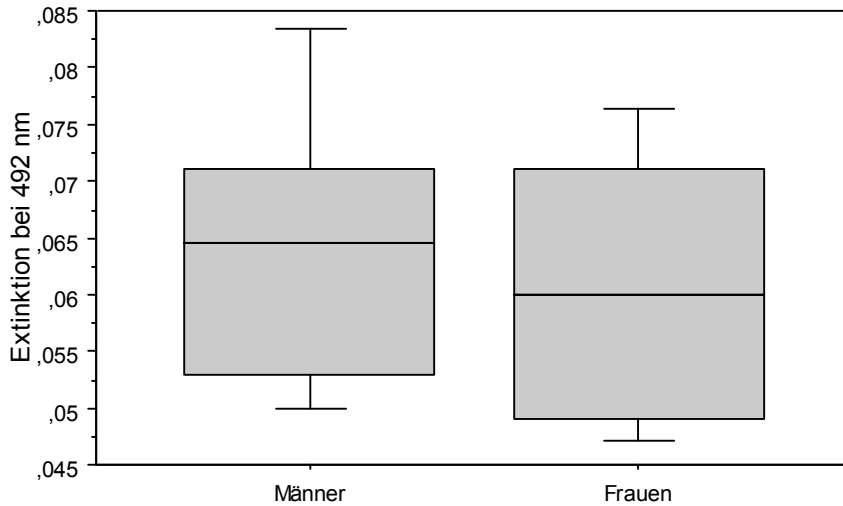


Abbildung 17: Extinktion für CJAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht

4.8.2 BSAS-Epitop

Die mittlere für BSAS-Antikörper gemessene Extinktion betrug $0,058 \pm 0,016$ OD. Die niedrigste gemessene Extinktion betrug $0,038$ OD. Der höchste gemessene Extinktionswert lag bei $0,082$ OD. Keine der gemessenen Patientenproben erreichte eine Extinktion von $0,1$ oder mehr.

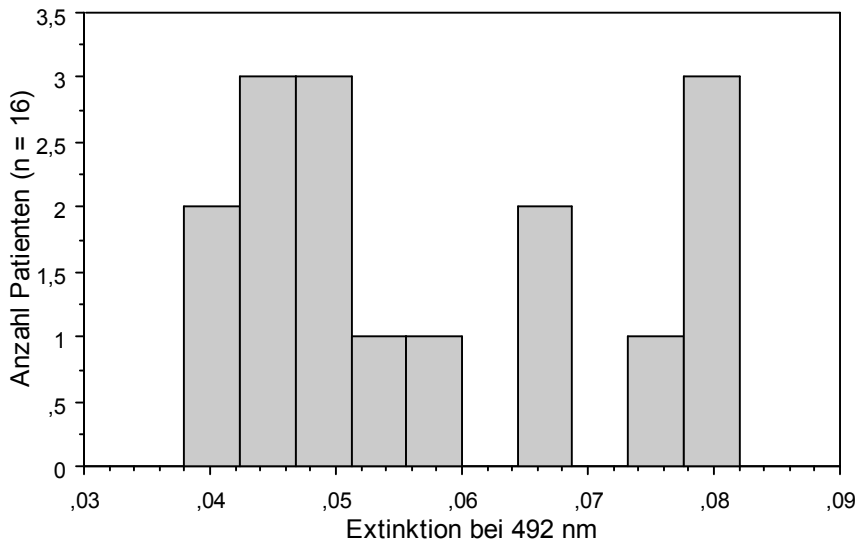


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für BSAS-AK gemessenen Extinktionswerte bei Patienten

Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Testergebnissen für männliche und weibliche Patienten. Bei den Frauen lag die mittlere Extinktion bei 0,055 OD \pm 0,010 SD, bei den männlichen Patienten betrug sie 0,059 OD \pm 0,018 SD. Abbildung 19 zeigt die nach Geschlechtern aufgegliederte Verteilung der Extinktionswerte.

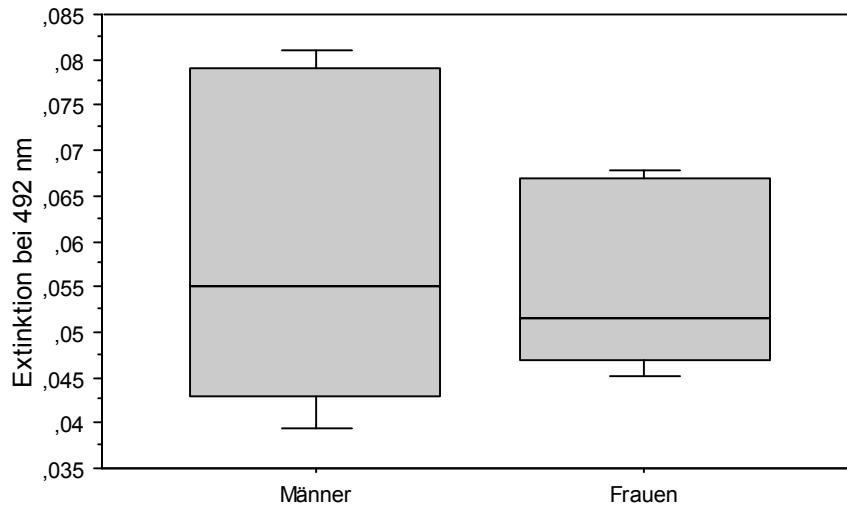


Abbildung 19: Extinktion für BSAS-Antikörper bei Patienten getrennt nach Geschlecht

4.8.3 SCRAPAS-Epitop

Die mittlere für SCRAPAS-Antikörper gemessene Extinktion betrug 0,050 OD \pm 0,111 SD. Der niedrigste gemessenen Extinktionswert lag bei 0,037 OD, der höchste betrug 0,079 OD.

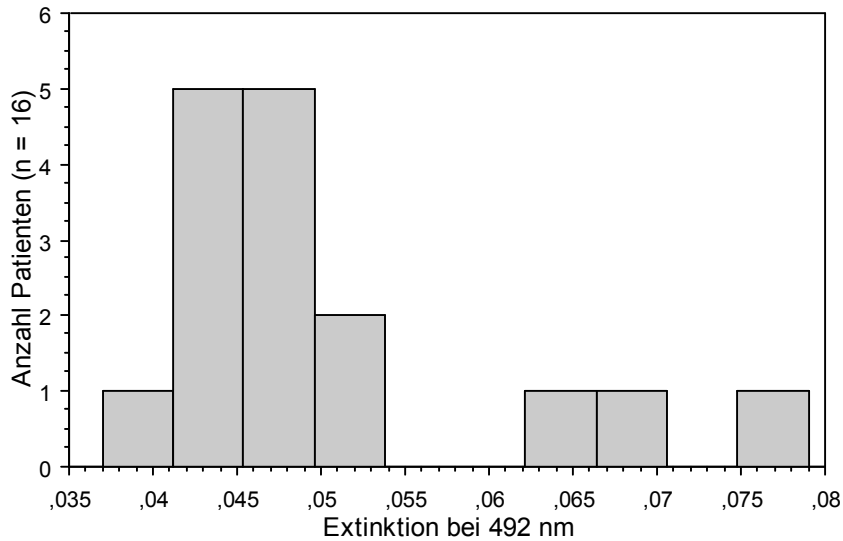


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für SCRAPAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern

Es ergab sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Extinktionswerten bei Männern und Frauen. Bei den Patientinnen betrug der Extinktionsmittelwert 0,049 OD \pm 0,08 SD, bei den Männern lag der Mittelwert bei 0,050 OD \pm 0,013 SD. Abbildung 21 zeigt die Verteilung der Extinktionswerte nach Geschlechtern getrennt.

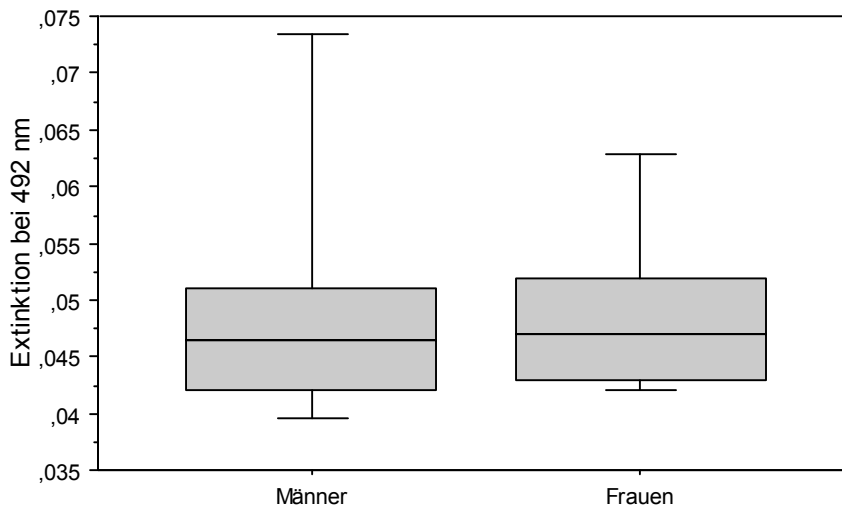


Abbildung 21: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper bei Patienten getrennt nach Geschlecht

4.9 Kontrollen BSE PLUS™ (hc)-Test

4.9.1 Positive Kontrollen

Die positiven Kontrollen lagen mit einer durchschnittlichen Extinktion von 0,414 OD deutlich über den Extinktionswerten von Blutspendern und Patienten. Es erreichten jedoch nur 8 Kontrollen den im Testprotokoll angegebenen Wert von 0,8 OD. Im folgenden sind die Extinktionswerte der positiven Kontrollen nach Epitopen getrennt dargestellt.

Die mittlere Extinktion der positiven Kontrollen für CJAS-Antikörper betrug 0,299 OD \pm 0,139 SD. Die niedrigste Extinktion einer positiven Kontrolle lag bei 0,101 OD, die höchste betrug 0,566. Aufgegliedert nach Inkubationszeiten betrug der Extinktionsmittelwert bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten 0,266 OD \pm 0,108 SD, bei 45 Minuten 0,381 OD \pm 0,132 SD und bei 90 Minuten 0,377 \pm 0,093 SD.

Der Extinktionsmittelwert der positiven Kontrollen für BSAS-Antikörper lag bei 0,576 OD \pm 0,287 SD. Die niedrigste gemessene Extinktion betrug hier 0,201 OD, die höchste 1,198 OD. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten betrug die mittlere Extinktion 0,534 OD \pm 0,269 SD, bei 45 Minuten Inkubationszeit wurde eine mittlere Extinktion von 0,621 OD \pm 0,355 SD erreicht, bei 90 Minuten betrug die mittlere Extinktion 0,752 OD \pm 0,303 SD.

Die positiven Kontrollen für SCRAPAS-Antikörper erreichten einen Mittelwert von 0,368 OD \pm 0,139 SD. Der niedrigste gemessene Extinktionswert betrug 0,125 OD, der höchste 0,758 OD. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten lag die mittlere Extinktion bei 0,359 OD \pm 0,156 SD, bei 45 Minuten Inkubationszeit betrug sie 0,420 OD \pm 0,094 SD. Bei 90 Minuten Inkubationszeit betrug der Extinktionsmittelwert 0,351 OD \pm 0,075 SD.

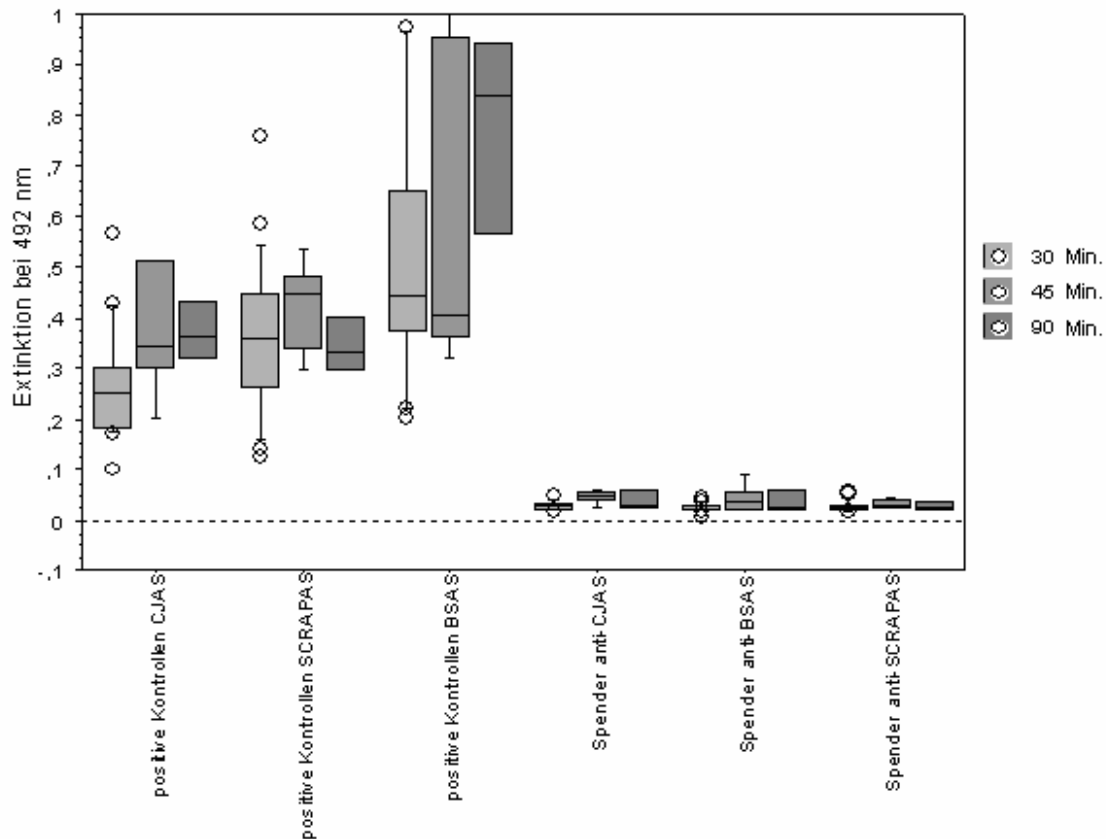


Abbildung 22: Positive Kontrollen und Blutspenderproben getrennt nach Inkubationszeiten

4.9.2 Negative Kontrollen

Die Extinktionswerte der negativen Kontrollen lagen deutlich unter denen der positiven Kontrollen. Die mittlere Extinktion der negativen Kontrollen für anti-CJAS Antikörper betrug $0,054 \text{ OD} \pm 0,023 \text{ SD}$. Der niedrigste gemessene Wert betrug $0,015 \text{ OD}$, der höchste lag bei $0,205 \text{ OD}$. Bei einer Inkubationszeit von 30 Min. betrug der Extinktionsmittelwert $0,053 \text{ OD} \pm 0,022 \text{ SD}$, bei 45 Min. Inkubationszeit lag er bei $0,055 \text{ OD} \pm 0,022 \text{ SD}$, bei 90 Min. betrug er $0,058 \pm 0,033 \text{ SD}$. Für BSAS-Antikörper betrug die mittlere Extinktion der negativen Kontrollen $0,042 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$. Der niedrigste Wert lag bei $0,004 \text{ OD}$, der höchste betrug $0,150 \text{ OD}$. Aufgetrennt nach Inkubationszeiten lag der Mittelwert bei einer Inkubationszeit von 30 Min. bei $0,031 \text{ OD} \pm 0,014 \text{ SD}$, bei 45 Min. betrug er $0,046 \text{ OD} \pm 0,022 \text{ SD}$ und bei

90 Min. Inkubationszeit betrug er $0,076 \text{ OD} \pm 0,026 \text{ SD}$. Die Extinktion der negativen Kontrollen für SCRAPAS-Antikörper betrug im Mittel $0,036 \pm 0,022 \text{ SD}$. Der niedrigste gemessene Extinktionswert betrug $0,001 \text{ OD}$, der höchste $0,162 \text{ OD}$. Bei einer Inkubationszeit von 30 Min. lag die mittlere Extinktion bei $0,028 \text{ OD} \pm 0,012 \text{ SD}$. Bei 45 Min. Inkubationszeit betrug sie $0,039 \text{ OD} \pm 0,020 \text{ SD}$, bei 90 Min. lag die Extinktion bei $0,064 \text{ OD} \pm 0,025 \text{ SD}$.

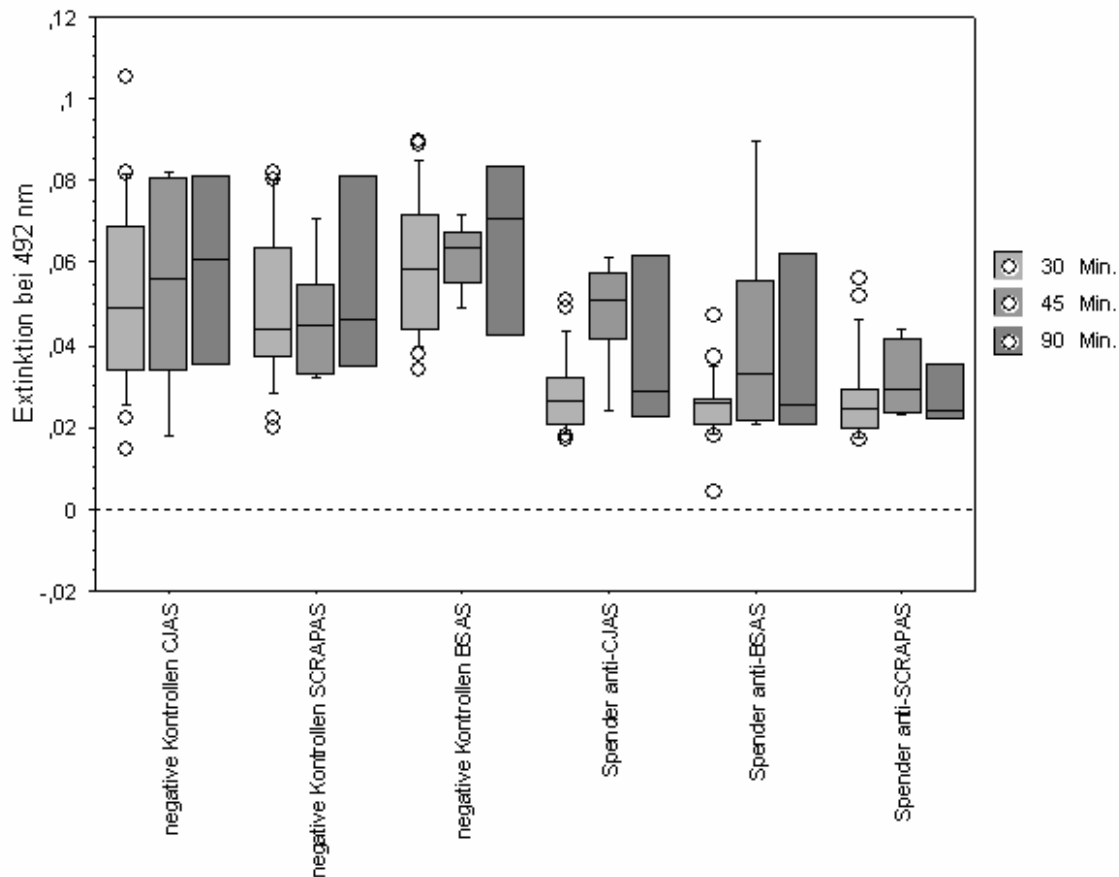


Abbildung 23: Negative Kontrollen und Blutspenderproben getrennt nach Inkubationszeiten

5 Diskussion

5.1 Allgemein

Die variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit ist eine zur Gruppe der spongiformen Enzephalopathien gehörende, immer tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung. Ihren Ursprung hat die 1996 erstmalig beschriebene Krankheit in der Übertragung des Erregers der bovinen spongiformen Enzephalopathie auf den Menschen (127, 58). Bis heute (Stand April 2007) gelten 202 Fälle der Krankheit als bestätigt. Hiervon traten 165 Fälle in Großbritannien auf. Frankreich ist mit bisher 22 bestätigten Fällen das Land mit den nach Großbritannien höchsten Fallzahlen. In anderen Ländern traten bisher nur vereinzelte Fälle auf. Der Großteil dieser Erkrankungsfälle wird auf Infektionen über die Nahrungskette durch kontaminiertes Rindfleisch zurückgeführt (61). Während solche Primärinfektionen heute als weitgehend ausgeschlossen gelten, bleibt trotz geringer Fallzahlen die Möglichkeit von Sekundärinfektionen durch die Übertragung der Krankheit von Mensch zu Mensch weiter bestehen. Dieses Risiko wird insbesondere durch die vermutlich lange Inkubationszeit der vCJD erhöht. Verlaufsbeobachtungen anhand von an Kuru erkrankten Patienten lassen auch für die vCJD eine Inkubationszeit von bis zu 50 Jahren möglich erscheinen (33). Neben kontaminierten chirurgischen Instrumenten, gelten Blut und Blutprodukte als Hauptquellen solcher Übertragungen der Krankheit von Mensch zu Mensch (81, 117). Aufgrund von inzwischen 3 publizierten Fallberichten gilt die Übertragbarkeit der vCJD als weitestgehend belegt (57). In allen 3 Fällen handelt es sich um Patienten, die Bluttransfusionen von Personen die später an vCJD erkrankten erhalten haben. Zwei dieser Patienten erkrankten an der varianten Creutzfeldt-Jakob Krankheit, der dritte Patient verstarb ohne klinische Anzeichen einer neurodegenerativen Erkrankung aufgrund eines rupturierten Aortenaneurysmas. Die Diagnose der vCJD wurde hier histopathologisch gesichert (92, 79, 129). Da dieser dritte Patient im Gegensatz zu allen bisher bekannten Patienten heterozygot für Methionin und Valin am Codon 129 des Prionproteingens war, wird seit dem bekannt werden dieses Falles die Frage diskutiert, ob es trotz der bisher geringen Fallzahlen von klinischer vCJD eine deutlich größere Verbreitung der Krankheit gibt als zuvor angenommen wur-

de. Bisher war in den meisten Szenarien zur Entwicklung der vCJD Fallzahlen davon ausgegangen worden, dass allein Personen mit Methionin-homozygotem Genotyp am Codon 129 des Prionproteingens an vCJD erkranken können (47, 48). Das Vorliegen eines klinisch inapparenten Trägerstatus bei heterozygoten Patienten bedeutet ein deutlich erhöhtes Potential für die Möglichkeit infektiöser Blutspenden (68). Ein weiteres Indiz für eine sich möglicherweise nicht in den aktuellen Fallzahlen widerspiegelnde größere Verbreitung von vCJD gibt eine retrospektive Untersuchung von Tonsillen- und Appendixmaterial, die in Großbritannien durchgeführt wurde. Hierbei wurde in 3 von 12.674 untersuchten Appendixproben pathologisches Prionprotein gefunden. Ausgehend von dieser Stichprobe haben die Autoren eine geschätzte Prävalenz von 337 unerkannten vCJD Infektionen pro Million Einwohner in Großbritannien errechnet (62). Trotz bis heute weltweit niedriger Fallzahlen für klinische vCJD Fälle scheint es somit dringend notwendig, für einen sicheren Schutz vor möglichen Infektionen durch Blut und Blutprodukte zu sorgen.

Um dieses Infektionsrisiko zu minimieren, wurden in Deutschland verschiedene indirekte Schutzmaßnahmen ergriffen. Hierzu gehören die seit dem 01.10.2001 vorgeschriebene Leukozytendepletion und der Ausschluss von Blut- und Plasmaspendern, die sich zum Höhepunkt der BSE-Epidemie länger als 6 Monate in Großbritannien aufgehalten haben (9). Seit März 2005 gilt außerdem der Ausschluss von Blutspendern, bei denen nach dem 01. Januar 1980 eine Operation oder Bluttransfusion in Großbritannien oder Nordirland durchgeführt wurde. Eine sichere Vermeidung von Sekundärinfektionen kann trotz dieses hohen Aufwandes jedoch nicht erreicht werden. So können Personen, die sich innerhalb Deutschlands oder während eines kürzeren Aufenthaltes in Großbritannien durch Rindfleischkonsum mit vCJD infiziert haben, durch eine alleinige Erhebung der Spenderanamnese nicht erfasst werden. Auch der diskutierte Ausschluss von Transfusionsempfängern von der Blutspende würde nach Ansicht von Experten keine deutliche Risikoreduktion bewirken, sondern vielmehr zu einer weiteren Verknappung und Verteuerung von Blut und Blutprodukten durch den Rückgang der Anzahl potentieller Blutspender beitragen (102). Zum sicheren Ausschluss von Sekundärinfektionen fehlt bis heute die Möglichkeit vCJD- Infektionen auch im präklinischen Stadium der Krankheit sicher zu diagnostizieren.

Wir haben in der vorliegenden Studie ein experimentelles Verfahren eingesetzt. Der verwendete Test basiert auf einer von der bekannten Prionen Theorie abweichenden und diese ergänzenden Hypothese und soll dazu in der Lage sein, die vCJD durch den Nachweis von so genannten Prionin-Antikörpern bereits im präklinischen Stadium nachzuweisen. Da der Test auf einem ELISA basiert, kann er möglicherweise die praktischen Anforderungen an ein standardisiert in Blutspendediensten eingesetztes Verfahren erfüllen. Der endgültige Beleg der zugrunde liegenden Hypothese steht zu diesem Zeitpunkt allerdings noch aus.

Aufgrund der Schlüsselposition von kontaminiertem Blut und Blutprodukten für eine sekundäre Ausbreitung der Krankheit, haben wir primär Proben von Blutspendern mit dem BSE (hc) Plus Test auf das Vorhandensein von anti-Prionin Antikörpern hin getestet. Weiterhin wurden Blutproben von 16 Patienten der neurologischen Poliklinik des Universitätsklinikums getestet.

5.2 Bluttests für vCJD

Zur Vermeidung von durch Blut oder Blutprodukte bedingten Sekundärinfektionen ist die Entwicklung eines sicheren Testverfahrens, welches die Identifikation von mit vCJD infizierten Personen bereits in der präklinischen Phase der Krankheit gewährleistet, dringend notwendig (68). Ein solcher Test wäre indirekten Maßnahmen zur Verhinderung von Sekundärinfektionen wie dem oben genannten prophylaktischen Ausschluss von Blutspendern deutlich überlegen (16). Auch kann allein durch die Leukozytendepletion von Blutspenden vermutlich keine so hohe Erregerreduktion bewirkt werden, wie primär angenommen wurde. Cervenakova et al. konnten 2003 zeigen, dass bei mit vCJD infizierten Mäusen annähernd gleiche Infektiositätslevel in Plasma und Leukozytenfraktion bestehen (27). Dies widerspricht vorherigen Annahmen, dass sich etwa 90 % der Infektiosität in der Leukozytenfraktion befinden und somit über die Leukozytendepletion eine wirksame Reduktion des Transmissionsrisikos der vCJD erreicht werden kann (18).

Der routinemäßige Einsatz im Blutspendewesen stellt allerdings spezifische Anforderungen an ein Testsystem. So muss ein solcher Test ohne großen zeitlichen, gerätetechnischen und finanziellen Aufwand in das routinemäßige Spenderscreening integrierbar sein. Außerdem müssen eine ausreichende Sensitivität und Spezifität des Tests und die Möglichkeit eines großen Probendurchsatzes in kurzer Zeit gewährleistet sein (68).

Von der europäischen Kommission wurden verschiedene Testsysteme zur BSE Diagnostik zugelassen (10, 52, 86, 106, 108). Alle diese von der Schlachtindustrie routinemäßig eingesetzten Tests werden *post mortem* an Hirnstamm- oder Rückenmarksgewebe durchgeführt. Ein Nachweis von pathologischem Prionprotein aus Blut ist mit ihnen nicht möglich. Die Tests sind somit nicht für einen Einsatz im Blutspendewesen nutzbar.

Als problematisch für die Entwicklung eines zuverlässigen *ante mortem* Tests haben sich bisher sowohl die niedrige Konzentration von pathologischem Prionprotein in Körperflüssigkeiten, als auch das Fehlen zuverlässiger Surrogatmarker der Infektion erwiesen. Für den direkten Nachweis der vCJD aus menschlichem Blut sind also äußerst sensitive Testsysteme notwendig, die außerdem sicher zwischen pathologischem PrP^{Sc} und der physiologischen zellulären Isoform des Prionproteins unterscheiden können müssen (68).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Entwicklung von Bluttests beschäftigt. So veröffentlichten Schmerr et al. bereits 1999 eine Methode, die durch Kombination von Kapillarelektrophorese und kompetitivem Immunoassay die Sensitivität des Tests erhöhen sollte (110). Die Methode scheiterte jedoch an der Unterscheidung zwischen mit CJD infizierten Schimpansen und gesunden Individuen (26). Ein anderer Ansatz beruht auf einem konformationsspezifischen Immunoassay, der durch den Einsatz hochspezifischer konformationaler Antikörper dazu in der Lage ist, zwischen PrP^{Sc} und physiologischem Prionprotein zu unterscheiden. Publikationen der Arbeitsgruppe von Safar et al. über den Einsatz dieses Prinzips als Bluttest fehlen bisher (105). Andere Arbeitsgruppen versuchen über Anreicherungsschritte die PrP^{Sc} Konzentration in den untersuchten Proben zu erhöhen und so auch die Sensitivität des Testsystems heraufzusetzen. Hierzu

gehört zum Beispiel der Einsatz spezifischer Liganden, die an PrP^{Sc} binden und aufgrund einer speziellen Markierung den Nachweis mit herkömmlichen Testsystemen wie ELISAs oder Western Blot ermöglichen durch die Gruppe von Lane et al. (76). Der bisher am weitesten Entwickelte Testansatz stammt von der Arbeitsgruppe um Claudio Soto. Die Gruppe entwickelte ein System, welches durch die so genannte zyklische Amplifikation (*protein misfolding cyclic amplification*; PMCA) in Proben enthaltenes PrP^{Sc} soweit vermehrt, dass nach Verdauung mit Proteinase K der Nachweis durch Gelelektrophorese möglich ist (104). Hierfür werden Mischungen aus gesunden und infizierten Gehirnhomogenaten erstellt, die daraufhin verschiedene Inkubations- und Sonifikationsschritte durchlaufen. Durch den Einsatz der PMCA Methode gelang es PrP^{Sc} aus dem Blut von mit 263K Scrapie infizierten Hamstern bereits in der präklinischen Phase der Krankheit nachzuweisen (103). Es gelang bisher jedoch nicht, PrP^{Sc} in Gehirnhomogenaten anderer Spezies zu amplifizieren (112). Die Methode stellt durch die verschiedenen Amplifikationsschritte und den direkten Umgang mit infektiösem Material hohe labor-technische Anforderungen. Die notwendigen langen Inkubationszeiten und der anschließende Einsatz von Western Blots zum Nachweis von PrP^{Sc} sind sehr zeitaufwendig und verhindern einen hohen Probendurchsatz in kurzer Zeit. Eine Automatisierung des Systems scheint zum heutigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Auch die Verwendung von Gehirnhomogenat als notwendiges Amplifikationssubstrat und PrP^C-Quelle lässt die Anwendbarkeit des Systems für die antemortem Diagnostik humaner TSEs als fragwürdig erscheinen. So müsste für eine Anwendung des Systems zur Diagnose von vCJD beim Menschen auch menschliches Hirnhomogenat als Substrat zur Verfügung stehen, was aus ethischen Gründen kaum möglich erscheint. Auch steht bisher keine Methode zur Verfügung mit welcher dieses „gesunde“ Hirnhomogenat auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} hin getestet werden kann.

5.2.1 Anti-Prionin ELISA

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete BSE (hc) Plus Test ist ein Sandwich Immunoassay, der durch den Nachweis von anti-Prionin Antikörpern die Diagnose

der vCJD bereits in der präklinischen Phase ermöglichen soll. Gemäß der zugrunde liegenden Prionin-Hypothese sind diese das krankheitsspezifische Produkt einer Immunreaktion des infizierten Individuums auf den Kontakt mit antigen wirkenden Prioninen. Enzymimmunoassays gehören zu den seit langen etablierten Labormethoden. Aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit, ihrer hohen Selektivität und Sensitivität gehören sie zu den Standardverfahren der medizinischen Analytik. Durch den Einsatz standardisierter Mikrotiterplatten sind die Testsysteme universell einsetzbar. Die Durchführung der Messung kann durch den Einsatz von speziellen Pipettier- und Lesegeräten weitestgehend automatisiert werden. In Blutspendediensten finden ELISAs vor allem in der Bestimmung infektionsserologischer Parameter routinemäßige Verwendung. Der BSE PLUS™ (hc)-Test stellt also keine zusätzlichen Anforderungen an die benötigte Laborausstattung, wodurch der standardisierte Einsatz im Blutspenderscreening begünstigt werden würde.

Der BSE PLUS™ (hc)-Test ließ sich im Rahmen unserer Studie problemlos durchführen. Alle benötigten Geräte und Materialien waren bereits im genutzten Labor des Blutspendedienstes der Universitätsklinik vorhanden. Auch die Entnahme des zusätzlich benötigten Serumröhrchens war unkompliziert in den Ablauf der Blutspende integrierbar. Der Zeitaufwand für die Durchführung des anti-Prionin ELISA lag im Bereich anderer bereits im Blutspendewesen eingesetzter Testsysteme. Für die Testung von 32 Proben (1 Mikrotiterplatte) wurden durchschnittlich 150 Minuten benötigt. Dabei nahmen die vorgegebenen Mindestinkubationszeiten 90 Minuten in Anspruch. Alle Proben und Reagenzien wurden hierbei manuell einpipettiert. Zum Vergleich beträgt die Mindestinkubationszeit des vom Spenderlabor des UKE verwendeten Immunoassays zum Nachweis von Zytomegalieinfektionen (CMV Total AB EIA; Abbott) 111 Minuten.

Für die Dauer der Inkubationszeit nach Zugabe der Substratlösung wird für den BSE PLUS™ (hc)-Test vom Hersteller die Mindestinkubationszeit von 30 Minuten vorgegeben. Eine Maximaldauer ist nicht angegeben. Wir haben daher für die von uns untersuchten Spenderproben drei verschiedene Inkubationszeiten gewählt. Die Proben wurden nach Zugabe der Substratlösung für 30, 45 oder 90 Minuten inkubiert. Es zeigte sich dabei bei Spenderproben und Kontrollen eine deutliche

Abhängigkeit zwischen der Länge der Inkubationszeit und der Höhe der gemessenen Extinktionswerte. Wie aufgrund der enzymatischen Indikatorreaktion zu erwarten, waren die Extinktionswerte höher je länger die Dauer der Inkubationszeit betrug. So betrug die mittlere Extinktion der Spenderproben für CJAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 0,032 OD, bei 90 Minuten Inkubationszeit betrug sie 0,077 OD. Die Extinktionen der positiven Kontrollen lagen hier nach 30 Minuten im Mittel bei 0,271 OD und nach 90 Minuten bei 0,377 OD. Durch längere Inkubationszeiten wurde die vom Hersteller als mögliche Auswertungsmethode angegebene optische Beurteilung der Mikrotiterplatten erleichtert. Durch die hier kräftiger angefärbten positiven Kontrollen war eine einfachere Abgrenzung zu negativen Kontrollen und Spenderproben möglich. Auf die photometrische Auswertung der Platten hatte die Länge der Inkubationszeit keine Auswirkung, da hier auf Basis der gemessenen Extinktionswerte eine deutliche Abgrenzung zwischen Kontrollen und Probandenproben möglich war. Hierbei erwies sich die vom Hersteller angegebene Mindestinkubationszeit von 30 Minuten als ausreichend, um eine im Vergleich zu den Spenderproben und negativen Kontrollen deutlich erhöhte Extinktion der positiven Kontrollen zu erreichen. Eine längere Inkubationszeit erscheint hier unnötig, da sie allein die Testdauer verlängert ohne dabei die Aussagekraft des Testes zu erhöhen.

Obwohl die Extinktionswerte der positiven Kontrollen deutlich über denen der Spenderproben und negativen Kontrollen lagen, wurde der vom Hersteller des Tests als Richtwert angegebene Extinktionswert von 0,8 OD nur von 8 Kontrollen erreicht. Für eine Standardisierung des ELISA sind konstantere Kontrolllösungen notwendig. Insbesondere fehlt hier auch eine zuverlässig von den Kontrollen erreichte Mindestextinktion.

5.3 Validierung positiver Proben

Für alle vorgestellten Screeningverfahren besteht zum heutigen Zeitpunkt das Problem, dass noch keine zuverlässige Bestätigung positiv getesteter Proben möglich ist. Hierfür ist nach dem Stand der heutigen Diagnosemöglichkeiten eine

unter Umständen langjährige Beobachtung des betroffenen Blutspenders notwendig. Wobei allerdings auch hierdurch vermutlich keine endgültige Aussage über den Infektionsstatus des Spenders gemacht werden kann, da möglicherweise auch subklinische Krankheitsverläufe bei Personen mit heterozygotem Genotyp am Codon 129 des Prionproteingens möglich sind (61). Als eine Möglichkeit der Validierung von Testsystemen wird von Ludlam und Turner der Einsatz von mit Gehirnhomogenat gespicktem Blut oder der Einsatz von Tiermodellen diskutiert (81). Es besteht zum heutigen Zeitpunkt allerdings noch keine Klarheit darüber in wie weit Ergebnisse aus Tierversuchen auf die tatsächliche Situation im Menschen übertragbar sind. Aufgrund dieser Problematik haben wir in das dieser Studie zugrunde liegende Protokoll eine Klausel aufgenommen, wonach den Teilnehmern an der Studie keine Informationen über die Testergebnisse zugänglich gemacht wurden. Allerdings hätte auch hier im Fall eines positiven Testergebnisses das Problem bestanden, wie mit so einem Spender oder Patienten weiter verfahren worden wäre.

5.4 Blutspender

5.4.1 Hämatologische Parameter

Es konnten insgesamt Proben von 940 Blutspendern in die Studie eingeschlossen werden. Aufgrund des geringeren Anteils von Frauen am Spenderkollektiv des UKE gelang es dabei nicht, die geplanten 500 Proben von Blutspenderinnen innerhalb des vorgesehenen Zeitraumes zu sammeln. Es mussten daher mehr Proben von männlichen Blutspendern eingeschlossen werden, insgesamt 520 gegenüber 420 Proben weiblicher Spender.

Die Auswertung der im Rahmen der Blutspende ermittelten hämatologischen Parameter ergab nur geringe Abweichungen von den Referenzbereichen des BTB. Die größten Abweichungen ergaben sich bei der Hämoglobinkonzentration der getesteten Blutspender. Hier lagen 61 Frauen und 8 Männer unterhalb des unteren Grenzwertes. Eisenmangel und damit erniedrigte Hämoglobinkonzentrationen

stellen durch den durch die Spende bedingten kontinuierlichen Blutverlust ein häufig auftretendes Problem bei regelmäßiger Blutspende dar und waren somit bei einem Kollektiv von Blutspendern als Probanden zu erwarten (71). Der höhere Anteil von Spenderinnen an dieser Gruppe beruht auf dem gegenüber Männern erhöhten Eisenbedarf von Frauen. Schätzungen zufolge sind 80% der von Eisenmangelanämien betroffenen Patienten Frauen. Als Ursache gilt hier insbesondere der kontinuierliche zusätzliche Eisenverlust durch die Menstruationsblutung.

Bei den weiteren untersuchten Parametern des Blutbildes lagen geringere Abweichungen von den Referenzbereichen des BTD vor. Bei 4 weiblichen und 8 männlichen Blutspendern lag eine über den oberen Richtwert von 10×10^3 erhöhte Leukozytenzahl vor. Erhöhungen der Leukozytenzahlen treten zumeist reaktiv bei Nikotinabusus, Infektionen, Entzündungen oder auch allergischen Geschehen auf. Als weitere Ursachen kommen Malignome, metabolische Störungen oder auch Reaktionen auf Medikamente, insbesondere Glukokortikoide infrage. Die Betrachtung des Differentialblutbildes kann genauere Rückschlüsse über die Ursache einer Leukozytose ermöglichen. So ist die Vermehrung der neutrophilen Granulozyten Ausdruck einer akuten bakteriellen Infektion. Monozytosen treten im Verlauf entzündlicher Erkrankungen ab dem 4. bis 7. Tag auf und sind Zeichen der beginnenden Immunisierung. Weiterhin können sie bei Tuberkulose, Lues oder subakuten bakteriellen Endokarditiden auftreten. Hierbei liegen jedoch meist deutlich über die Norm erhöhte Werte vor. Erhöhte Lymphozytenzahlen beobachtet man in der letzten Phase bakterieller Infektionen oder bei Virusinfekten. Insgesamt waren die Abweichungen bei den untersuchten Blutspendern wie in Tabelle 7 des Ergebnisteils dargestellt nur minimal, so dass als Ursache für abweichende Leukozytenparameter wohl zumeist leichte Infektgeschehen oder individuelle Abweichungen in Frage kommen. 4 Spender gaben dementsprechend auch einen bronchopulmonalen Infekt im Spenderfragebogen an. Insgesamt zeigt die Auswertung der hämatologischen Parameter ein weitgehend gesundes Spenderkollektiv. Für das Vorliegen von zum Zeitpunkt der Blutspende unbekannter chronischer oder auch neurodegenerativer Erkrankungen ergab sich kein Anhalt. Die alleinige Beurteilung des Blutbildes und der Spenderselbstauskunft ermöglicht jedoch keine Rückschlüsse auf eine zum Zeitpunkt der Blutspende vorliegende vCJD Infektion im präklinischen Stadium.

5.4.2 BSE Plus (hc) Test bei Blutspendern

In keiner der getesteten Spenderproben ließen sich Antikörper gegen eines der drei Prioninepitope nachweisen. Mit den Extinktionsmittelwerten von 0,043 OD für CJAS- Antikörper, 0,042 OD für BSAS-Antikörper und 0,036 OD für SCRAPAS-Antikörper lagen die Proben deutlich im negativen Testbereich. Den höchsten gemessenen Extinktionswert erreichte mit 0,260 OD bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten für anti-CJAS AK die Probe eines männlichen Blutspenders. Zur Kontrolle dieses Wertes wurde dieselbe Probe erneut getestet. Außerdem wurde eine zweite von diesem Spender eingefrorene Probe aufgetaut, und neben der ersten Probe ebenfalls mit dem BSE PLUS™ (hc) Test getestet. Diese beiden Proben waren mit Extinktionswerten von 0,067 OD und 0,073 OD eindeutig negativ. Der im ersten Test gemessene Extinktionswert von 0,260 OD lässt sich daher am wahrscheinlichsten auf einen Messfehler, möglicherweise bedingt durch eine Luftblase in der Kavität der Mikrotiterplatte, zurückführen.

Es ergaben sich bei den 940 getesteten Spenderproben keine Unterschiede zwischen den Extinktionswerten männlicher und weiblicher Blutspender. Es scheinen somit keine geschlechtsspezifischen Faktoren, welche zu einer Beeinflussung der Testergebnisse führen könnten, zu existieren. Die Höhe der gemessenen Extinktionen war jedoch aufgrund der enzymatischen Indikatorreaktion des Tests deutlich von der Länge der Inkubationszeit abhängig. Die vom Hersteller als mögliche Auswertungsmethode angegebene optische Beurteilung der Mikrotiterplatten wurde dabei durch eine längere Inkubationszeit erleichtert, da hier die positiven Kontrollen deutlicher angefärbt waren und so eine bessere Abgrenzung zu negativen Kontrollen und Spenderproben möglich war.

Für das Fehlen positiver Testergebnisse im Spenderkollektiv kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Rückblickend betrachtet scheinen zunächst die in primären Risikoabschätzungen erwarteten vCJD Fallzahlen deutlich zu hoch angesetzt worden zu sein. Alle Modellrechnungen zum Verlauf der vCJD Epidemie sind bis heute mit großen Unsicherheiten behaftet, da viele der eingehenden Variablen nur abgeschätzt werden können (107). So fällt zum Beispiel die Anzahl der geschätz-

ten Fälle umso größer aus, je länger die angenommene Inkubationszeit ist. Auch die Menge des Konsums von kontaminiertem Rindfleisch und die minimale infektiöse Dosis bei oraler Aufnahme des Erregers gehören zu den Parametern die nur geschätzt werden können. Auch die vom statistischen Standpunkt aus betrachteten geringen Fallzahlen erschweren genaue mathematische Analysen. Für das Vereinigte Königreich kamen Ghani et al. in einer primären Studie aus dem Jahr 1998 auf eine mögliche Anzahl von mehreren Millionen vCJK Fällen (49). Im Verlauf der Zeit wurde diese Modellrechnung auf Basis der aktuellen Fallzahlen immer weiter präzisiert. Dies führte zu einer deutlichen Verringerung der erwarteten Fallzahlen. So wurde unter der Annahme einer Inkubationszeit von bis zu 60 Jahren in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2000 anhand der bis zu diesem Zeitpunkt aufgetretenen vCJK Fälle nur noch eine maximale Anzahl von 136.000 vCJK Fällen geschätzt (47). 2003 wurde diese Zahl erneut reduziert. Die Autoren kamen hier noch auf etwa 7.000 Fälle (48, 49). Die tatsächlichen Fallzahlen bleiben allerdings auch hinter diesen reduzierten Abschätzungen noch deutlich zurück. Inwieweit sich eine möglicherweise deutlich längere Inkubationszeit oder auch das mögliche Vorhandensein einer Anzahl von nicht klinisch auffälligen Infektionsträgern sich auf die Entwicklung der vCJD Fallzahlen auswirken wird kann zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden (30, 33).

Risikoabschätzungen für Länder mit nur wenigen oder keinen vCJK Fällen wie Deutschland sind mit noch größeren Unsicherheiten behaftet, da diese zur Zeit noch nicht an tatsächlichen Fallzahlen validiert werden können. Die Modelle basieren hier vor allem auf dem geschätzten Ausmaß der Exposition der Bevölkerung gegenüber mit BSE kontaminierten Lebensmitteln. Primäre Schätzungen der von der Bundesregierung eingesetzten Arbeitsgruppe „Gesamtstrategie Blutversorgung angesichts vCJK“ für die Anzahl möglicher vCJD Fälle in Deutschland aus dem Jahr 2001 kamen unter *worst case* Bedingungen auf eine Anzahl von etwa 400 bis 600 primären vCJD Fällen bis zum Jahr 2040. Diese Schätzung basierte auf der Annahme, dass die Zahl der zu erwartenden vCJD Fälle direkt proportional zur Größe der BSE Epidemie eines Landes ist. Weiterhin wurde angenommen dass seit 1981 bis zum Verbot von der Verwendung von Hochrisikomaterialien zur Lebensmittelherstellung im Oktober 2000 jährlich etwa 50 bis 200 infizierte Rinder in die Nahrungskette gelangten (102). In Anbetracht der bisherigen Entwicklung

kommt die Arbeitsgruppe in ihrer Aktualisierung dieses Berichts im März 2006 allerdings zu dem Schluss, dass in Deutschland nur „vereinzelte vCJK Fälle auftreten werden“ (102). Das Fehlen positiver Testergebnisse für CJAS-Antikörper in unserer Studie scheint also mit den aktuell erwarteten niedrigen Fallzahlen zu korrelieren. Allerdings besteht auch hier die Möglichkeit, dass sehr frühe Infektionsstadien mit einer möglicherweise noch niedrigen Antikörpermenge durch den Test nicht erreicht werden. Gemäß der Prionhypothese sollten in diesem Krankheitsstadium bei einer durch die Aufnahme von kontaminiertem Rindfleisch bedingten vCJD allerdings parallel BSAS-Antikörper nachweisbar sein, die so als Marker für eine mögliche vCJD dienen können. Auch diese Konstellation lies sich bei keinem getesteten Blutspender nachweisen.

Das getestete Blutspenderkollektiv stellt eine im Vergleich zur Gesamtbevölkerung sehr selektierte Population dar. Durch den seit Januar 2001 geltenden Ausschluss von Spendern die sich in der Zeit von 1980 bis 1996, also zum Höhepunkt der BSE Epidemie, 6 Monate oder mehr in Großbritannien aufgehalten haben, ist diese Gruppe mit erhöhtem Risiko für primäre vCJD Infektionen bereits nicht mehr in dem von uns getesteten Kollektiv enthalten. Das durchschnittliche Alter der in die Studie eingeschlossenen Blutspender lag mit 41,2 Jahren außerdem deutlich über dem der bisher an vCJD erkrankten Personen. Hier beträgt das Durchschnittsalter beim Auftreten der ersten vCJK Symptome 26 Jahre (61). Dieses altersabhängige Erkrankungsrisiko scheint nicht wie zunächst angenommen durch einen erhöhten Rindfleischkonsum Jugendlicher bedingt zu sein (61) Nach Boelle et al. scheint vielmehr eine spezifische altersabhängige Empfindlichkeit zu bestehen, die möglicherweise durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmschleimhaut bedingt wird (11). Diese Risikogruppe ist im Kollektiv der getesteten Blutspender also nur teilweise vertreten.

Obwohl es in Norddeutschland weniger BSE Fälle gibt als in Süddeutschland, bestehen keine Hinweise für ein geographisch bedingtes geringeres vCJD Risiko in Norddeutschland und ein hierdurch verursachtes Fehlen von positiven Testergebnissen in unserer Studie. Die Sammlung der Proben erfolgte von Juli 2001 bis März 2002. In den Jahren 2001 und 2002 wurden in Niedersachsen und Schleswig-Holstein insgesamt 72 Rinder positiv für BSE getestet. Im selben Zeitraum

wurden in Bayern 91 BSE Fälle gemeldet. Für Deutschland existieren genaue Angaben über BSE Fallzahlen erst ab dem Zeitpunkt der obligatorischen Durchführung von BSE-Schnelltests, daher können keine genauen Aussagen über regionale Unterschiede in der Verteilung des Auftretens von BSE vor diesem Zeitpunkt gemacht werden. Jedoch zeigt sich während der gesamten Erfassung der BSE Fallzahlen ein vermehrtes Auftreten von BSE in Süddeutschland. Bis zum 31. Oktober 2006 wurden in Deutschland insgesamt 395 Fälle von BSE bei Schlachtrindern nachgewiesen. 141 dieser Fälle traten in Bayern auf, in Schleswig-Holstein wurden 73 und in Niedersachsen 32 Fälle registriert. Gemessen an diesen Fallzahlen scheint in Norddeutschland möglicherweise ein geringeres Risiko für den Kontakt mit BSE kontaminiertem Rindfleisch und damit eventuell auch für die primäre Infektion mit vCJD zu bestehen. Umfangreiche retrospektive Studien zur geographischen Verteilung von vCJD in Großbritannien haben bisher keine Korrelation zwischen dem regional erhöhten Vorkommen von BSE Fällen und dem Auftreten von vCJD feststellen können (4, 37). Cousens et al. kommen vielmehr zu dem Schluss, dass durch den nicht mehr regional gebundenen Fleischverarbeitungsprozess kein erhöhtes Risiko für vCJD in Regionen mit hoher BSE-Häufigkeit besteht. Um genaueren Aufschluss über die spezifische Risikosituation der getesteten Blutspender zu erlangen fehlen jedoch Daten über den Rindfleischkonsum der Blutspender und die genaue Herkunft des konsumierten Fleisches.

Endogene SCRAPAS-Antikörper sind gemäß der Prioninthese ein Marker für den Kontakt mit Scrapie. Bei keinem der getesteten Blutspender oder Patienten waren solche Antikörper nachweisbar. Diese negativen Ergebnisse lassen sich durch zwei Faktoren erklären. Zum einen ist die Inzidenz von Scrapie in Deutschland relativ niedrig. So wurden in den Jahren 2001 und 2002 laut Statistik des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz bundesweit nur 19 Scrapie Fälle gemeldet. Weiterhin liegt der Konsum von Schaf- und Ziegenfleisch deutlich unter dem Verbrauch an Rindfleisch. Nach der Verbrauchsstatistik des Bundesverbandes der deutschen Fleischwarenindustrie lag der Verbrauch an Schaf- und Ziegenfleisch in den Jahren 2001 bis 2007 konstant bei 0,7 kg pro Person. Dagegen betrug der Rindfleischverzehr im Jahr 2001 6,8 kg

und 2002 8,2 kg pro Person. Dieses niedrige Risiko für einen Kontakt mit Scrapie wird durch die negativen Testergebnisse widerspiegelt.

5.5 Patienten

5.5.1 Allgemeine Parameter

Das Patientenkollektiv stellt eine im Vergleich zum Blutspenderkollektiv sehr heterogene Gruppe dar. Die Ursache hierfür liegt in der zufälligen Auswahl der Patienten und den aus diesem Grund sehr unterschiedlichen Ausgangsdiagnosen die zu einer Untersuchung von Proben im Liquorlabor geführt haben. Die Patientengruppe repräsentiert somit ein breites Spektrum neurologischer Erkrankungen bei denen differentialdiagnostisch auch oft TSEs im Hintergrund stehen können. Insbesondere bei den drei Patienten bei denen die Liquordiagnostik aufgrund einer progredienten Demenz durchgeführt wurde, sollte auch eine TSE differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Bei 9 Patienten ergab die Liquordiagnostik normale Liquorbefunde ohne pathologische Auffälligkeiten. Die neuronenspezifische Enolase ergab bei keinem der 5 Patienten bei denen sie bestimmt wurde auffällige Befunde. Wodurch zumindest bei diesen Patienten ein starker Untergang von Neuronen, wie er durch eine TSE ausgelöst werden würde, vermutlich ausgeschlossen werden kann. Bei den 7 Patienten mit auffälligen Liquorbefunden, entsprachen die Befundkonstellationen der zugrunde liegenden Verdachts- oder Ausgangsdiagnose. So ergab die Diagnostik bei einem männlichen Patienten mit Kryptokokkenmeningitis bei zugrunde liegender HIV Infektion das Bild eines chronischen Entzündungsprozesses im ZNS, mit einer erhöhten Zellzahl von 56/ μ l, leicht erhöhtem Laktat im Liquor (2,3 mmol/l), einem erhöhtem Gesamteiweiß von 624 mg/l und dem Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese. Direkte Hinweise auf eine bestehende Creutzfeldt-Jakob Erkrankung ergaben sich bei keinem der Untersuchten Patienten, allerdings sollte insbesondere bei den beiden Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer progredienten Demenz ohne Auffälligkeiten im Liquorbefund eine weitere Ausschlussdiagnostik erfolgen. Hierzu würden nach heutigem Kenntnisstand zum Beispiel die Bestim-

mung von 14-3-3 Protein im Liquor und die Durchführung einer Magnetresonanztomographie des Gehirns gehören. Die alleinige Bestimmung der Standardliquorparameter erlaubt keine Aussagen über das Vorliegen einer TSE, da diese bei Patienten mit CJD in der Regel unauffällig sind (69).

5.5.2 BSE PLUS (hc) Test bei Patienten

Die mit dem BSE PLUS™ (hc)-Test getesteten Serumproben der 16 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren ebenso wie die der Blutspender negativ für alle drei Prioninepitope. Die Proben lagen mit den Extinktionsmittelwerten von 0,063 OD für anti-CJAS, 0,058 OD für anti-BSAS und 0,050 OD für anti-SCRAPAS deutlich im negativen Bereich. Durch das deutlich kleinere Kollektiv ist kein direkter Vergleich zwischen der Patienten und Blutspendergruppe möglich. Für eine genauere Beurteilung ist sicherlich auch die Testung eines größeren Kollektivs notwendig.

Für die negativen Ergebnisse des BSE PLUS™ (hc) Tests gelten die Selben Erklärungen wie für die negativen Testergebnisse der Blutspender. Allerdings fehlen auch hier genaue Kenntnisse über den Rindfleischkonsum der Patienten. Auch liegen keine Auskünfte über mögliche Auslandsaufenthalte der Patienten in Großbritannien zur Zeit der BSE Epidemie vor. Eine genaue Abschätzung des individuellen Risikos einer vCJD Erkrankung ist also auch hier nicht möglich.

5.6 Prionin-Hypothese

Die dem BSE (hc) PLUS Test zugrunde liegende Prioninhypothese ist zum heutigen Zeitpunkt nicht endgültig belegt. Hierfür fehlt die Testung positiver Blutproben von vCJD Patienten während verschiedener Phasen der Krankheit oder auch die in vitro Generation von infektiösen Prioninen. Eine Übereinstimmung zwischen dem anti-Prionin ELISA und standardisiert eingesetzten BSE-Schnelltests konnte bei der parallelen Testung von Rindern in Italien gezeigt werden. Alle im Schnell-

test negativ getesteten Tiere waren auch im BSE PLUS™ (hc) Test negativ (unveröffentlichte Daten; Altegen).

Die Prionhypothese steht nach heutigen Erkenntnissen nicht im Widerspruch zur bekannten Prionen-Theorie. Die Hypothese kann stattdessen möglicherweise ergänzende Bausteine der Prionen-Theorie liefern. Das zum endgültigen Beweis der Prionen-Theorie als „Goldstandard“ geforderte Experiment, die *in vitro* Erzeugung von de novo Infektiosität existiert zum heutigen Zeitpunkt noch nicht. Bisher ist es nur der Arbeitsgruppe von Prusiner gelungen durch *in vitro* erzeugte Prionen Infektiosität zu generieren (78). Hierfür wurde verkürztes rekombinantes PrP der Maus in hohen Konzentrationen durch Inkubation in Anwesenheit von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid in fibrilläre Strukturen überführt. Diese „synthetischen Prionen“ erzeugten nach sehr langer Inkubationszeit in transgenen Mäusen, welche verkürztes PrP überexprimieren eine spongiforme Enzephalopathie. Die Infektiosität der synthetischen Prionen war hierbei allerdings sehr niedrig. Auch besteht in dieser Versuchsanordnung das Problem, dass die als Indikatortiere verwendeten transgenen Mäuse spontan prionenkrankheitenähnliche neurodegenerative Krankheiten entwickeln können (29, 124). Somit kann die von den Mäusen im Verlauf des Experiments entwickelte Erkrankung auch als spontan entstanden interpretiert werden, insbesondere da das histopathologische Bild der beobachteten Krankheit sich deutlich von dem normalerweise bei Prionenkrankheiten in Mäusen beobachteten unterschied. In verschiedenen anderen Studien konnte zwar *in vitro* PrP^{Sc} mit spezifischen Eigenschaften wie β -Faltblattstruktur oder Proteinaseresistenz erzeugt werden, dieses war jedoch nie infektiös (7, 63, 73). Möglicherweise lässt sich dies auf das Fehlen eines bisher noch nicht identifizierten Faktors, welcher für die Replikation pathogener Prionen notwendig ist erklären (8) Die Priontheorie erklärt außerdem Speziesbarrieren in Übertragungsexperimenten durch diesen als Faktor X bezeichneten Faktor. Prionine sind aufgrund ihrer postulierten Eigenschaften ein möglicher Kandidat für dieses Protein X. Um dies endgültig zu belegen fehlen jedoch weiterführende Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Die variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit ist eine zum Formenkreis der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien gehörende, immer tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung. Die Krankheit gilt als die menschliche Form der bovinen spongiformen Enzephalopathie. Bis heute sind drei Fälle in denen die Krankheit vermutlich durch Bluttransfusionen von Mensch zu Mensch übertragen wurde bekannt. Zur Vermeidung solcher Sekundärinfektionen wurden im deutschen Blutspendewesen verschiedene indirekte Sicherheitsmaßnahmen ergriffen. Hierzu gehören der Ausschluss von Personen mit erhöhtem Risiko für primäre vCJD Infektionen von der Blutspende und die Leukozytendepletion. Das Risiko von Sekundärinfektionen durch Personen die sich in der langen asymptomatischen Inkubationszeit der Krankheit befinden bleibt jedoch trotz dieser Maßnahmen weiterhin bestehen. Eine sichere Diagnose der varianten Creutzfeldt-Jakob Krankheit während der präklinischen Phase ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich.

Wir haben in der vorliegenden Studie einen Bluttest verwendet der durch den Nachweis von so genannten anti-Prionin Antikörpern dazu in der Lage sein soll die vCJD auch während der präklinischen Krankheitsphase nachzuweisen. Die dem Test zugrunde liegende Prioninhypothese liefert möglicherweise eine Ergänzung zur bekannten Prionentheorie. Der endgültige Beleg der Hypothese steht noch aus.

Es wurden Proben von Blutspendern und Patienten der neurologischen Klinik des Universitätskrankenhauses untersucht. Dabei konnten in keiner der untersuchten Proben anti-Prionin Antikörper nachgewiesen werden. Auch zusätzlich erhobene hämatologische- und Liquorparameter erbrachten keinen Hinweis auf das Vorliegen von neurodegenerativen Erkrankungen. Diese negativen Testergebnisse liegen im Rahmen der für Deutschland erwarteten geringen Fallzahlen. Wir konnten keine Unterschiede zwischen den Testergebnissen von männlichen und weiblichen Blutspendern und Patienten feststellen. Die festgestellte Abhängigkeit der Extinktionswerte von der Länge der Inkubationszeit nach Substratzugabe ent-

spricht der enzymatischen Indikatorreaktion des verwendeten ELISAs. Die Durchführung des Tests war unkompliziert und gut in den Ablauf der regulären Blutspende integrierbar. Für einen routinemäßigen Einsatz des Tests sind jedoch stabilere positive Kontrollen und ein Beleg der zugrunde liegenden Hypothese notwendig.

7 Literaturverzeichnis

1. Aguzzi A. Blood simple prion diagnostics. *Nature Medicine* 7: 289-290, 2001.
2. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214: 764-66, 1967.
3. Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 278-284, 1966.
4. Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, Mawhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, Ryan JB, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GA. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382: 779-788, 1996.
5. Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, and Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol* 176: 403-411, 1995.
6. Baron H. Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Prions and blood safety. *Biomedical Progress* 12: 21-26, 1999.
7. Baskakov IV. Autokatalytic conservation of rekombinant prion proteins displays a species barrier. *J Biol Chem* 279: 7671-7677, 2004.
8. Baskakov IV. The reconstitution of mammalian prion infectivity de novo. *FEBS* 274: 576-587, 2007.
9. Beekes M, Kurth R. BSE und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Gesundheitspolitische Bedeutung für die Bundesrepublik Deutschland und Europa. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 335-340, 2002.
10. Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Stuckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Stack M, Moser M, Oesch B, Kubler E. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenat. *J Virol Methods* 101: 79-84, 2002.
11. Boelle PY, Cesbron JY, Valleron AJ. Epidemiological evidence of a higher susceptibility to vCJD in the young. *BMC Infectious Diseases* 4: 26, 2004.

12. Brandner S, Klein MA, Aguzzi A. Mechanismen der Neuroinvasion von Prionen: molekulare Grundlagen und aktueller Stand der Forschung. *Schweiz Med Wochenschr* 130: 435-442, 2000.
13. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, and Kretschmar HA. Prion protein deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146: 104-112, 1997.
14. Brown DR, Wong B, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344: 1-5, 1999.
15. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabott NA, Williams A, Fraser H. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nature Medicine* 5: 1308-1312, 1999.
16. Brown P. Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sang* 89: 63-70, 2005.
17. Brown P. EEG findings in Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA* 269: 3168, 1993.
18. Brown P, Cervenakova L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN. Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* 39: 1169-1178, 1999.
19. Brown P, Preece MA, Will RG. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 340: 24-27, 1992.
20. Brown P, Ward HJ, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. Bovine spongiform encephalopathy and variant creutzfeldt-jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerging Infectious Diseases* 7: 6-16, 2001.
21. Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 358: 208-209, 2001.
22. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501, 1997.

23. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, and Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582, 1992.
24. Caughey B, Kocisko DA, Raymond GJ, Lansbury PT. Aggregates of scrapie associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol* 2: 807-817, 1995.
25. Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase sensitive. *J Biol Chem* 266: 18217-18223, 1991.
26. Cervenakova L, Brown P, Soukharev S, Yakovleva O, Diringner H, Saenko EL, Drohan WN. Failure of immunocompetitive capillary electrophoresis assay to detect disease-specific prion protein in buffy coat from humans and chimpanzees with Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis* 24: 853-859, 2003.
27. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, Kolchinsky S, McShane L, Drohan WN, Brown P. Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 43: 1687-1694, 2003.
28. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315: 331-335, 1985.
29. Chiesa R, Piccardo P, Gambetti P, and Harris DA. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21: 1339-1351, 1998.
30. Clarke P, Ghani AC. Projections about the future course of the primary vCJD epidemic in the UK: inclusion of subclinical infection and the possibility of wider genetic susceptibility. *J R Soc Interface* 2: 19-31, 2005.
31. Cohen FE. Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 293: 313-320, 1999.

32. Collinge J, Palmer MS, Sidle KCL, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P. Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet* 346: 569-570, 1995.
33. Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP. Kuru in the 21st century-an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* 367: 2068-2074, 2006.
34. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, and Jefferys JGR. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297, 1994.
35. Collins S, Law MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J, Masters CL. Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case control study. *Lancet* 353: 693-696, 1999.
36. Come JH, Fraser PE, and Lansbury PT Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: Importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5959-5963, 1993.
37. Cousens S, Smith PG, Ward H, Everington D, Knight RS, Zeidler M, Stewart G, Smith-Bathgate EA, MacLeod MA, MacKenzie J, and Will RG. Geographical distribution of variant Creutzfeldt-Jakob disease in Great Britain, 1994-2000. *Lancet* 357: 1002-1007, 2001.
38. Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatr* 57: 1-18, 1920.
39. Cuille J, Chelle PL. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci* 203: 1552-1554, 1936.
40. Dobson R. Traditional butcher methods linked to vCJD cluster. *BMJ* 322: 753, 2001.
41. Donnelly CA, Ferguson NM, Ghani AC, Anderson RM. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269: 2179-2190, 2002.
42. Duffy P, Wolf J, et al. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290: 692, 1974.
43. Federspil P, Federspil PA. Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (Prionkrankheiten). *HNO* 50: 316-326, 2002.

44. Federspil PA, Federspil P, Plinkert PK. Diagnostik der Prionkrankheiten. *HNO* 50: 327-331, 2002.
45. Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Science* 197: 943-959, 1977.
46. Gambetti P, Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Lugaresi E. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol* 5: 43-51, 1995.
47. Ghani AC, Ferguson NM, Donnelly CA, and Anderson RM. Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature* 406: 583-584, 2000.
48. Ghani AC, Ferguson NM, Donnelly CA, Anderson RM. Updated projections of future vCJD deaths in the UK. *BMC Infectious Diseases* 3: 4, 2003.
49. Ghani AC, Ferguson NM, Donnelly CA, Hagenaars TJ, Anderson RM. Estimation of the number of people incubating variant CJD. *Lancet* 352 (9137): 1353-1354, 1998.
50. Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 349: 1812-20, 2003.
51. Goldfarb LG, Brown P, Mitrowa E et al. Creutzfeldt-Jakob disease associated with the PRNP codon 200 Lys mutation. An analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 7: 477-486, 1991.
52. Grassi J, Creminon C, Frobert Y, Fretier P, Turbica I, Rezaei H, Hunsmann G, Comoy E, Deslys JP. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch Virol Suppl.* 16: 197-205, 2000.
53. Green AJE, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod M-A, Ironside JW, Will RG, Knight RS. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70: 744-748, 2001.
54. Griffith JS. Self-replication of Kuru and Scrapie. *Nature* 215: 1043-1044, 1967.
55. Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 2: 289-290, 1959.
56. Head MW, Ritchie D, Smith N, McLoughlin V, Nailon W, Samand S, Bishop M, McCardle L, Ironside JW. Peripheral tissue involvement in sporadic,

- iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative and biochemical study. *Am J Pathol* 164: 143-153, 2004.
57. Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, and Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 91: 221-230, 2006.
 58. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353: 183-189, 1999.
 59. Hill AF, Desbuslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997.
 60. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349: 99-100, 1997.
 61. Hilton DA. Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* 2008: 134-141, 2006.
 62. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, and Ironside JW. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 203: 733-739, 2004.
 63. Horiuchi M, Caughey B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure* 7: 231-240, 1999.
 64. Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, and Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356: 999-1000, 2000.
 65. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335: 924-930, 1996.
 66. Huang FP, Farquar CF, Mabott NA, Bruce ME, and MacPherson GG. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP^{Sc} from the gut. *J Gen Virol* 83: 2897-2905, 2002.
 67. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83: 2897-2905, 2002.

68. Ironside JW. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood transfusion and blood therapies. *Haemophilia* 12, (Suppl. 1): 8-15, 2006.
69. Jacobi C, Arlt S, Reiber H, Westner I, Kretschmar HA, Poser S, Zerr I. Immunoglobulins and virus specific antibodies in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurol Scand* 62: 348-354, 2005.
70. Jakob AM. Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. *Dtsch Z Nervenheilk* 70: 132-146, 1921.
71. Kaltwasser JP. Eisenstoffwechsel. In: Müller-Eckhardt C, Kiefel V, Hrsg. *Transfusionsmedizin*. Berlin: Springer, pp. 120-122, 2003.
72. Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci* 94: 10069-10074, 1997.
73. Kocisko DA, Come JH, Priola SH, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. Cell-free formation of protease resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474, 1994.
74. Kretschmar HA. BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. *Deutsches Ärzteblatt* 40: 2213-2219, 2001.
75. Kretschmar HA. Prionkrankheiten (transmissible spongiforme Enzephalopathien). In: Pfeiffer J, Schröder JM, Paulus W, Hrsg. *Neuropathologie*. Berlin, Heidelberg, NewYork,: Springer, 2002.
76. Lane A, Stanley CJ, Dealer S, Wilson SM. Polymeric ligands with specificity for aggregated prion protein. *Clin Chem* 49: 1774-1775, 2003.
77. Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, Farquar CF, McConnell I, Brown J, Hope J, and Mayer RJ. Lysosomes are key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol* 166: 333-341, 1992.
78. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HOB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic wild-type mammalian prions. *Science* 305: 673-676, 2004.

79. Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 93: 2403-2407, 1996.
80. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421, 2004.
81. Ludlam CA, Turner ML. Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt Jakob disease by blood products. *Br J Haematol* 132: 13-24, 2005.
82. Masters CL, Gajdusek DC Jr. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104: 559-588, 1981.
83. McBride PA, Eikelenboom P, Kraal G, Fraser H, Bruce ME. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie infected mice. *J Pathol* 168: 413-418, 1992.
84. Mollenhauer B, Zerr I, Ruge D, Krause G, Mehnert WH, Kretschmar HA, Poser S. Epidemiologie und klinische Symptomatik der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 312-317, 2002.
85. Mouillet-Richard S, Ermoval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O. Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928, 2000.
86. Moynagh J, Schimmel H. New Tests for Bse evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* 400: 105, 1999.
87. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14: 929-931, 1967.
88. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.
89. Otto M, Stein H, Szudra A, Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Poser S, Kretschmar HA, Mader M, Weber T. S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 244: 566-570, 1997.

90. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretschmar HA, Poser S. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 225: 210-212, 1997.
91. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10962-10966, 1993.
92. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretschmar HA. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224-233, 1999.
93. Peden AH, Head MW, Richie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 264: 527-529, 2004.
94. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB. Antibodies inhibit prion propagation and cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412: 739-743, 2001.
95. Porstmann T, Kiessing TS. Enzyme immunoassay techniques-an overview. *J Immunol Meth* 150: 5-21, 1992.
96. Poser S, Zerr I, Felgenhauer K. Die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 331-334, 2002.
97. Prusiner SB. Novel proteinaceous particle causes Scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.
98. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13363-13383, 1998.
99. Prusiner SB. Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 344: 1516-1526, 2001.
100. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell* 93: 337-348, 1998.
101. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49: 320-329, 1991.

102. Robert Koch Institut und Paul Ehrlich Institut. Bericht der Arbeitsgruppe Gesamtstrategie Blutversorgung angesichts vCJK (Aktualisierung des Berichts vom 17.08.2001), 2006.
103. Saa P, Castilla J, Soto C. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 313: 92-94, 2006.
104. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813, 2001.
105. Safar JG, Geschwind MD, Deering C, Didorenko S, Sattvat M, Sanchez H, Serban A, Vey M, Baron H, Giles K, Miller BL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Diagnosis of human prion disease. *PNAS* 102: 3501-3506, 2005.
106. Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, Ball H, Legame G, Leclerc E, Solfrosi L, Serban H, Groth D, Burton DR, Prusiner SB, Williamson RA. Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20: 1147-1150, 2002.
107. Salzberger B. Epidemiologie von BSE und vCJD. *Internist* 43: 709-715, 2002.
108. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vanvelde M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol* 98: 437-443, 1999.
109. Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 245: 362-374, 1995.
110. Schmerr MJ, Jenny AL, Bulgin MS, Miller JM, Hamir AN, Cutlip RC, Goodwin KR. Use of capillary electrophoresis and luorescent labeled peptides to detect the abnormal prionprotein n the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* 853: 207-214, 1999.
111. Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen H, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci* 96: 15137-15142, 1999.

112. Soto C, Anderes L, Suardi S, Cardonne F, Castilla J, Frossard MJ, Peano S, Saa P, Limido L, Carbonatto M, Ironside J. Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein missfolding. *FEBS Lett.* 579: 638-642, 2005.
113. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, and Prusiner SB. Structural analysis of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochem* 32: 1991-2002, 1993.
114. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240, 1987.
115. Steinhoff BJ, Racker S. Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 53: 162-166, 1996.
116. Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibits formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129: 121-132, 1995.
117. Task Force vCJD. Die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK). Epidemiologie, Erkennung, Diagnostik und Prävention unter besonderer Berücksichtigung der Risikominimierung einer iatrogenen Übertragung durch Medizinprodukte, insbesondere chirurgische Instrumente-Abschlussbericht der Task Force vCJK zu diesem Thema. *HNO* 50: 296-315, 2002.
118. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642, 1996.
119. Trevitt CR, Singh PN. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology and public health implications. *Am J Clin Nutr* 78 (suppl): 651S-656S, 2003.
120. Uchida Y, Ho S, Nukina N. Sandwich ELISA for the measurement of Apo E4 levels in serum and the estimation of the allelic status of Apo E4. *J Clin Lab Anal* 14: 260-264, 2000.
121. Wadsworth J, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358: 171-180, 2001.

122. Ward HJ, Everington D, Cousens SN, Smith-Bathgate B, Leitch M, Cooper S, Heath C, Knight RS, Smith PG, Will RG. Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case control study. *Ann Neurol* 59: 111-120, 2006.
123. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RT, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121: 419-420, 1987.
124. Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Growth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, and Prusiner SB. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wildtyp prion proteins. *Cell* 76: 117-129, 1994.
125. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 128: 199-203, 1991.
126. Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123: 638-644, 1988.
127. Will RG, Ward HJ. Clinical features of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 284: 121-132, 2004.
128. Will RG, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925, 1996.
129. Will RG, Zeidler M, Stewart G, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN, MacKenzie J, Estibeiro K, Green AJE, Knight RS. Diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 47: 575-582, 2000.
130. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Mcfarlane R, Joiner S, Lineham JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 368: 2061-2067, 2006.
131. Zerr I, Mollenhauer B, Werner C, Poser S. Früh- und Differentialdiagnose der Creutzfeldt-Jakob Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr* 127: 323-327, 2002.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien.....	11
Abbildung 2: Sekundärstruktur von PrP ^c und PrP ^{sc}	22
Abbildung 3: Primärstruktur des humanen Prion-Protein Gens.	23
Abbildung 4: Struktur der Prioninepitope	28
Abbildung 5: Postulierter Verlauf der Antikörperreaktion bei vCJD.....	29
Abbildung 6: Anti-Prionin ELISA	31
Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für CJAS-AK gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern.....	46
Abbildung 8: Extinktion für CJAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht.....	47
Abbildung 9: Extinktion für CJAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten	47
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für BSAS-Antikörper gemessenen Extinktion bei Blutspendern.....	48
Abbildung 11: Extinktion für BSAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht	49
Abbildung 12: Extinktion für BSAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten	49
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für SCRAPAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern	50
Abbildung 14: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht.....	51
Abbildung 15: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper bei einer Inkubationszeit von 30, 45 und 90 Minuten	52
Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für CJAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Patienten	57
Abbildung 17: Extinktion für CJAS-Antikörper getrennt nach Geschlecht.....	58
Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für BSAS-AK gemessenen Extinktionswerte bei Patienten.....	58
Abbildung 19: Extinktion für BSAS-Antikörper bei Patienten getrennt nach Geschlecht.....	59

Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der bei 492 nm für SCRAPAS-Antikörper gemessenen Extinktionswerte bei Blutspendern	60
Abbildung 21: Extinktion für SCRAPAS-Antikörper bei Patienten getrennt nach Geschlecht.....	60
Abbildung 22: Positive Kontrollen und Blutspenderproben getrennt nach Inkubationszeiten.....	62
Abbildung 23: Negative Kontrollen und Blutspenderproben getrennt nach Inkubationszeiten.....	63
Abbildung 23: Negative Kontrollen und Spenderproben getrennt nach Inkubationszeiten.....	58

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien der CJD (nach WHO)	14
Tabelle 2: Diagnosekriterien der vCJD (nach WHO)	18
Tabelle 3: Referenzbereiche für hämatologische Parameter bei Blutspendern	35
Tabelle 4: Spenderkollektiv nach Alter und Geschlecht.....	41
Tabelle 5: Variationsbreite der hämatologischen Parameter bei Blutspenderinnen	42
Tabelle 6: Variationsbreite der hämatologischen Parameter bei Blutspendern	42
Tabelle 7: Blutspender mit erhöhten Leukozytenparametern	44
Tabelle 8: Patientenkollektiv nach Alter und Geschlecht	52
Tabelle 9: Patientenkollektiv nach Art der Grunderkrankung.....	53
Tabelle 10: Patienten mit erhöhten Leukozytenzahlen im Liquor	55
Tabelle 11: Patienten mit Störung der Blut/Liquorschranke ohne intrathekale Immunglobulinsynthese.....	56

9 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. P. Kühnl für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit.

Besonders Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. K. Gutensohn für die engagierte und energische Betreuung zu Durchführung der Studie und Fertigstellung der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. J. Bergmann für das geduldige Beantworten meiner Fragen und für die Tests, die durch Sie zur Verfügung gestellt wurden.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Transfusionsmedizin, die den reibungslosen Ablauf des Spendensammelns ermöglicht haben.

Frau Appel aus dem Spenderlabor danke ich für ihren Einsatz beim zusammenstellen der Laborwerte. Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei den medizinisch technischen Assistentinnen des Labors für Durchflusszytometrie, Frau B. Bernien und Frau M. Weilandt für ihre Unterstützung danken.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich für ihre Unterstützung, die Nachfragen und Motivationsanschiebe danken. Marcus Küsse und Dank fürs Bilderbasteln.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Blutspendern des Universitätsklinikums Eppendorf, die mit der Bereitstellung ihrer Spende diese Studie überhaupt erst ermöglicht haben.

10 Lebenslauf

Name	Annika Schön
Geburtstag	14.07.1977
Geburtsort	Hamburg
Eltern	Dr. phil. Hannelore Schön, Diplom-Psychologin Holger Schön, Groß- und Außenhandelskaufmann

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Hinschenfelde, Hamburg
1988-1997	Charlotte-Paulsen-Gymnasium , Hamburg

Universität

seit März 1998	Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	1.Staatsexamen
September 2003	2.Staatsexamen
Dezember 2004	3. Staatsexamen

Assistenzärztin

Mai 2005 bis Juni 2007	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Krankenhaus Cuxhaven
Oktober 2007	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Regio Klinikum Pinneberg

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig umPromotion beworben habe.