

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung einer Methode zum Nachweis von
pathologischen Prionen mittels Plasminspaltung
in humanem Plasma**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Aleksandar Grigorov

aus Sofia

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Axel Pruß
2. Prof. Dr. med. Peter Hellstern
3. Prof. Dr. rer. nat. Georg Pauli

Datum der Promotion: 30.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Prionkrankheiten	5
1.1.1	Transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Tieren und Menschen	5
1.1.2	BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	6
1.1.3	Übertragung von vCJD durch Blut	7
1.2	Erreger der Prionkrankheiten	8
1.2.1	Zelluläres physiologisches Prionprotein (PrP ^C)	9
1.2.2	Die pathogene Form des Prionproteins (PrP ^{Sc}) und deren Replikationsmechanismus	11
1.3	Diagnostik von TSE und Bedeutung für die Blutspende	13
1.4	Plasmin und PrP	16
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Antikörper	19
2.1.3	Proben	20
2.1.4	Geräte und Material	20
2.1.5	Puffer	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Validierung des ELISA-Tests	21
2.2.2	Auswirkung des Guanidins auf den ELISA-Test	24
2.2.3	Spalten von PrP mittels aktiviertem Plasminogen	24
2.2.4	PrP-Spaltung mittels Streptokinase-aktiviertes Plasminogen in „spiked“ Proben	26
2.2.5	Herstellung von „spiked“ Proben	26
2.2.6	Probenbehandlung und Testverlauf	26
2.3	Auswertungsmethoden und Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Validierung des ELISA-Tests	30
3.1.1	Optimale Konzentration des Detektor-Antikörpers	30
3.1.2	Analytische Sensitivität	32
3.1.3	Linearitätsbereich	32
3.1.4	Präzision	34
3.1.5	Wiederfindung (Recovery)	34
3.2	PrP-Spaltung im Plasma mittels Streptokinase-aktiviertes Plasminogen	36
3.2.1	Streptokinase-Konzentration	36
3.2.2	Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Temperatur	41
3.3	Auswirkung des Guanidins auf den ELISA-Test	43
3.4	Nachweis von Hamster-PrP: nativ und denaturiert	44
3.5	PrP-Nachweis im Plasma mit N-Hirn	46
3.6	PrP-Nachweis im Plasma mit S-Hirn	49
3.7	Vergleich der Ergebnisse von normalen und pathologischen Proben	52
4	Diskussion	57
5	Zusammenfassung	63
6	Abkürzungsverzeichnis	64
7	Abbildungen und Tabellen	65
7.1	Abbildungen	65

7.2	Tabellen.....	65
8	Literaturverzeichnis.....	66
9	Danksagung.....	82
10	Lebenslauf.....	83
11	Erklärung.....	84

1 Einleitung

1.1 Prionkrankheiten

1.1.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Tieren und Menschen

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) bilden eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die Menschen wie Tiere betreffen. Diese Erkrankungen können als sporadische, vererbte oder iatrogene Krankheiten auftreten. Die humanen TSE schließen Kuru (53); das Gerstmann–Sträussler–Scheinker-Syndrom (GSS) (54); die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI) (96) und die Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (CJD) (42) ein, welche die bedeutendste Prionerkrankung bei Menschen ist. Eine Übersicht der bisher beschriebenen TSE zeigt Tabelle 1. Alle diese Krankheiten stellen eine Gruppe von schnell progredienten Erkrankungen dar, deren Krankheitsverlauf mit zentralnervösen Störungen wie Ataxie und progressiver Demenz einhergeht und die immer zum Tode führen. Gehirne von an TSE erkrankten Lebewesen weisen histopathologisch folgende Trias auf: Verlust von Nervenzellen, schwammartige (spongiöse) Auflockerungen des Neuropils und Astrogliose. Darüber hinaus fehlt eine Entzündungsreaktion. Ablagerungen von Amyloid-Plaques können auftreten.

TSE	Erst beschrieben	von
Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (CJD)	1920	Creutzfeldt (42)
Sporadische Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (sCJD)	1921	Jakob (74)
Familiäre Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (fCJD)	1924	Kirschbaum (78)
Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrom (GSS)	1928	Gerstmann (54)
Kuru	1957	Gajdusek and Zigas (53)
Iatrogene Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (iCJD)	1974	Duffy (48)
Tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI)	1986	Lugaresi (96)
Neue Variante der Creutzfeldt–Jakob Erkrankung (vCJD)	1996	Will (163)
Sporadische familiäre Schlaflosigkeit (sFI)	1999	Mastrianni (100)

Tabelle 1. Humane TSE (nach 159, mit Modifikationen).

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wurden auch bei verschiedenen Säugetieren beschrieben. Dies sind im Einzelnen: Scrapie in Schafen und Ziegen (101) die feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) in Katzen (168), die transmissible Mink-Enzephalopathie bei Nerzen (TME) (25), die “chronic wasting disease“ bei wilden Wiederkäuer (CWD) (164), die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern (162) und Enzephalopathien bei einer Reihe von Zootieren (z.B. exotic ungulate encephalopathy, EUE- Enzephalopathie bei exotischen Huf-

tieren) (75, 77). Ein charakteristisches Kennzeichen all dieser Erkrankungen ist die Akkumulation einer abnormalen, teilweise Proteinase-resistenten Isoform des zellulären Prion Proteins (PrP^{C}), welches ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein darstellt (153). Das PrP -Gen ist unter den Säugetieren stark konserviert (140) und wird in mehreren Geweben mit besonders hohem Spiegel im Gehirn exprimiert (84, 108). Die Umwandlung des eigenen PrP^{C} in die abnormale, krankheitsinduzierende Isoform (PrP^{Sc}) erzeugt konformationelle Änderungen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen (128). Zur Natur des Krankheitserregers wurden in der Vergangenheit verschiedene Hypothesen aufgestellt, die in Kapitel 1.2 näher beschrieben werden.

1.1.2 BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Erste Verdachtsfälle von BSE wurden bereits 1985 von Wells et al. berichtet und 1986 histopathologisch bestätigt (162). Seitdem ist die Zahl der in Europa dokumentierten BSE-Fälle bis März 2005 auf ca. 185.000 angestiegen, wobei fast 99 % der Erkrankungen in Großbritannien auftraten. Epidemiologische Daten lassen annehmen, dass das Auftreten der Rinderseuche auf die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl aus infektiösen Rinderkadavern bzw. Schlachtabfällen von Schafen zurückzuführen ist. Seit 1988 ist es in England daher verboten, Tiermehle an Wiederkäuer zu verfüttern und seit 1996 besteht dieses Verbot für sämtliche Nutztiere. Seit 1993 nimmt die Zahl der Neuinfektionen in England stark ab. Da die Inkubationszeit bei 4 bis 5 Jahren liegt, kann auch zukünftig von sinkenden Fallzahlen ausgegangen werden.

Im Mai 1990 wurde in Großbritannien ein systematisches Überwachungsprogramm für CJD-Fälle eingerichtet (National vCJD Surveillance Unit), um mögliche Auswirkungen der BSE-Epidemie auf den Menschen zu erfassen.

Im März 1996, ungefähr 10 Jahre nach Ausbruch der Rinderseuche, wurde erstmals eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) bei 10 erkrankten Briten und einem Patienten in Frankreich beschrieben (34, 163). Der Verdacht, dass vCJD auf den Verzehr von BSE-infizierten Rinderschlachtprodukten zurückzuführen ist, wurde experimentell durch die Übertragung von BSE auf Makaken erhärtet (89). Einen weiteren Hinweis bot das vergleichbare Glykosylierungsmuster der pathogenen Form des Prionproteins bei CJD und vCJD (40). Seitdem verschiedene TSE-Stämme wie BSE, vCJD und die klassische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit auf Mausstämmen bzw. transgene Mäuse übertragen und die stammspezifischen Inkubationszeiten und histopathologischen Befunde verglichen wurden, gilt es als sehr wahrscheinlich, dass BSE und vCJD durch denselben Erreger verursacht werden (23, 71, 143).

1.1.3 Übertragung von vCJD durch Blut

Die Möglichkeit der Übertragung von vCJD durch Bluttransfusion wurde anhand von vier Fällen in England demonstriert. Diese wurden in Rahmen des o.g. Überwachungsprogrammes identifiziert.

Ein 62-Jahre alter Patient, bekam 1996 intraoperativ fünf Erythrozytenkonzentrate. Eines dieser nicht leukozytendepletierten Konzentrate stammte von einem 24-Jahre alten Spender, der zur Zeit der Spende als gesund eingestuft wurde. Im Jahr 2000 verstarb der Spender an bestätigtem vCJD. Der Rezipient entwickelte 6,5 Jahre nach der Transfusion vCJD-Symptome und verstarb 16 Monate später an vCJD. Die Diagnose wurde post mortem bestätigt (95). Die Übertragung durch die Transfusion könnte nicht bewiesen werden, war jedoch sehr wahrscheinlich, wenn man die niedrige statistische Koinzidenzwahrscheinlichkeit für eine Infektion über die Nahrungskette betrachtet (1:15 000 – 1:30 000).

Der zweite Fall war ein älterer Patient, der ein nicht leukozytendepleiertes Erythrozytenkonzentrat bekam. Dieses Erythrozytenkonzentrat wurde von einem Spender gewonnen, der 18 Monate später vCJD-Symptome entwickelte und an bestätigtem vCJD im Jahr 2001 verstarb. Der Empfänger verstarb fünf Jahre nach dieser Transfusion aufgrund eines rupturierten Aortenaneurysma ohne klinische Zeichen neuro-psychiatrischer Störungen. Aufgrund der bekannten vCJD-Erkrankung des EK-Spenders wurde post mortem eine histopathologische Untersuchung durchgeführt, in deren Ergebnis das vCJD-Agens in Milz und Halslymphknoten nachgewiesen wurde. Eine Beteiligung des ZNS wurde nicht diagnostiziert. Bemerkenswert ist des Weiteren, dass, im Gegenteil zu allen früher diagnostizierten vCJD-Patienten, dieser Patient heterozygot (M/V) im Codon 129 (123) war.

Der dritte Fall wurde 2006 ebenfalls aus England berichtet. Der Patient entwickelte vCJD-Symptome 7 Jahre und 10 Monate nach der Transfusion eines nicht leukozytendepleierten EK. Der Spender zeigte klinische vCJD-Symptome bereits 21 Monate nach der Spende (69, 167).

Im Januar 2007 wurde noch ein Verdachtsfall an transfusionsassoziiertes vCJD (66) berichtet. Ein Patient entwickelte vCJD-Symptome 8,5 Jahre nach einer EK-Transfusion. Der Spender des EK zeigte hier klinische vCJD-Symptome 17 Monate nach dieser Spende.

Die berichteten Fälle führten zur Schlussfolgerung, dass die Übertragung des vCJD-Erregers durch zelluläre Blutprodukte möglich ist. Im deutschen Blutspendewesen wurde daraufhin eine Reihe von Sicherheitsmaßnahmen getroffen. Dies sind unter anderem Spenderausschluss von Personen mit dem Risiko der Übertragung spongiformer Enzephalopathien (131), d.h.:

- nach Behandlung mit aus menschlichen Hypophysen gewonnenen Hormonen,
- nach Erhalt von Dura-mater- bzw. Korneatransplantaten,

- bei nachgewiesener oder einem Verdacht auf TSE (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder andere TSE),
- wegen eines familiären Risikos, eine TSE zu entwickeln (bekannte Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder eine andere TSE bei einem oder mehreren Blutsverwandten),
- nach einem Aufenthalt im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland von insgesamt mehr als 6 Monaten in den Jahren 1980–1996,
- nach einer Operation und/oder Transfusionen (Blutkomponenten) im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland nach dem 01.01.1980.

1.2 Erreger der Prionkrankheiten

Zur Natur des Krankheitserregers wurden in der Vergangenheit verschiedene Hypothesen aufgestellt. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei den spongiformen Enzephalopathien um "slow virus diseases" handeln würde. Doch trotz intensiver Suche konnte keine pathogene Nukleinsäure gefunden werden. Der Erreger erwies sich als ungewöhnlich resistent gegen UV- und ionisierende Strahlung, hohe Temperaturen und Chemikalien, so dass schon in den sechziger Jahren andere Erregerformen angenommen wurden (2).

Prusiner führte 1982 die Bezeichnung "Prion" als Abkürzung für "proteinaceous infectious particle" ein, um das infektiöse Agens von herkömmlichen Krankheitserregern wie Bakterien und Viren zu unterscheiden (128). Die von ihm aufgestellte Prionhypothese postuliert, dass dieses Prion lediglich aus Proteinen besteht. Nach dieser Hypothese setzt das Prion seine Replikation selbst ohne Vorhandensein von Nukleinsäuren fort, indem es als pathologische infektiöse Isoform eines physiologischen Proteins mit letzterem interagiert. Diese Interaktion soll zur posttranslationalen Umfaltung des physiologischen Prion Proteins PrP^C in die pathologische Form PrP^{Sc} führen und damit letztlich zu deren Akkumulation.

In mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) versetzten Hirnhomogenisaten von Scrapie-infizierten Tieren ließen sich elektronenmikroskopisch makromolekulare Strukturen nachweisen, die als Scrapieassoziierte Fibrillen (SAF) oder "prion-rods" bezeichnet wurden (104). Untersuchungen dieser infektiösen Ablagerungen führten zur Entdeckung eines Protease-resistenten Proteins von 27 bis 30 kDa, das als PrP^{res} oder PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet wurde (12). Antikörper gegen PrP²⁷⁻³⁰ erwiesen sich auch als immunreaktiv gegen Amyloid-Plaques in Hirnen von CJD-Patienten und Scrapie-infizierten Tieren (9, 79).

Auf der Suche nach einer für PrP²⁷⁻³⁰ kodierenden Nukleinsäure stieß man überraschenderweise auf PrP-spezifische mRNA in Scrapie-infizierten und –nicht-infizierten Tieren (35, 113), die jedoch nicht in den aufgereinigten Scrapie-Erregerpräparationen nachweisbar war. Oesch et al.

konnten 1985 zeigen, dass das Prionprotein von einem in einzelner Kopie vorliegenden zellulären Gen kodiert wird (113). Das Produkt dieses Gens ist ein als zelluläres Prionprotein (PrP^{C}) bezeichnetes Protein von 33-35 kDa, das entweder nicht glykosyliert, mono- oder diglykosyliert vorliegt (13, 64). Es stellte sich heraus, dass PrP^{27-30} den Protease-resistenten Kern des pathogenen Prionproteins (PrP^{Sc}) darstellt, welches die gleiche Primärstruktur wie PrP^{C} aufweist (6). Da der offene Leserahmen bisher bekannter Prionproteingene auf einem Exon liegt, kann die Entstehung von PrP^{C} und PrP^{Sc} durch alternatives Prozessieren der mRNA ("Splicing") somit ausgeschlossen werden (6).

1.2.1 Zelluläres physiologisches Prionprotein (PrP^{C})

PrP^{C} ist ein normales Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Membranprotein (153). Es ist stark konserviert unter den Säugetieren (140) und wird in mehreren Spezies (wahrscheinlich in allen Wirbeltieren) (55, 65, 165) und Geweben, mit besonders hohem Spiegel im Gehirn, exprimiert (84, 108). PrP mRNA wird konstitutiv in den Gehirnen von erwachsenen Tieren exprimiert, mit höchstem Spiegel in den Neuronen (84). Es wurden auch größere Konzentrationen an PrP^{C} im Herz (20), in der Skelettmuskulatur (15, 19), im Lymphgewebe und in Leukozyten (93, 116), im Darmgewebe (107) und in Uterus und Testes (155) nachgewiesen. Das humane PrP -Gen (Prnp-p) wurde 1986 auf der 20p12-pter entschlüsselt (92, 133, 150). Die räumliche Struktur des Maus- PrP^{C} wurde zuerst durch Nuklearmagnetresonanz-Studien bestimmt (132). Seitdem wurden NMR-Messungen am rekombinanten PrP^{C} aus verschiedenen Spezies durchgeführt und globale Strukturähnlichkeiten festgestellt. Das PrP^{C} hat eine flexible, unstrukturierte N-terminale Region und eine gut strukturierte C-terminale Globulardomäne mit drei α -helikalen Strukturen und zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen (132). Die N-terminale Region enthält ein Segment von mehreren „octapeptide-repeat“ Regionen, die vorzugsweise Kupfer-Ionen binden (73). (Abbildung 1.). Durch Infrarot-Spektroskopie und „circular dichroism“ wurde demonstriert, dass die sekundäre Struktur von PrP^{C} hauptsächlich aus α -helikalen Strukturen (42%) besteht, wohingegen PrP^{Sc} hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen besteht (36).

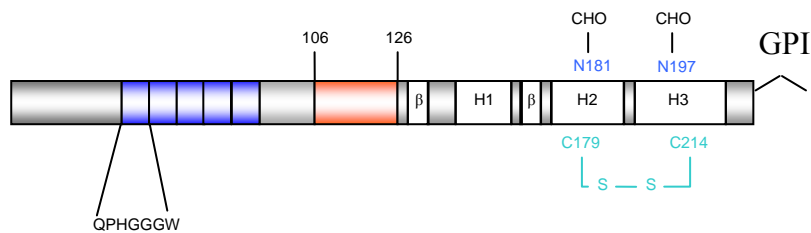


Abbildung 1. Schematische Darstellung der PrP^C-Struktur.

β: β-Faltblattstrukturen; H1-H3: α-Helices. Es sind die Octapeptide (blau) und deren Aminosäuresequenz dargestellt, sowie die beiden Positionen zum N-Glykosylieren (N181 und N197) und die Disulfidbrücke (C179-C124). Das Protein ist durch Glycosylphosphatidylinositol an der Zellmembran verankert („GPI-anchor“).

Während das PrP^C in Hamster und Maus als ein Präkursor von 254 Aminosäuren synthetisiert wird, kodiert das humane Prnp-p ein Prionprotein von 253 Aminosäuren. Das N-terminale Signalpeptid von 22 Aminosäuren wird im endoplasmatischen Retikulum abgespalten (72) und der C-terminale Rest von 23 Aminosäuren wird nach der GPI-Bindung bei Serin231 entfernt (152). Verschiedene Studien mit Zellkulturen haben offen gelegt, dass PrP^C normalerweise zwischen der Zelloberfläche und einem endozytosem Kompartiment mit einer Übergangszeit von etwa 60 Minuten zirkuliert. Es wurde auch klar, dass mehr als 95 % des internalisierten Proteins zurück an die Zelloberfläche transportiert wird (146).

Die Funktion von PrP^C ist noch nicht endgültig geklärt. Zum Teil widersprüchliche Arbeiten erschweren es, die Funktion von PrP^C zu beschreiben. Die möglichen Funktionen von PrP^C sind:

- neuroprotektive Funktion durch antiapoptotische Aktivität (16, 47),
- funktionale Rolle im Kupfermetabolismus aufgrund seiner Kupferbindungskapazität (18),
- Beteiligung an der Signalübertragung (82, 109),
- Beteiligung an der Gedächtnisformierung (39) sowie
- Neurogenesis (57).

Transgene Mäuse, deren Prionproteingen (Prnp) inaktiviert wurde, zeigten eine normale Entwicklung ohne gravierende Verhaltensstörungen oder anatomische Auffälligkeiten (24, 99). Einige Autoren beschrieben allerdings phänotypische Auffälligkeiten bei diesen so genannten "Knockout"-Mäusen (Prnp^{0/0}-Mäusen). Collinge et al. fanden elektrophysiologische Veränderungen (41), die jedoch in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnten (67, 94). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass Prnp^{0/0}-Mäuse eine Verringerung der Calcium-aktivierten Kaliumströme zeigen und damit einen veränderten intrazellulären Calciumhaushalt aufweisen (68). Des Weiteren wird dem PrP^C auch eine gewisse Rolle in der Lymphozytenaktivierung (27) und eine protektive Wirkung bei oxidativem Stress (160) zugeschrieben.

1.2.2 Die pathogene Form des Prionproteins (PrP^{Sc}) und deren Replikationsmechanismus

In an TSE-erkrankten Individuen wird die zelluläre physiologische Isoform des PrP (PrP^C) in die pathogene Isoform (PrP^{Sc}) umgewandelt. PrP^{Sc} zeigt eine hohe Resistenz gegenüber Radiation und Nukleasen (2), die vor allem durch den hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen und der damit verbundenen verminderten Löslichkeit und hohen Protease-Resistenz (37) zu erklären ist. Die Verdauung des PrP^{Sc} mit Proteinase K ergibt ein 27-30 kDa Fragment (ca. 141 Aminosäuren), bezeichnet als PrP^{res} oder PrP²⁷⁻³⁰ (11). Die Behandlung von physiologischem PrP^C mit der gleichen unspezifischen Protease führt hingegen zur vollständigen Proteolyse. Dieses unterschiedliche Verhalten ist im Rahmen des PrP^{Sc}-Nachweises von sehr großer Bedeutung.

PrP²⁷⁻³⁰ ist ungewöhnlich stabil bei hohen Temperaturen und kann nur durch Proteindenaturierung (z.B. mit 1 M NaOH), welche die Struktur des PrP²⁷⁻³⁰ angreift und teilweise zerstört, inaktiviert werden (127). Nach einer Behandlung mit Detergenzien und Protease, wurde beobachtet, dass PrP²⁷⁻³⁰ in scrapieassoziierte Fibrillen (SAF) oder "prion-rods" polymerisiert. Diese Fibrillen sind in wässrigen und organischen Lösungsmitteln sowie in nichtionischen Detergenzien nicht löslich. Im Gegenteil, PrP^{Sc} (die infektiöse Isoform des PrP^C-Moleküls mit voller Länge) neigt eher zur Aggregation (101) (Tabelle 2.).

PrP^C und PrP^{Sc} stimmen in der Primärstruktur überein und weisen keine unterschiedlichen kovalenten Bindungen auf (151). Untersuchungen wie die Fourier-Transformationsspektroskopie ergaben, dass PrP^C und PrP^{Sc} lediglich in ihrer Konformation differieren. Dabei besteht die Struktur von PrP^C zu etwa 42 % aus α -helikalen Anteilen und wenigen β -Faltblattstrukturen (ca. 3 %), während dagegen PrP^{Sc} mit etwa 45 % einen hohen Anteil von β -Faltblattstrukturen aufweist (Tabelle 2.) (117).

Das Zellkompartiment, in dem die Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise, dass sie entweder in einem späten endosomalen Kompartiment oder in den Lysosomen abläuft (3, 90, 156). Andere Arbeiten deuten auf eine Umfaltung an der Zelloberfläche oder entlang des Weges von der Zellmembran zu den Lysosomen hin (14, 30, 31). Das neu gebildete PrP^{Sc} akkumuliert in den Endosomen oder sekundären Lysosomen und zeigt, sofern überhaupt nachweisbar, nur einen sehr langsamen Katabolismus (29).

Zwei Modelle zur Replikation von PrP^{Sc} werden diskutiert. Beide Modelle wurden in einer kinetischen Analyse anhand biophysikalischer Kriterien als gleich wahrscheinlich angesehen (49):

- Das "refolding" (oder auch „catalytic“-)Modell nach Prusiner beruht auf der Annahme, dass PrP^C unter dem Einfluss von PrP^{Sc} zunächst entfaltet und dann neu zu PrP^{Sc} gefaltet wird.

Die für diesen Umfaltungsprozess benötigte Aktivierungsenergie wird dabei durch die Katalyse von PrP^{Sc} bereitgestellt (128).

- Das "nucleation"- oder "seeding"-Modell nach Lansbury (86) nimmt an, dass sich PrP^C in einem Gleichgewichtszustand mit PrP^{Sc} bzw. einem PrP^{Sc}-Vorläufer befindet, wobei das Gleichgewicht mehr auf der Seite des stabileren PrP^C liegt. Wenn ein PrP^{Sc}-Aggregat ("seed") vorliegt, verschiebt sich das Gleichgewicht zunehmend zugunsten von PrP^{Sc}, das dann stabilisiert wird und sich an das PrP^{Sc}-Aggregat anlagert. Das Aggregat erfährt dadurch eine fortlaufende Polymerisierung. Die initiale Aggregatbildung wird als kinetisch kontrollierter, extrem langsam ablaufender Prozess angesehen. Nach der Entstehung des Aggregats kommt es allerdings zur schnellen Addition von PrP^C und Vervielfältigung des pathogenen Agens (86).

Schließlich sei auf die Arbeiten von Legname et al. aus dem Jahr 2004 hingewiesen (91). Sie konnten zeigen, dass das rekombinante Maus-PrP^C (Aminosäuresequenz 89-230) in vitro in eine infektiöse Isoform umgewandelt werden kann. Diese Isoform ist dann in der Lage, einen Prionkrankheitähnlichen Phänotyp zuerst in transgenen Mäusen und in der zweiten Passage auch in Wild-Typ-Mäusen auszulösen.

Einen zusammenfassenden Vergleich der biochemischen Charakteristika von PrP^C, PrP^{Sc} und PrP²⁷⁻³⁰ zeigt Tabelle 2.

PrP Isoform	PrP^C	PrP^{Sc}	PrP²⁷⁻³⁰
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös	infektiös
Protease-Resistenz	sensitiv	teilweise resistent	resistent
Löslichkeitsverhalten	löslich	nicht löslich	nicht löslich
Aggregationsstatus	Monomer/ Dimer/Oligomer	Aggregate	Scrapieassoziierte Fibrillen (SAF) oder "prion-rods"
Sekundäre Struktur	α -helices (42%), β -sheets (3 %)	α -helices (30 %), β -sheets (43 %)	α -helices (21 %), β -sheets (54 %)

Tabelle 2. Vergleich der biochemischen Charakteristika von PrP^C, PrP^{Sc} und PrP²⁷⁻³⁰ (nach 159, mit Modifikationen).

1.3 Diagnostik von TSE und Bedeutung für die Blutspende

Angesichts der BSE-Epidemie und der Möglichkeit der Übertragung von vCJD durch Bluttransfusionen ist die Frage des Nachweises von vCJD bzw. allgemeinen TSE-Risiken in präklinischen Stadien von enormer Bedeutung.

Die klinische Diagnose von vCJD kann an symptomatischen Individuen durch den PrP^{Sc}-Nachweis in den Tonsillen erfolgen (70, 71). Eine sichere Bestätigung der vCJD durch den histologischen Nachweis von Amyloid-Plaques bzw. durch die Detektion von PrP^{Sc} in Hirngewebe ist jedoch nur nach Hirnbiopsie mittels Western Blot oder eine post mortem-Autopsie möglich und somit als diagnostisches Mittel für die Blutspende nicht relevant.

Während klinisch bzw. histologisch gesicherte vCJD-Erkrankung zum Ausschluss des betroffenen Spenders von der Blutspende führt, stellen asymptomatische, aber infizierte Spender großes Problem der Sicherheit von Blutprodukten dar (144). Daher hat die Entwicklung von sensitiven Screening-Tests höchste Priorität. Das Hauptziel eines solchen Tests ist es, so früh wie möglich, d.h. noch vor Ausbruch der klinischen Symptome, eine Infektion nachzuweisen. Die Entwicklung eines Routine-Bluttests zur Diagnose von vCJD ist sehr schwierig, da eine Reihe von Problemen zu lösen sind.

Einerseits ist die Konzentration des infektiösen Agens im Blut wahrscheinlich viel niedriger als im ZNS. Die Konzentration von PrP^{Sc} im peripheren Blut wird im fg/ml- bis unteren pg/ml-Bereich geschätzt (21, 22). Da bei einer Bluttransfusion das transfundierte Volumen über 250 ml beträgt, kann eine Übertragung schon mit sehr niedrigen Konzentrationen des infektiösen Agens stattfinden. Daher müssen mögliche Bluttests über eine exzellente analytische Sensitivität verfügen.

Andererseits ist wenig über die Verteilung und Form (Monomere oder Oligomere bzw. Polymere oder Aggregate) des PrP^{Sc} im Blut bekannt. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass der Hauptteil des infektiösen Agens in der Leukozytenfraktion kumuliert, aber auch das Plasma infektiöse Prionen enthält (21, 22). Aus diagnostischer Sicht problematisch ist der Umstand das auch die normale Isoform des Prionproteins (PrP^C) in Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma nachgewiesen wird und zwar in viel höherer Konzentration als das PrP^{Sc}. Deswegen muss ein Bluttest sehr selektiv sein, d.h. eine hohe Spezifität besitzen.

Die gängigen Methoden zur Entwicklung von Blut-Tests basieren entweder auf dem direkten Nachweis von PrP^{Sc} oder auf dem Nachweis von vCJD-assoziierten Markern („surrogate markers“) (58). Die Suche nach alternativen Markern führte in den letzten Jahren zu ersten Resultaten. So konnten Zusammenhänge zwischen den neuronalen Markern, wie Protein 14-3-3 (59, 158), Neuron-spezifischer Enolase (1), Protein S100B (7, 60), „glial acidic fibrillar protein“

(106, 115), Tau-Protein (114) und sowie Prionine (135) und PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Keiner von diesen Markern hat sich jedoch als ausreichend spezifisch und sensitiv für eine frühe präklinische Diagnose erwiesen. Einige Stoffwechselmarker (z. B. Prostaglandin E2, C-reaktives Protein) wurden, jedoch ohne wesentlichen Erfolg, ebenfalls untersucht (121). Anfangs wurde auch der „Erythroid differentiation related factor“ (EDRF) als viel versprechend angesehen (105), konnte aber als spezifischer Marker in einer Folgeuntersuchung nicht bestätigt werden (56).

Einige Arbeitsgruppen haben rein physikalische Methoden entwickelt, die auf der Serumanalyse durch Fourier-Transformationsspektroskopie und nachfolgender Datenbearbeitung durch ein Neuronennetzwerk basieren (26, 87, 88). Die Methode zeigte eine hohe Sensitivität (>90 %) und Spezifität beim BSE-Nachweis in Rindern. Es ist jedoch noch unklar, inwieweit die Ergebnisse routinetauglich und auf den PrP^{Sc}-Nachweis im Blut übertragbar sind.

Große Hoffnungen hat in letzter Zeit die PMCA-Methode von Soto et al. (136) geweckt. PMCA steht für „protein misfolding cycling amplification“. Bei diesem Verfahren wird das PrP^{Sc} mit einem PrP^C-Überschuss inkubiert, um ein Wachstum der PrP^{Sc}-Aggregate zu ermöglichen. PrP^{Sc} wird dann durch Ultraschallbehandlung wieder dispergiert, so dass kleinere Einheiten entstehen, die ihrerseits die Entstehung neuer Aggregate fördern. Die amplifizierte Menge von PrP^{Sc} hängt direkt von der Anzahl der Inkubation/Ultraschall-Zyklen ab. Der spezifische Nachweis von PrP^{Sc} erfolgt dann mittels Western Blot-Technik nach Proteinase K-Verdauung und nachfolgender Denaturierung in SDS-Puffer (SDS-Sodium Dodecyl Sulfat). Experimentell gelang mittels PMCA ein Nachweis von Hamster-PrP^{Sc} in buffy-coats mit einer Sensitivität bis zu 89 % und einer Spezifität von 100 % (28, 135). Daher wird die PMCA-Technik als das meistversprechendste Testprinzip zur Entwicklung eines Bluttests angesehen. Leider wird die Bereitstellung eines praktikablen Tests noch durch mehrere technische Probleme verhindert. Schließlich sei auf einen Bericht der Supattapone-Gruppe hingewiesen, in dem das infektiöse PrP^{Sc} auch de novo durch PMCA in der Abwesenheit von präexistierenden Prionen generiert wurde (46).

In die andere Richtung, d.h. den direkten Nachweis des einzelnen spezifischen TSE-Markers, also des PrP^{Sc}, wurden in letzter Zeit ebenfalls verschiedene Strategien entwickelt. Diese kann man wie folgt unterscheiden:

- Verwendung von Liganden zur spezifischen Bindung von PrP^{Sc} im Blut. Beispiele dafür sind der 15B3-Antikörper von Prionics (82, 112) und das Seprion-Granulat der Firma Microsense (zurzeit als IDEXX-Test für die post mortem Diagnose im Einsatz). In beiden Fällen ist die Idee, das PrP^{Sc} aufgrund seines polymerisierten Zustandes anzureichern, um damit einen spezifischeren und sensitiveren Nachweis im ELISA bzw. in der Flow-Cytometry zu erreichen. Ein anderes Verfahren, entwickelt durch bioMérieux (Marcy l'Étoile, Frankreich) beruht auf

der Bindung und Aggregation der pathologischen Form des PrP durch Streptomycin (110). Nachfolgend wird dieses an einem speziellen „Molekülnetz“ immobilisiert und mittels Anti-PrP-Antikörpern nachgewiesen.

- Entwicklung immunologischer Tests zum Nachweis polymerisierten PrP (AS-ELISA: Aggregationspezifisches ELISA), basierend auf der Verwendung des gleichen Antikörpers zum Immobilisieren und zur Detektion (118). Die Sensitivität dieses Verfahren wurde durch das Kombinieren von Signalverstärkung (Fluoreszenz) und Analytanreicherung (vereinfachte PMCA) erhöht. Durch den Einsatz dieser Methode (genannt Am-A-FACTT) ist es der Gruppe von Man-Sun Sy gelungen, Prionaggregate im Plasma von Maus und Maultier, infiziert mit Scrapie bzw. mit „chronic wasting disease“- CWD, nachzuweisen (33). Ein ähnliches Verfahren (MDS- Multimer Detection System) wurde auch von der Firma PeopleBio (Seoul, Korea) entwickelt und zwar ohne Signalverstärkung und Analytanreicherung, weitere Einzelheiten sind bis dato nicht publiziert worden (166).
- Verwendung von fluoreszenz-markiertem Pallindrom-PrP-Peptiden zum Nachweis von fehlgefaltetem PrP (MPD- misfolded protein diagnostic; Pallindrom-Aminosäuresequenz, die von vorn und von hinten gelesen gleich bleibt). Bei diesem Verfahren wird das markierte Peptid bei Kontakt mit PrP^{Sc} erheblichen β -Konformationsänderungen ausgesetzt, welche die Fluoreszenzeigenschaften des Pyren-Markers verändern (63). Diese Methode erlaubte eine Abgrenzung zwischen TSE-infizierten und nichtinfizierten Tieren (119).

Lange Zeit wurde erwartet, dass Antikörper zwischen den beiden PrP-Isoformen unterscheiden können. Es erschienen mehrere viel versprechende Publikationen zu diesem Thema (44, 120, 172), jedoch konnten bis heute keine Antikörper identifiziert werden, die unter praktikablen Bedingungen das PrP^{Sc} in seiner nativen Form mit ausreichender Spezifität erkennen. Daher wurden indirekte Methoden zum Unterscheiden zwischen PrP^{Sc} und PrP^C in postmortalen Gewebextrakten entwickelt. Die von der EU-Kommission zugelassenen Screening-Tests zum post mortem Nachweis von BSE verwenden die verschiedenen biochemischen Eigenschaften beider PrP-Isoformen zum spezifischen Nachweis von PrP^{Sc} (58). Die meisten dieser Tests beruhen auf der Teilresistenz des PrP^{Sc} gegen die Verdauung durch proteolytische Enzyme, insbesondere Proteinase K (z.B. Prionics Test, Prionics, Zürich, Schweiz). Andere Hersteller verwenden als Nachweisprinzip die erhöhte Immunoreaktivität des PrP^{Sc} nach Denaturierung mit Guanidin, welche zur Freilegung von verdeckten Epitopen führt (z.B. CDI-5, InPro, San Francisco, USA) (138). HerdCheck BSE von IDEXX verwendet einen Aggregationspezifischen Ligand für PrP^{Sc}, welches damit ohne Proteinase K-Verdauung mit einem anti-PrP-Antikörper nach Denaturation nachgewiesen werden kann (142).

1.4 Plasmin und PrP

Das Plasminogen ist das Proenzym der aktiven Serinprotease Plasmin, dem zentralen Enzym des fibrinolytischen Systems. Der Hauptsyntheseort ist die Leber (10, 130, 139), obwohl eine Reihe von Zellen in der Lage sind, Plasminogen zu synthetisieren (Adrenalindrüsen, Nieren, Hirn, Testis, Herz, Lunge, Uterus, Milz, Thymus und Darm) (171). Gefunden wird es in den extravasalen Räumen vieler Gewebe. Das humane Plasminogen ist ein 92 kDa großes, einkettiges Glykoprotein, bestehend aus 791 Aminosäuren. Die Plasmakonzentration beim Erwachsenen beträgt um 200 mg/L. Das Molekül enthält 24 Disulfidbrückenbindungen und 5 Kringle-Strukturen (149). Plasminogen hat eine besonders hohe Affinität zu Lysin-Resten. Die Lysin-Bindungsstellen sind in den Kringle-Strukturen lokalisiert. Diese Strukturen, die auch mit Lysin-ähnlichen Liganden interagieren, sind auch auf anderen Proteine der Hämostase (97) und auch bei Apolipoprotein(a) identifiziert worden (103). Die katalytische Triade ist in der leichten Kette lokalisiert und besteht aus His603, Asp646, und Ser741. Plasmin hat eine engere Substratspezifität als Trypsin und spaltet C-Terminal bevorzugt bei Lys als bei Arg (125).

Die wichtigsten Aktivatoren des Plasminogens sind der Tissue-type (t)-Plasminogenaktivator und die Urokinase-type (u)-Plasminogenaktivator. Plasmin katalysiert die enzymatische Abbau des Fibrinablagerungen in dem Gefäßsystem (38) und hat Substratspezifität für mehrere andere Komponenten des extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Proteoglycane und Gelatine (141). Plasmin reguliert auch die Aktivität anderer Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen (111).

Einen der ersten Berichte über das Interagieren von Plasminogen und PrP lieferten Fischer et al. im Jahr 2000 (51). In Ihrer Publikation beschrieben sie eine selektive Bindung von Maus-PrP^{Sc} an immobilisierten Mausplasmaproteinen. Der spezifische Ligand wurde als Plasminogen identifiziert. Im Jahr 2001 erschien eine weitere Publikation von Maissen et al. zu dieser Thematik (98). In ihren Versuchen präzipitierte das an Beads immobilisierte humane Plasminogen nicht nur im Maushirnhomogenisat spezifisch PrP^{Sc}, sondern auch in Homogenisaten von an sCJD-erkrankten Menschen, von an Scrapie-erkrankten Schafe und von an BSE-erkrankten Rindern. Nach Elution des gebundenen Prions wurde dieses in Western Blot-Technik nachgewiesen.

Ein Jahr später hat die Arbeitsgruppe von Shaked festgestellt, dass die Bindung von PrP^{Sc} an den Serum-Komponenten (einschließlich Plasminogen) auf die spezifische Kombination von Detergenzien zurückzuführen ist (145). Die Autoren zeigten auf, dass die durch Fischer beschriebenen Extraktionsbedingungen eine lipid rafts-Auflösung verursachen („lipid rafts“- Cholesterin-reiche Mikrodomänen in der Zellmembran), die nachfolgend in der Aggregation von PrP^{Sc} resultieren.

Nach der Wiederholung der Experimente mit intakten Rafts konnte nur PrP^C und nicht PrP^{Sc} an den Beads nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass das normale Prionprotein an Serumproteine durch die nahe liegenden Raftkomponenten bindet.

Andere Wissenschaftler haben sich intensiv mit der Auswirkung des Prions auf die Plasminogenaktivierung auseinandergesetzt. In ihrer Arbeit haben Ellis et al. den Effekt des rekombinanten PrP (Kupfer-enthaltend: holo-PrP oder nicht- Kupfer-enthaltend: apo-PrP) auf die Plasminogenaktivierung durch u-PA und t-PA untersucht (50). Sie stellten fest, dass PrP keinen Effekt auf die uPA-Plasminogenaktivierung hat. Andererseits wurde die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin durch t-PA in der Anwesenheit von apo-PrP^C 280fach beschleunigt. Die Octarepeat-Region ist in diesen Effekt involviert. Die Stimulation von Plasminogen benötigt auch eine Interaktion zwischen PrP und t-PA. Wahrscheinlich sind die Bindungsstellen für t-PA und Plasminogen unterschiedlich.

Es wurde schließlich klar, dass humanes Plasminogen und PrP miteinander reagieren und einen Komplex formen. In ihrer Arbeit zeigen Kornblatt et al., dass dieser Komplex auch das rekombinante Schaf-PrP^C in zwei Fragmente spaltet: ein N- und ein C-terminales Fragment (81). Die Spaltung wird zwar durch Plasminogen beschleunigt, scheint aber nicht von Plasminogen abhängig zu sein. Hier wurde als Aktivator für Plasminogen t-PA verwendet.

Die Spaltung des humanen rekombinanten PrP^C durch Plasmin wurde auch in der Arbeit von Praus et al. nachgewiesen (126). Die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin durch t-PA kann von dem N-terminalen Segment des PrP^C stimuliert werden. Die Anwesenheit von niedermolekularem Heparin kann diese Umwandlung zusätzlich beschleunigen. Durch Proteinsequenzierung wurde auch die Primärspaltstelle für Plasmin im humanen PrP^C-Molekül festgestellt. Sie liegt zwischen Lysin110 und Histidin111.

Eine detaillierte Beschreibung der thermodynamischen und kinetischen Interaktionen zwischen dem bovinen rekombinanten PrP²⁵⁻²⁴² und dem humanen immobilisierten Plasminogen findet man in der Arbeit von Cuccioloni et al. (43). Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen nativem aufgereinigtem PrP²⁵⁻²⁴² und Plasminogen untersucht. Es konnte eine Interaktion (Komplexbildung) zwischen den beiden Partnern sowohl für das rekombinante, als auch für das native PrP^C, gezeigt werden. Die kinetischen und thermodynamischen Parameter werden dabei von pH und Glykosylierung beeinflusst. Das deglykosylierte native PrP^C zeigte ähnliche Parameter wie das rekombinante PrP.

Das PrP^C in normalem Hirn und Zellkulturen wird teilweise als N-terminal abgespaltene Form gefunden, genannt C1 und C2 (85, 170). Die Spaltung von rekombinantem PrP^C zu C1 kann in vitro durch Plasminogen mediiert werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch in

vivo das Plasminogen für die Generierung von C1-Fragment verantwortlich sein könnte. Das Spaltungsmodell, gefunden in Hirnlysaten oder anderen Geweben in Plasminogen-knock-out Mäusen, ist aber unverändert (5). Die Anwesenheit von C1-Fragmenten in Hirnhomogenisaten von Plasminogen-defizienten Mäusen im vergleichbaren Verhältnis zu PrP in voller Länge, wie es bei den Wildtyp-Tieren gefunden wurde, spricht dafür, dass andere Proteasen (z.B. ADAM10-85) zusätzlich zu Plasminogen für die PrP^C-Spaltung in vivo verantwortlich sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum immunologischen Nachweis von PrP^{Sc} die spezifischen biochemischen Eigenschaften der pathologischen Isoform verwendet werden: Verdauungsteilresistenz (Verdauung mit Proteinase K), Freilegen der verdeckten Epitope nach Denaturierung (Denaturieren mit Guanidin) Plasminogen-PrP^{Sc}-Bindung unter spezifischen Testbedingungen Spaltung des rekombinanten PrP^C und nicht der pathologischen Isoform durch Plasmin in (zumindest) zwei Teile.

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Spaltung des nativen PrP^C in humanem Plasma nach Aktivierung des endogenen Plasminogens in einem ELISA-Test nachzuweisen. Anschließend sollte untersucht werden, ob die pathologische, nicht durch Plasmin spaltbare Isoform des PrP nach Plasminspaltung der normalen Isoform in diesen Proben reproduzierbar und mit relativ wenig Zeitaufwand erfasst werden kann.

Dafür sollte zuerst eine sensitive Testmethode für PrP entwickelt und Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit gemäß labormedizinischer Standards validiert werden. Nachfolgend sollte die Plasminspaltung von PrP^C in einem ELISA-Test nachgewiesen und untersucht, und insbesondere die Auswirkung verschiedener Streptokinase-Konzentrationen und Reaktionstemperaturen auf die Plasminspaltung überprüft werden. Danach sollten Versuche durchgeführt werden, in den die Möglichkeit zum sensitiven Unterschied zwischen Proben mit PrP^C und Proben mit PrP^C und PrP^{Sc} untersucht wird. Für diesen Zweck werden vier verschiedene Ansätze gewählt: native Proben, mit Guanidin denaturierte Proben, Proben nach Plasminspaltung und Proben nach Plasminspaltung und Guanidin-Denaturierung. Danach werden die vier Ansätze bezüglich ihrer Sensitivität zum Nachweis von PrP^{Sc} verglichen. Abschließend soll ein effizientes Testverfahren zum Nachweis von PrP^{Sc} in humanem Plasma beschrieben und die Möglichkeit des Testeinsatzes im Blutspendewesen diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Reagenz	Firma	Katalog-Nr.
PBS	Pierce	28372
TBS	Pierce	28376
Carbonat-Bikarbonat	Pierce	28382
Tween ²⁰	Pierce	28320
Super Signal Femto Luminol	Pierce	37075
Streptavidin-HRP	Pierce	N200
Super Block	Pierce	37515
Sarkosyl	Sigma	61739
GuanidiumHCl	Sigma	G4505
Plasminogen	Haemochrom	41303
Streptokinase	ZLB Behring	Streptase 1 500 000
Aprotinin	Calbiochem	78432
Triton X-100	Sigma	870493

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Capture-Antikörper

Als „capture“-Antikörper wurde 3F4 eingesetzt. 3F4 ist ein monoklonaler Antikörper aus Aszitesflüssigkeit von Mäusen, die mit Hamster PrP^{Sc} immunisiert worden sind. 3F4 erkennt die Aminosäuresequenz 109-112 von PrP in den Spezies Mensch und Hamster, jedoch nicht von Mäusen (76). 3F4 wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. M. Baier, Robert-Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde für den ELISA-Test in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonat/Bikarbonat Puffer verwendet.

2.1.2.2 Detektor-Antikörper

Als Detektor-Antikörper wurde SAF32-Biotin der Firma SpiBio (Kat. Nr. CM189720-B) ausgewählt. Der Antikörper wurde vom Hersteller biotinyliert (4 mol Biotin/mol IgG). SAF32 ist ein monoklonaler IgG_{2b}-Mausantikörper und wurde gegen eine Aufbereitung von SAF (Scrapie assoziierte Fibrillen) vom infizierten Hamsterhirn hergestellt. Der Antikörper reagiert laut Hersteller mit PrP^C und PrP^{Sc} des Hamsters und Menschen und weist eine Kreuzreaktion mit Prion-Proteinen von Kuh, Maus, sowie Schaf auf. SAF32 erkennt die Octarepeat-Region (AS 58-92 in Human-PrP) in der N-terminalen Region des PrP-Moleküls. 200 µg des Antikörpers werden mit 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst, aliquotiert und bei -20 ± 2 °C aufbewahrt.

2.1.3 Proben

2.1.3.1 Humanes Plasma

Es wurden 10 ml Blut in Citrat-Röhrchen (Fa. Sarstedt) von gesunden Blutspendern aus dem Spenderkollektiv des Instituts für Transfusionsmedizin entnommen.

Unmittelbar nach der Herstellung wurde das Plasma 15 Minuten bei 2 500 g zentrifugiert, um ein plättchenarmes Plasma zu gewinnen. Die restlichen Zellen wurden durch erneutes Zentrifugieren (10 Minuten bei 10 000 g) abgesetzt. Der Überstand wurde entnommen, á 0,5 ml aliquotiert und bei -20 ± 2 °C aufbewahrt.

2.1.3.2 N-Hamsterhirnhomogenisat

Diese Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Baier aus dem Robert-Koch-Institut zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um 10%-Hirnhomogenisat von weiblichen Scrapie-infizierten Syrian Gold-Hamstern (Alter 112-140 Tage) in PBS/0,1% Sarkosyl.

2.1.3.3 S-Hamsterhirnhomogenisat

Diese Proben wurden freundlicherweise auch von Herrn Dr. M. Baier aus dem Robert-Koch-Institut zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um 10%-Hirnhomogenisat von weiblichen Scrapie-infizierten Syrian Gold-Hamstern (Alter 112-140 Tage) in PBS/0,1% Sarkosyl. Diese Tiere wurden intracerebral mit dem Scrapie-Stamm 263K inokuliert und im Endstadium der Krankheit terminiert.

2.1.3.4 Rekombinantes Human-PrP

Zur Validierung des Tests wurde rekombinantes humanes PrP der Firma Roboscreen verwendet. Es handelt sich um ein Hisitidin-markiertes humanes Prionprotein mit AS 23-231, exprimiert in E. coli BL21 und chromatographisch aufgereinigt auf Ni(II)-Nitriloacetataragose. Das Protein hat eine Länge von 218 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 23 908 Da.

Das Protein wird als Lyophilisat geliefert. Für unsere Zwecke wurde das huPrPrec in PBS aufgelöst und auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt, danach aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.4 Geräte und Material

Gerät bzw. Material	Firma	Modell bzw. Katalog-Nr.
Mikrotiterplattenreader (ELISA-reader)	TECAN	GENios
ELISA-Washer	TECAN	Columbus
Zentrifuge	Eppendorf	Eppendorf 5147
Wasserbad	PolyScience Inc.	5L
Vortex	Heidolph	ReaxTop
Mikrotiterplatten	Nunc	436110
Stabsonicator	Dr. Heilscher	UP100H

2.1.5 Puffer

Coatingpuffer	Ein Päckchen Carbonat-Bikarbonat wird in 1 L bidestilliertes Wasser aufgelöst. Der Puffer wird bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. pH 9,6.
PBS-Puffer	Ein Päckchen PBS wird in 1 L bidestilliertes Wasser aufgelöst. Der Puffer wird bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. pH 7,4.
TBS-Puffer	Ein Päckchen PBS wird in 1 L bidestilliertes Wasser aufgelöst. Der Puffer wird bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. pH 7,4.
Waschpuffer	TBS-Puffer mit 0,05% Tween ²⁰ und 0,5% Triton X-100. Der Puffer wird bis zu eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt.
ELISA-Puffer	SuperBlock 1:5 in PBS mit 0,05% Tween ²⁰ . Der Puffer wird unmittelbar vor dem Einsatz hergestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 ELISA

2.2.1.1 Design

Der ELISA-Test wurde als ein Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern konzipiert. Als Capture-Antikörper wurde der 3F4 ausgewählt. Die Spezifität dieses Antikörpers schließt humanes und Hamster-PrP ein. Das Epitop ist AS 109-112. 3F4 reagiert sehr gut mit PrP^C, aber nicht mit PrP^{Sc}. Das wird durch die Fehlfaltung des PrP^{Sc} erklärt, so dass die Bindungssequenz des Antikörpers verdeckt wird („buried core“). Nach Denaturieren und Entfalten des PrP^{Sc} zeigt 3F4 eine ähnliche Reaktivität wie mit PrP^C (124) (s. Kap. 3.3 und 3.4.).

Die ermittelte optimale Konzentration zum Beschichten („coaten“) der Mikrotiterplatten ist 1 µg/ml.

Als Detektor-Antikörper wurde der SAF32 ausgewählt. Dieser Maus-Antikörper hat eine breitere Spezifität als 3F4 und zwar gegenüber humanem, Maus, Hamster und bovinem PrP. SAF32 bin-

det N-terminal an dem Octarepeat-Region (AS 58-92). Er hat ein lineares Epitop und kann zwischen PrP^C und PrP^{Sc} nicht unterscheiden. Es wurde biotinyliertes SAF32 mit einem Biotinylierungsgrad von 4 mol Biotin/1 mol IgG eingesetzt. Dies erlaubt das Verzichten auf einen dritten Detektor-Antikörper, macht den Test einfacher und reduziert die unspezifischen Signale. Bei einem biotinylierten Antikörper kann man Konjugate aus Streptavidin-Enzym verwenden, die stärkere Signale produzieren, als bei einfachem Markieren mit Enzym. Als Detektor des SAF32-B wurde Streptavidin-poly-Peroxidase ausgewählt (Streptavidin-polyHRP). Das ist ein Polymer von HRP, gebunden an Streptavidin mit hohem HRP:Streptavidin Verhältnis.

Die Detektion der Signale erfolgt mittels Chemilumineszenz. Die Peroxidase wandelt das Substrat Luminol in ein Produkt um. Dabei wird Licht ausgestrahlt, welches durch das Messgerät (TECAN GENios) erfasst und quantifiziert wird. Die Auswertung der gemessenen Signale wird durch das Programm MAGELAN2 und Xfluor4 der Fa. Tecan durchgeführt.

Mit der Kombination 3F4/SAF32-B entsprechend den Epitopen beider Antikörper, sollten nur PrP-Moleküle erfasst werden, die zumindest die AS 52-112 haben. Nach erfolgter Spaltung des PrP-Moleküls durch Plasmin an der Primärspaltstelle Lys110, werden PrP von 3F4 nicht gebunden (Zerstörung des Epitops) und folglich mit SAF32-B auch nicht detektiert. Dies bedeutet, dass in diesem Test vom Design her nur nicht gespaltene PrP-Moleküle bzw. PrP-Moleküle mit zugänglichem Epitop für 3F4 nachweisbar sind. Da nur physiologische PrP-Moleküle durch Plasmin spaltbar sind, gehört die nachweisbare Fraktion im Wesentlichen zu PrP^{Sc}.

2.2.1.2 Testbeschreibung

Nachdem der Capture-Antikörper auf der Oberfläche der einzelnen Kavitäten adsorbiert wird, werden nach Absaugen der nicht gebundenen Antikörpern, die freien Bindungsstellen auf der Oberfläche gesättigt (Blocking). Dazu wird ein Blocking-Puffer verwendet, der kurz in der Platte inkubiert und abgesaugt wird.

Im nächsten Schritt werden die Proben, im Reaktionspuffer verdünnt, in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei bleiben die Proben zwei Stunden bei Raumtemperatur auf der Platte. In dieser Zeit binden die PrP-Moleküle an den adsorbierten monoklonalen Antikörpern. Danach werden die restlichen freien PrP sowie andere Substanzen in den Proben aus den Kavitäten ausgewaschen (Waschschritt).

Im nächsten Schritt wird der biotinylierte Detektor-Antikörper, vorverdünnt im Reaktionspuffer, zugegeben und die Platte für eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit bindet der Antikörper an die immobilisierten PrP-Moleküle und zwar an einem anderen Epitop.

Es folgt ein nächster Waschschrift. Danach wird das Konjugat Streptavidin-polyHRP in die Vertiefungen pipettiert und kurz inkubiert. Das Konjugat erkennt die Biotin-Moleküle an den Detektor-Antikörpern und bindet an diese. Nach einem erweiterten Waschschrift wird das Substrat (Luminol) zugegeben und die Signale nach 3 Minuten gemessen. Die Stabilität der Lichtausstrahlung beträgt 15 Minuten.

2.2.1.3 Allgemeines ELISA-Protokoll

Schritt	Beschreibung
Beschichten der Mikrotiterplatte	Der Capture-Antikörper wird in Coating Puffer bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. 100 µl/Kavität exakt auf den Boden mit Multipette pipettieren. Mit Klebefolie versiegeln, 16 Stunden bei 4°C inkubieren.
Blocken	Mikrotiterplatte mit Washer absaugen. 150 µl Super Block pro Kavität pipettieren. Sofort ausschütteln. 150 µl Super Block pro Kavität pipettieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Absaugen. Mit Klebefolie versiegeln und in Plastikbeutel mit Zippverschluss bei 4°C aufbewahren. Vor dem Einsatz zur Raumtemperatur bringen.
Proben	Proben in ELISA-Puffer verdünnen. 100 µl/Kavität pipettieren. Zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
Waschen	3x300 µl waschen in ELISA-Washer mit Waschpuffer.
Detektionsantikörper	Detektor-Antikörper in ELISA-Puffer auf 62,5 ng/ml verdünnen. 100 µl/Kavität von dem verdünnten Detektor-Antikörper pipettieren. Für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Klebefolie inkubieren.
Waschen	3x300 µl waschen in ELISA-Washer mit Waschpuffer.
Pipettieren des Konjugats	Streptavidin-poly-Peroxidase in ELISA-Puffer bis 150 ng/ml verdünnen. 100 µl/Kavität pipettieren. Für 18 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
Waschen	6x300 µl waschen in ELISA-Washer mit Waschpuffer.
Substrat	100 µl/Kavität von der Luminol-Arbeitslösung pipettieren.
Messen	Zwischen 3 und 15 Minuten danach mit TECAN GENios messen bei folgenden Einstellungen- Typ: Lumineszenz; Gain: 50, 100 oder 150

2.2.2 ELISA-Test-Validierung

Die Validierung des ELISA-Tests war ein Bestandteil dieser Arbeit. Es wurden auf der Grundlage laboratoriumsmedizinischer Standards (45) folgende Parameter geprüft:

- Optimale Konzentration des Detektor-Antikörpers
- Analytische Sensitivität
- Linearitätsbereich
- Präzision
- Richtigkeit

Das genaue Vorgehen ist im Kap. 3.1. beschrieben.

2.2.3 Auswirkung des Guanidins auf den ELISA-Test

Der 3F4-Antikörper kann PrP^{Sc} in nativem Zustand nicht binden. Für den Nachweis von PrP^{Sc} durch 3F4 im ELISA-Test muss das PrP^{Sc} denaturiert werden. Die Denaturierung wurde mit 4 M Guanidinhydrochlorid (Gdn) bei 37°C für eine Stunde durchgeführt, welches PrP^{Sc} denaturiert, sowie die Infektiosität der Scrapie-Probe beseitigt (8). Da Gdn sowohl die Antikörperbindung des Capture-Antikörpers an die Mikrotiterplatte, als auch die Bindung vom Antigen an die Antikörper beeinflussen würde, musste die Probe verdünnt werden, um eine Antikörperinteraktion eingehen zu können.

Es wurde eine Verdünnungsreihe von Citratplasma im ELISA-Puffer hergestellt. Zu 100 µl von jeder Probe wurde 100 µl 8 M Gdn zugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Proben weiterhin mit ELISA-Puffer verdünnt, so dass es folgende Endkonzentrationen von Gdn entstanden: 0,8 M; 0,4 M und 0,2 M. Nachfolgend wurde der ELISA-Test durchgeführt. Als Kontrolle dienten dieselben Proben ohne Zugabe von Gdn.

2.2.4 Spalten von PrP mittels aktiviertem Plasminogen

2.2.4.1 Plasminogen-Aktivität

Die Plasminogen-Aktivität (als % der Norm) der humanen Plasmaproben von gesunden Spendern wurde in einem Routinetest der Fa. Dade Behring auf dem BCS-Gerinnungsanalyser im Institut für Transfusionsmedizin gemessen. Als geeignet wurden nur diejenige Proben eingestuft, die Aktivitäten zwischen 70 % und 130 % aufwiesen.

2.2.4.2 Streptokinase

Als Aktivator für das plasmaendogene Plasminogen wurde Streptokinase ausgewählt. Die Streptokinase ist ein 47 kDa großes Protein, welches von den Streptococcen der Gruppen A, C und G sekretiert wird. Die Streptokinase trägt für die Virulenz der Streptococcen durch Umwandlung des Plasminogens in Plasmin bei. Plasmin seinerseits führt durch Fibrinolyse und Abbau von extrazellulärer Matrix und Basalmembrankomponenten zu einer bakteriellen Ausbreitung von der Primärinfektionsstelle (154).

Die Streptokinase katalysiert die Hydrolyse von Amidbrücken. Sie bildet einen equimolaren Komplex mit Plasminogen, welches danach zu Streptokinase-Plasmin umgewandelt wird. Sowohl der Streptokinase-Plasminogen-, als auch der Streptokinase-Plasmin-Komplex kann Plasminogen aktivieren. Als Ergebnis ihrer Wechselwirkung mit humanem Plasminogen wird die Streptokinase einer spezifischen Fragmentation unterworfen (17).

2.2.4.2.1 Optimale Konzentration

Die optimalen SK-Konzentrationen (als kU/ml) wurden folgenderweise ermittelt:

Zu 1,5 ml Plasma wurden 45 µl verschiedene Konzentrationen Streptokinase in PBS zugegeben und die Probe wurde bei 37°C in Wasserbad inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden je 250 µl Probe entnommen und mit 3 µl 200 mM Aprotinin für 10 Minuten gemischt um das Plasmin zu inaktivieren. Die Proben wurden danach 1:21 in ELISA-Puffer verdünnt und in ELISA ausgetestet. Als Kontrolle diente dieselbe Probe, die identisch behandelt wurde, aber statt SK wurde nur PBS zugegeben.

Um Änderungen in den Hintergrundsignalen zu erfassen, wurde auch SK in ELISA-Puffer zu den entsprechenden Endkonzentrationen untersucht.

2.2.4.2.2 Temperatur

Zu 1,5 ml Plasma wurden 45 µl optimale Konzentration (s. oben) Streptokinase in PBS zugegeben und die Probe wurde bei 4°C, 25°C, 37°C und 45°C inkubiert. In unterschiedlichen Zeitabständen wurden je 250 µl Probe entnommen und mit 3 µl 200 mM Aprotinin für 10 Minuten gemischt, um das Plasmin zu inaktivieren. Die 1:21 in ELISA-Puffer verdünnten Proben werden danach im ELISA-Test ausgetestet. Als Kontrolle diente dieselbe Plasmaprobe, die identisch behandelt wurde, der aber statt SK nur PBS zugegeben wurde.

2.2.5 PrP-Spaltung mittels Streptokinase-aktiviertes Plasminogen in „spiked“ Proben

In der vorgelegten Arbeit wurden als Modell zum Nachweis von pathologischen Prionen Gemische aus gepooltem Humanplasma und Hamsterhirnhomogenisaten aus gesunden und an Scrapie erkrankten Tiere im Terminalstadium verwendet.

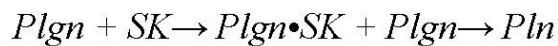
2.2.6 Herstellung von „spiked“ Proben

Das Hirnhomogenisat wurde für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, dann drei Mal für jeweils 10 Sekunden bei 30 % Intensität mit dem Stabsonicator (s. Kap. 2.1.4) behandelt. 150 µl des entsprechenden Homogenisats wurden danach 5 Minuten bei 750 g zentrifugiert und 100 µl des klaren Überstandes wurden mit 150 µl gepooltem Humanplasma gemischt. Danach wurden die Proben durch Faktor 2 bis 1:1280 im Plasma verdünnt. Das gepoolte Humanplasma hatte eine PrP-Ausgangskonzentration von 44,5 ng/ml.

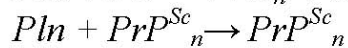
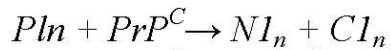
2.2.7 Probenbehandlung und Testverlauf

In Abbildung 2 ist der vollständige Testsverlauf schematisch präsentiert und in Abbildung 3 ist eine Übersicht der Probenbehandlung dargestellt. Jeweils 100 µl von den aufgestockten Proben wurden jeweils mit 3 µl SK (EK 44 kU/ml) bzw. PBS gemischt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Plasmins erfolgte durch Hinzugabe von 1 µl 200 mM Aprotinin. Die Proben wurden danach mit gleichen Volumina 8 M GdnHCl bzw. PBS gemischt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend, die 1:20 in ELISA-Puffer verdünnten Proben, wurden in ELISA parallel ausgetestet. Der Test wurde an drei Tagen unabhängig voneinander durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen in der statistischen Analyse weiterverwendet.

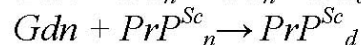
1. Plasminogenaktivierung



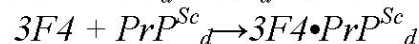
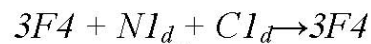
2. Spaltung von PrP



3. Denaturierung



4. Immobilisieren



5. Nachweis

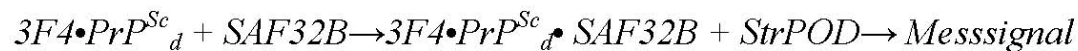


Abbildung 2. Testdesign

Im ersten Schritt bildet das Plasminogen (Plgn) mit Streptokinase (SK) einen Komplex, der Plasminogen in Plasmin (Pln) umwandelt.

Im zweiten Schritt wird die normale Isoform des PrP (PrP^C) durch Plasmin bei seiner Primärsplattstelle in zwei Teile gespalten: AS 23-110 (N1) und AS111-231 (C1). *N* steht für nativ. Da die Primärsplattstelle des Plasmins in der pathologischen Form des PrP (PrP^{Sc}) durch die Fehlfaltung nicht zugänglich ist, bleibt diese weitgehend intakt.

Im dritten Schritt werden die PrP-Moleküle entfalten: durch die Zugabe von Guanidin werden sowohl beide Fragmente N1 und C1, als auch das ganze PrP^{Sc} denaturiert- *d* steht für denaturiert. Dadurch wird das Epitop für 3F4 (AS109-112), beibehalten im PrP^{Sc} , zugänglich.

Im vierten Schritt binden die entfaltenen PrP^{Sc} -Moleküle am immobilisierten moAk 3F4 in der Mikrotiterplatte. Die N1- und C1-Segmente enthalten das 3F4-Epitop nicht und werden ausgewaschen.

Im fünften Schritt werden die immobilisierten PrP-Moleküle durch SAF32-Biotin (SAF32B) erkannt (an Octarepeat-Region) und der Ak bindet an diesen. Das zugegebene Polymerkonjugat Streptavidin-Polyperoxidase (StrPOD) bindet an das Biotin von SAF32 und bei der Umwandlung des Substrats von den Peroxidasen entsteht Licht, welches als Messsignal erfasst wird.

Sowohl die normalen als auch die pathologischen Proben wurden mit SK und Gdn in unterschiedlichen Kombinationen behandelt. Der Effekt jeder Behandlung wird als Verhältnis der gemessenen Signale dargestellt: mit Behandlung/ohne Behandlung.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung beider Probentypen dargestellt und anschließend verglichen.

Folgende Verhältnisse wurden festgelegt:

$$1) \text{ Plasmin-Effekt} = \frac{P + SK - G}{P - SK - G}$$

$$2) \text{ Guanidin-Effekt} = \frac{P - SK + G}{P - SK - G}$$

$$3) \text{ Plasmin-Effekt mit Guanidin} = \frac{P + SK + G}{P - SK + G}$$

$$4) \text{ Guanidin-Effekt mit Plasmin} = \frac{P + SK + G}{P + SK - G}$$

wobei P ist Probe, + bzw. - ist mit bzw. ohne Behandlung, SK ist Streptokinase-Aktivierung des Plasminogens, G ist Guanidin-Behandlung.

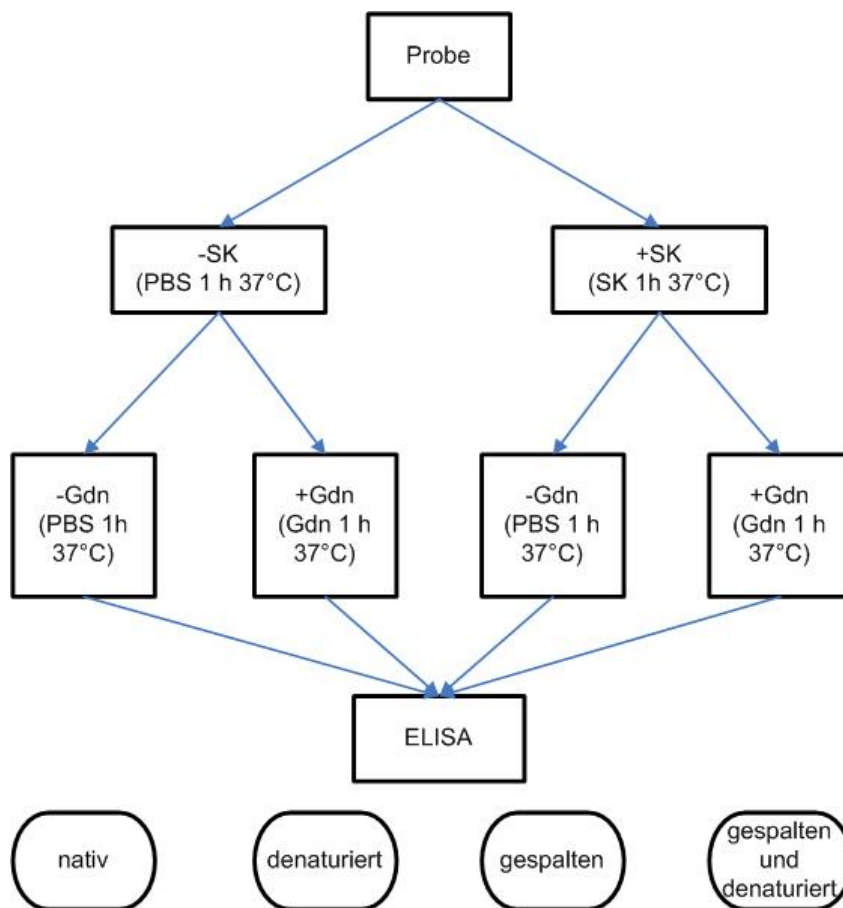


Abbildung 3. Probenbehandlung.
SK- Streptokinase; Gdn- Guanidin.

2.3 Auswertungsmethoden und Statistik

Für die Auswertung der unbekanntem PrP-Konzentrationen wurde das Programm Magellan 2 der Firma TECAN verwendet. Für die Berechnung und Darstellung verschiedener Regressionskurven wurde SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc, Illinois, USA) angewendet.

Die Normalverteilung und Behandlungseffekte wurden mittels SPSS 16.0 (SPSS Inc, Illinois, USA) untersucht. Die deskriptive Statistik wurde mit SPSS 16.0 und Microsoft Office Excel 2003 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des ELISA-Tests

3.1.1 Optimale Konzentration des Detektor-Antikörpers

Die optimale Konzentration des Detektor-Antikörpers wurde durch Titrieren ermittelt. Dabei wurde auf das Signal-Rauschen-Verhältnis (SNR- „signal-to-noise-ratio“) geachtet und die Konzentration mit dem besten SNR über die ganze Verdünnungsreihe und mit dem niedrigsten Variationskoeffizienten wurde für die weiteren Versuche ausgewählt. Als Antigen wurde huPrPrec in ELISA-Puffer verwendet.

In Abbildung 4 und Tabelle 3. sind die Ergebnisse einer Verdünnungsreihe von huPrPrec in ELISA-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen von SAF32-B und Capture-Antikörper 3F4 1µg/ml dargestellt.

Für die Berechnung der Signal-Rauschen-Verhältnisse wurden die einzelnen Signale jedes Punktes der Verdünnungsreihe durch das Signal des Puffers dividiert. Für die Konzentration von 62,5 ng/ml SAF32-B ergab die lineare Regression den besten Korrelationskoeffizienten sowie eine gute Steigung der Gerade ($y = ax + b$) über dem Konzentrationsbereich von 5 bis 0,02 ng/ml (Tabelle 3.).

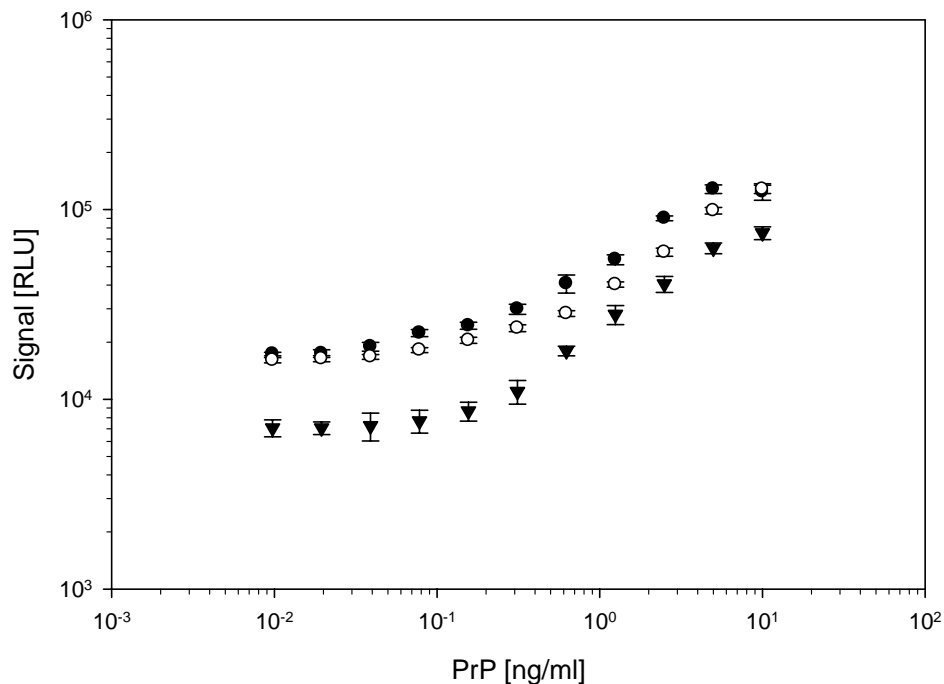


Abbildung 4. Titrieren des Detektor-Antikörpers SAF32-B.

RLU- „relative luminescence units“; PrP: huPrPrec- Konzentrationen von 10 bis 0,009 ng/ml. ● 125 ng/ml dAK; ○ 62,5ng/ml dAK; ▼ 32 ng/ml dAK. Es sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen und die Standardabweichungen dargestellt.

PrP ng/ml	125 ng/ml SAF32			62,5 ng/ml SAF32			32 ng/ml SAF32		
	MW	SD	SRV	MW	SD	SRV	MW	SD	SRV
10,000	124.361	12.313	9,9	128.029	6.583	14,9	75.310	5.904	11,5
5,000	128.159	6.783	10,2	98.586	4.011	11,5	62.545	4.067	9,5
2,500	89.890	2.674	7,2	59.693	2.955	7,0	40.494	3.925	6,2
1,250	54.523	3.290	4,3	40.300	1.267	4,7	28.000	3.219	4,3
0,625	40.757	4.513	3,2	28.323	983	3,3	18.000	1.045	2,7
0,313	29.883	1.834	2,4	23.729	1.014	2,8	11.000	1.563	1,7
0,156	24.424	1.032	1,9	20.481	786	2,4	8.665	988	1,3
0,078	22.363	966	1,8	18.174	545	2,1	7.695	1.067	1,2
0,039	18.941	1.002	1,5	16.751	499	2,0	7.242	1.206	1,1
0,020	17.441	793	1,4	16.384	615	1,9	7.063	539	1,1
0,010	17.332	365	1,4	16.071	515	1,9	7.068	723	1,1
A		1,769			1,905			1,725	
B		1,863			2,090			1,345	
r²		0,979			0,998			0,977	

Tabelle 3. Titrieren des Detektor-Antikörpers SAF32-B.

PrP- humanes rekombinantes PrP^C. MW – Mittelwert in RLU; SD- Standardabweichung; SRV- Signal-Rauschen-Verhältnis; a- Steigung; b- y-Abschnitt; r²- Regressionskoeffizient der Gerade für SRV.

Die Konzentration von 62,5 ng/ml SAF32-B war damit für die weiteren Untersuchungen am besten geeignet. Der Konzentrationsbereich von 0,02 bis 5 ng/ml wurde auch für die Eichkurve verwendet.

3.1.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (auch Nachweisgrenze oder LOD- „limit of detection“) wurde definiert als die kleinste Menge Analyt, die vom Hintergrundsignal signifikant unterschieden werden kann. Hierfür wurde eine komplette Mikrotiterplatte mit ELISA-Puffer pipettiert und für die Rohwerte (RLU) Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die angebliche Konzentration des Hintergrundsignals + 3fache Standardabweichung wurde aus der Eichkurve berechnet. Da die Verteilung der Signale von der Normalverteilung nicht signifikant unterschiedlich war (Kolmogorov-Smirnoff-Test $p=0,200$), könnte man daher behaupten, dass 99,7 % der Werte, die unter dieser Konzentration ermittelt werden, aus Hintergrundsignalen stammen (z.B. unspezifische Bindung der Reaktionsteilnehmer).

Das Problem der tatsächlichen analytischen Sensitivität konnte unter diesen Bedingungen nicht vollständig geklärt werden. In einem komplexen Gemisch verschiedener Biomoleküle, wie z.B. Plasma, sind auch andere Interaktionen zwischen den Testkomponenten (Antikörper, Biokonjugate u.a.) zu erwarten. Der ideale Null-Standard sollte alle Matrixkomponenten der Probe ohne das zu untersuchende Analyt enthalten. Solche Proben liegen momentan für humane Prionen im Plasma nicht vor. Daher ist es zu erwarten, dass sich die tatsächliche Nachweisgrenze unseres Tests von der hier ermittelten unterscheiden würde.

N	MW	SD	VK%	ng/ml
96	14 572	1 153	7,9	0,026

Tabelle 4. Analytische Sensitivität.

MW: RLU-Mittelwert; SD- Standardabweichung; VK%- Variationskoeffizient.
Die Nachweisgrenze in ng/ml wurde aus der Eichkurve mit huPrPrec berechnet.

3.1.3 Linearitätsbereich

Als Linearitätsbereich wird der Konzentrations-Bereich definiert, in dem das Verhältnis von Messsignal zu Konzentration der Messgröße konstant ist. Typischerweise wird ab einer bestimmten Konzentration das Verhältnis kleiner und die Kalibrationskurve knickt ab. Ab dieser Konzentration müssen entsprechende Proben verdünnt werden, damit die Messung wieder im linearen Bereich liegt und in einfacher Weise vom Signal auf die Konzentration geschlossen werden kann. Bei immunchemischen Messverfahren bestehen in der Regel komplexe Beziehun-

gen zwischen Messsignal und Konzentration der Messgröße, so dass ein Linearitätsbereich nicht gut abgrenzbar ist.

Um zu überprüfen, ob quantitative Messungen von PrP^C im Humanplasma möglich sind, wurden drei Proben Citratplasma von 1:10 bis 1:1280 durch Faktor 2 im ELISA-Puffer verdünnt und nachfolgend deren Konzentrationen aufgrund der Eichkurve mit huPrPrec bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen wurden durch den Verdünnungsfaktor multipliziert und die Wiederfindung als Prozent gegenüber dem Mittelwert wurde berechnet.

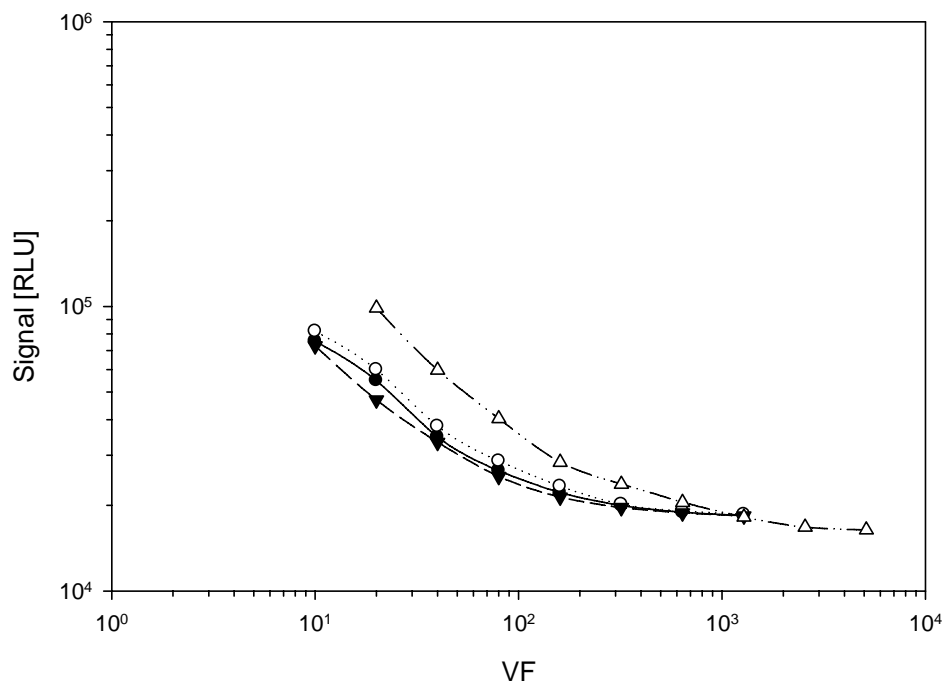


Abbildung 5. Plasmaverdünnungsreihen.

RLU- "relative luminescence unit"; VF- Verdünnungsfaktor. Δ - huPrPrec; \circ - Plasmaprobe 1; \bullet - Plasmaprobe 2; \blacktriangledown - Plasmaprobe 3. Um den Vergleich zu ermöglichen, wurde für das huPrPrec als unverdünnt eine Ausgangskonzentration von 50 ng/ml angenommen.

VF	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	MW	SD	%	MW	SD	%	MW	SD	%
10	35,200	2,464	77	39,000	1,521	72	33,480	2,143	85
20	45,320	1,360	99	51,480	2,574	95	35,640	1,176	91
40	41,800	3,344	91	49,400	3,606	92	38,160	1,068	97
80	43,120	2,846	94	53,560	2,250	99	37,080	2,336	94
160	44,440	2,622	97	55,640	3,283	103	36,360	1,891	93
320	45,760	1,876	100	49,400	4,397	92	39,240	3,021	100
640	50,600	5,161	111	57,720	6,580	107	46,440	4,133	118
1280	59,840	6,822	131	75,400	9,877	140	47,880	5,458	122

Tabelle 5. Linearität der quantitativen Messung von PrP^C in Humanplasma.

VF- Verdünnungsfaktor; MW- Mittelwert der PrP^C-Konzentration in ng/ml aus doppelter Messung; SD- Standardabweichung; %- Wiederfindung in Prozent gegenüber dem Gesamtmittelwert.

Die Signale aus den Plasmaverdünnungen und die typische Verdünnungsreihe aus huPrPrec hatten einen parallelen Verlauf im Bereich der niedrigeren Verdünnungen und ab 1:320 konnte der ELISA-Test zwischen den einzelnen Messpunkten nicht mehr unterscheiden. In dem Bereich von 1:20 bis zu 1:320 unterschieden sich die gemessenen PrP^C-Plasmakonzentrationen weniger als 10 % voneinander (Tabelle 5). Daher wurde der Bereich von 1:20 bis 1:320 als Linearitätsbereich für quantitative Messungen des PrP^C im Humanplasma angenommen. Dieser Bereich ist vergleichbar mit den Angaben anderer Autoren zu den Linearitätsbereichen der ELISA-Tests für PrP in Plasma. (61, 161).

3.1.4 Präzision

Die Präzision wurde in Serie und von Tag-zu-Tag untersucht. Dabei wurden für serielle Untersuchungen drei Plasmaproben in 16 Kavitäten pipettiert und für die aus der Eichkurve ermittelten Konzentrationen der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

Für Untersuchungen von Tag-zu-Tag wurden die gleichen drei Proben 5 Tage nacheinander in vier Kavitäten pipettiert. Für die aus der Eichkurve ermittelten Konzentrationen wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

Ein Gesamtvariationskoeffizient von 8,3 % wurde für alle Proben in der Präzisionsuntersuchung ermittelt. Die meisten VK lagen unter 10 % (Tabelle 6). Somit ist dieses Leistungsmerkmal des Tests vergleichbar mit den ähnlich aufgebauten ELISA-Tests anderer Autoren (4, 61, 161).

	Mittlere Konzentration ng/ml	VK%	
		in Serie	Tag-zu-Tag
Probe 1	48,7	5,7	8,8
Probe 2	41,9	4,6	7,7
Probe 3	26,8	7,3	11,5

Tabelle 6. Präzisionsmerkmale des Tests.

Es wurden drei Plasmaproben untersucht (s. Kap.3.1.4). VK%- Variationskoeffizient in %.

3.1.5 Wiederfindung (Recovery)

Die Richtigkeit eines quantitativen Tests kann man durch drei Methoden überprüfen:

- Vergleich der Ergebnisse mit akzeptiertem Prüfverfahren
- Anwendung des Verfahrens auf ein Referenzmaterials

– Aufstockung des Analyts in der Probe.

Als geeignete Methode bei diesem Test wurde das dritte Verfahren ausgewählt.

Die Wiederfindungsrate wurde folgenderweise untersucht: zu 100 µl von je vier verschiedenen Plasmaproben wurde jeweils 100 µl 25, 6,25 und 1,562 ng/ml huPrPrec zugegeben. Die Proben wurden 1:20 in ELISA-Puffer verdünnt und die Konzentrationen mit unserem Test bestimmt.

Die Wiederfindungsrate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{gemessene Konzentration/erwartete Konzentration} \times 100 = \text{Wiederfindungsrate in \%}$$

Dabei wurde der Verdünnungsfaktor beachtet.

In Tabelle 7. sind die Ergebnisse der Aufstockungsversuche dargestellt. Im Allgemeinen streute die Wiederfindungsrate von 92 % bis zu 107%. Dies bedeutet eine Unrichtigkeit von weniger als 10 % und ist daher mit den üblichen ELISA-Methoden vergleichbar.

	Zugegebenes huPrPrec [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindungsrate [%]
Probe 1	0	43,500	43,500	100
	25	34,250	36,015	105
	6,25	24,875	23,937	96
Probe 2	0	51,305	51,305	100
	25	38,153	40,814	107
	6,25	28,778	28,136	98
	1,562	26,434	25,698	97
Probe 3	0	37,730	37,730	100
	25	31,365	32,103	102
	6,25	21,990	21,314	97
	1,562	19,646	18,091	92
Probe 4	0	39,782	39,782	100
	25	32,391	31,735	98
	6,25	23,016	23,684	103
	1,562	20,672	21,429	104

Tabelle 7. Ergebnisse der Wiederfindung-Versuche.

Drei verschiedene Konzentrationen huPrPrec wurden zu vier verschiedenen Plasmaproben zugegeben; die Proben danach (1:20 verdünnt) wurden in ELISA gemessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das humane PrP^C im Plasma unter Benutzung des hier beschriebenen und verwendeten ELISA-Tests sensitiv und quantitativ reproduzierbar nachzuweisen ist.

3.2 PrP-Spaltung im Plasma mittels Streptokinase-aktiviertes Plasminogen

3.2.1 Streptokinase-Konzentration

Für die Untersuchung der optimalen Streptokinase(SK)-Konzentration zur Aktivierung des endogenen Plasminogens wurden drei Plasmen mit folgenden PrP-Konzentrationen ausgewählt: Probe 1- 43,780 ng/ml; Probe 2- 36,200 ng/ml und Probe 3- 57,140 ng/ml. Für jede Probe wurden vier SK-Konzentrationen (Endkonzentration) ausgetestet: 6, 22, 44 und 85 kU/ml. Die Proben wurden drei Tage nacheinander untersucht und die Mittelwerte einzelner Messungen für weitere Analysen verwendet.

Um eine einheitliche Darstellung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Signale (RLU) einzelner Messungen auf dem Ausgangssignal (vor der SK-Zugabe) der entsprechenden Probe normiert: Signal nach SK-Zugabe/Signal vor SK-Zugabe. Somit lässt sich der SK-Effekt (bzw. PrP-Spaltung nach SK-Aktivierung des Plasminogens) leichter zwischen den Proben mit unterschiedlichen PrP-Ausgangskonzentrationen vergleichen. In Abbildung 6. sind die ermittelten Konzentrationen für die einzelnen Proben in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

In Abbildung 7. sind die Daten aus Abbildung 6. zusammengefasst.

Die nichtlineare Regressionsuntersuchung der einzelnen Messpunkte jeder SK-Konzentration ergab eine vier-parameter-logistische Kurve mit Regressionskoeffizienten r^2 von 0,967 bis 0,999. Diese Kurven sind ähnlich der Kurven einer enzymatischen Reaktion, bei der das Produkt der enzymatischen Spaltung gemessen wird. In unserem Test wird jedoch immer die Substratkonzentration (PrP) gemessen. Daher zeigt der Spaltungsverlauf am Anfang bei 6 kU/ml eine flache Anfangsphase, in der kaum Änderungen in der PrP-Restkonzentration zu beobachten sind („lag-Phase“). Bei den höheren SK-Konzentration ist diese Phase sehr kurz, so dass sie mit dieser Messmethode nicht oder nur sehr schwach zu erfassen ist. Danach folgte ein rascher Abfall der Restkonzentrationen und zwar konzentrationsabhängig: je höher die SK-Konzentration, desto steiler der Konzentrationsabfall. Anschließend zeigte sich wiederum ein flacher Ablauf (ab 20. – 30. Minute), bei dem sich die einzelnen Konzentrationen sehr schwach von einander unterscheiden, da die Spaltungsgeschwindigkeit bei sehr niedrigen Substratkonzentration (PrP) geringer wird.

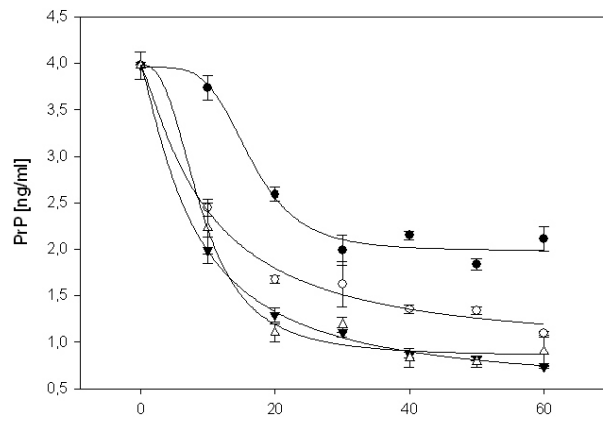
Die SK-Konzentrationen von 44 kU/ml und 85 kU/ml zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Spaltungsgeschwindigkeit, besonders von der 40. bis zur 60. Minute. Diese beiden SK-Konzentrationen zeigten auch gute Variationskoeffizienten von 10,3%. Dies spricht dafür, dass

die maximale Plasminogenaktivierung unter diesen Testbedingungen erreicht wurde. Daher wurde die SK-Konzentration von 44 kU/ml für die weiteren Tests ausgewählt.

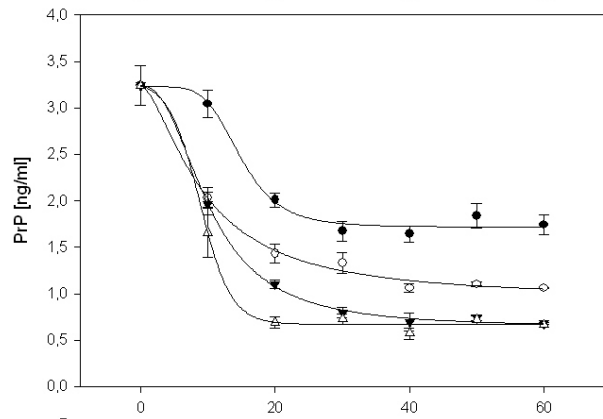
Nach 60 Minuten Spaltung betrug die niedrigste PrP-Restkonzentration 0,648 ng/ml (85 kU/ml SK) und lag damit deutlich über die Nachweisgrenze des Tests (0,026 ng/ml). Eine Spaltung mit Endkonzentrationen unter der Nachweisgrenze in diesem Zeitraum (60 Minuten) ist uns nicht gelungen. **Nach 60 Minuten Inkubation der Plasmen mit 44 kU/ml SK wurden nur noch zwischen 19 und 21 % der PrP-Ausgangskonzentration nachgewiesen, das bedeutet eine 80%-Spaltung der nachweisbaren PrP-Moleküle mit diesem Test.**

Die nicht vollständige Spaltung des PrP^C unter unseren Testbedingungen könnte der Verwendung von nativem Plasma zugeschrieben werden. Einerseits sind die Verhältnisse Enzym/Substrat bezogen auf Plasmin und PrP vorgegeben (soweit die Konzentrationen beider Reaktionsteilnehmer nicht zu beeinflussen sind) und offensichtlich nicht optimal. Die Plasminogenkonzentration einzelner Proben wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sondern nur die Plasminogen-Aktivität. Die durchschnittliche Plasminogen-Konzentration in normalem Humanplasma wird mit 2 μ M angegeben (83). Unter Annahme einer durchschnittlichen PrP-Konzentration im Citratplasma von 45,71 ng/ml und einem PrP-Molekulargewicht von 35 kDa (diglykosyliert), würde dies eine PrP-Konzentration von 1,3 nM bedeuten. Somit liegt das Verhältnis Plasminogen/PrP (Enzym/Substrat) in unseren Proben durchschnittlich bei ca. 1500:1. Bei den meisten enzymatischen Reaktionen ist aber das Substrat in großem molarem Überschuss gegenüber dem Enzym vorhanden.

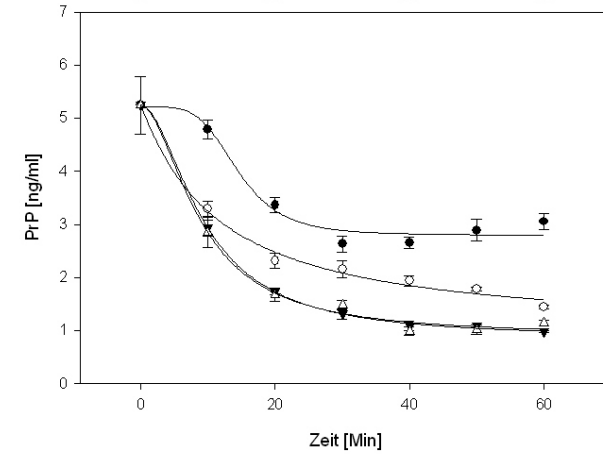
In einem komplexen Gemisch wie Plasma, ist das Primärsubstrat des Plasminogens (Fibrin/Fibrinogen) in einem Überschuss vorhanden und die natürlichen Plasmin-Inhibitoren wie z.B. α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin sind im Gleichgewicht mit der Plasmin/Plasminogen-Konzentration. Das SK-Plgn Komplex wird durch α_2 -Antiplasmin inhibiert, wenn dieses in molarem Überschuss im Reaktionsgemisch vorliegt (32). Da mit niedrigeren SK-Konzentrationen keine PrP-Spaltung beobachtet wurde, könnte die Zugabe von SK in molarem Überschuss gegenüber dem Plasminogen, wie in unserem Test erfolgt, die Bindung des α_2 -Antiplasmins an dem SK-Plgn-Komplex unterdrücken und somit die Spaltung von PrP erlauben.



Probe 1



Probe 2



Probe 3

Abbildung 6. PrP-Restkonzentrationen in drei Plasmaproben nach SK-Zugabe.

● 6 kU/ml SK; ○ 22 kU/ml SK; ▼ 44 kU/ml SK; △ 85 kU/ml SK. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen dargestellt.

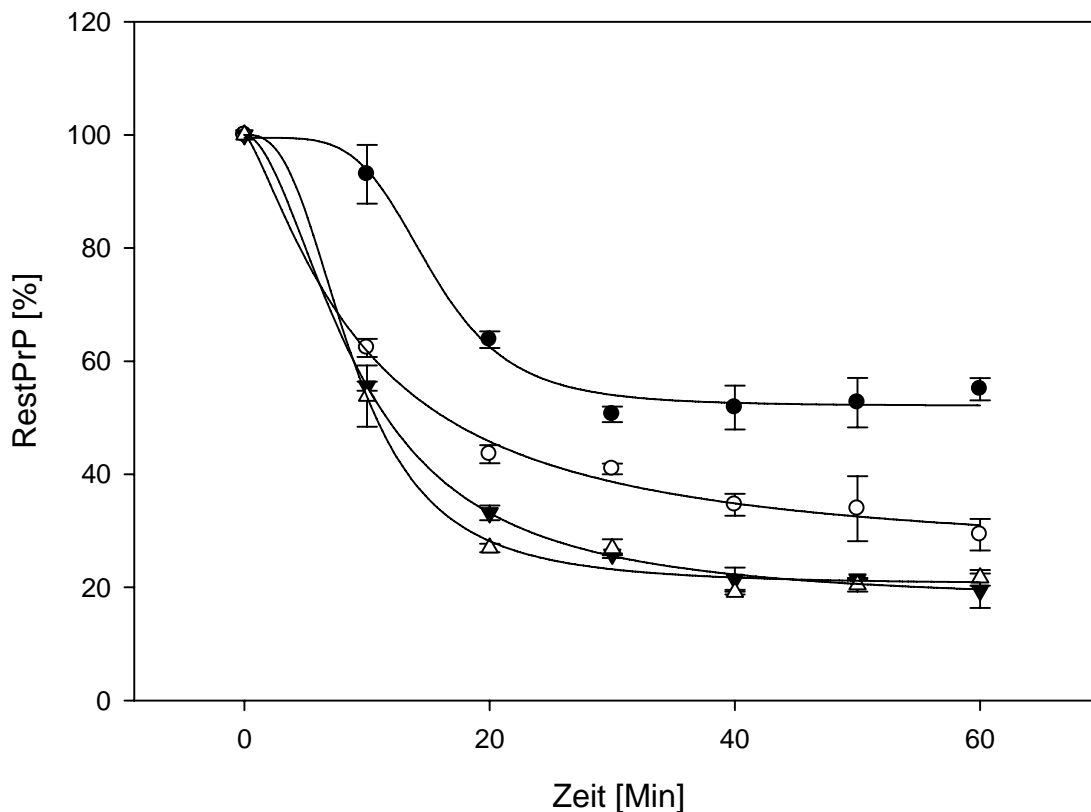


Abbildung 7. PrP-Restkonzentrationen als % von der Ausgangskonzentration.

● 6 kU/ml SK; ○ 22 kU/ml SK; ▼ 44 kU/ml SK; △ 85 kU/ml SK. Es sind die Mittelwerte von den drei Proben und die Standardabweichungen dargestellt.

Die möglichen Interferenzen der SK wurden ebenfalls untersucht. In jedem Versuch wurde dem ELISA-Puffer die entsprechende Konzentration SK zugesetzt und mit den Hintergrundsignalen des Puffers allein verglichen. Die Signale für jede SK-Konzentration sind in Abbildung 8. dargestellt. Der t-Test für verbundene Stichproben ergab keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Hintergrundsignalen von ELISA-Puffer und von SK-ELISA-Puffern ($p > 0,2$ für alle Konzentrationen).

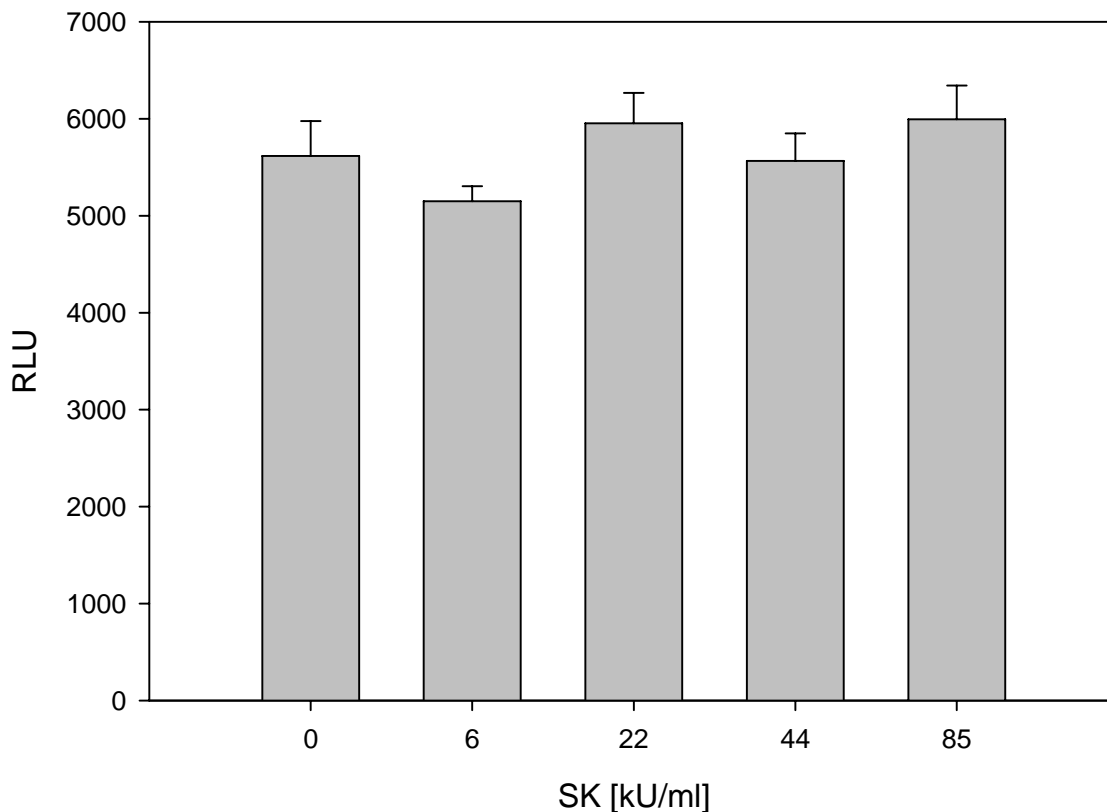


Abbildung 8. Streptokinase-Interferenz im ELISA-Test.

Die angegebenen SK-Konzentrationen wurden zum ELISA-Puffer zugegeben und parallel mit der Leerwertprobe untersucht.

Auch eine eventuelle PrP-Spaltung von anderen, im Plasma vorhandenen Proteasen wurde untersucht. Jede Probe wurde ohne Zugabe von SK parallel inkubiert und bei entsprechenden Zeitpunkten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9. dargestellt. Es wurde einen durchschnittlichen VK von 3,5 % beobachtet und somit keine signifikante Änderung in der PrP-Konzentration angenommen.

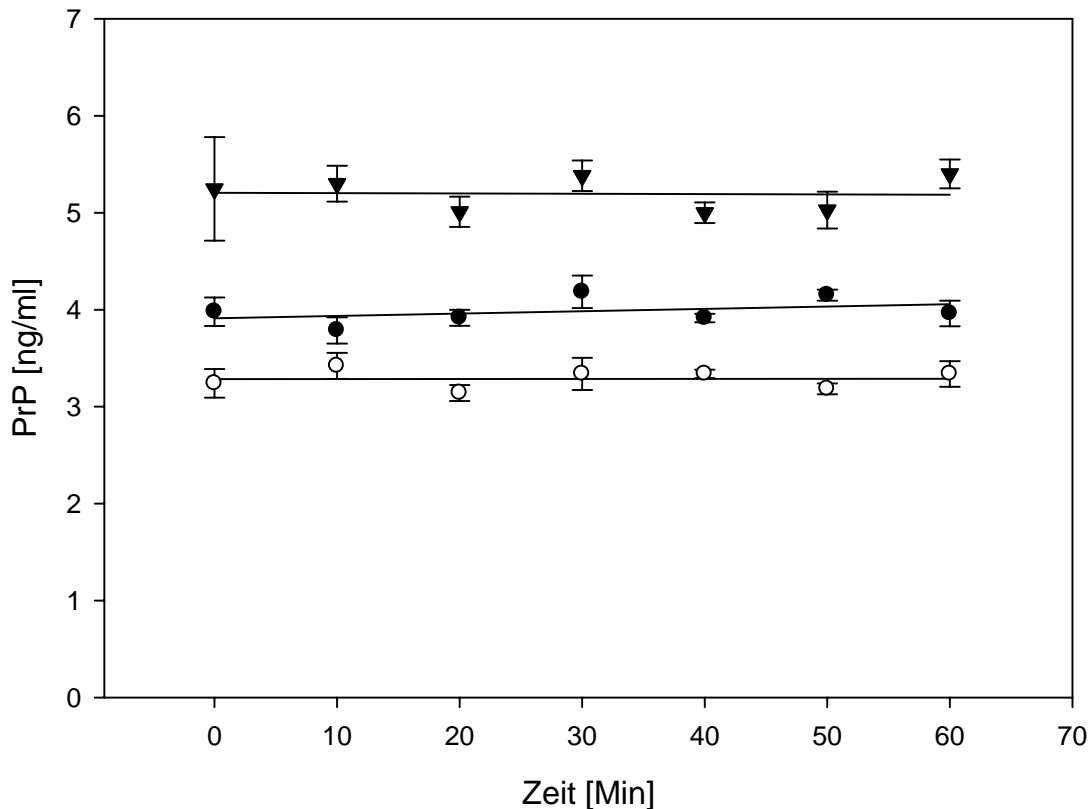


Abbildung 9. PrP-Konzentration im Citratplasma ohne SK-Zugabe.

Es sind die Mittelwerte aus zwei Messungen und die Standardabweichungen von drei Proben dargestellt.

3.2.2 Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Temperatur

Die enzymatischen Reaktionen, wie im vorliegendem Fall die Spaltung von PrP durch Plasmin, sind streng temperaturabhängig. Im Rahmen der Optimierung dieser Methode wurde die Spaltungsrate bei verschiedenen Temperaturen überprüft. Dafür wurde zu zwei Citratplasmen an verschiedenen Tagen 44 kU/ml SK zugesetzt und bei 4°C (Kühlschrank), 25°C (Raumtemperatur), 37° und 42°C (Wasserbad) für 60 Minuten inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurde ein Aliquot abgenommen, mit Aprotinin (ein Plasmininhibitor, der die Spaltungsreaktion stoppt) versetzt und die PrP-Restkonzentrationen gleichzeitig in unserem Test bestimmt.

Die Ergebnisse für jeden Zeitpunkt (als Prozent der Ausgangskonzentration) sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

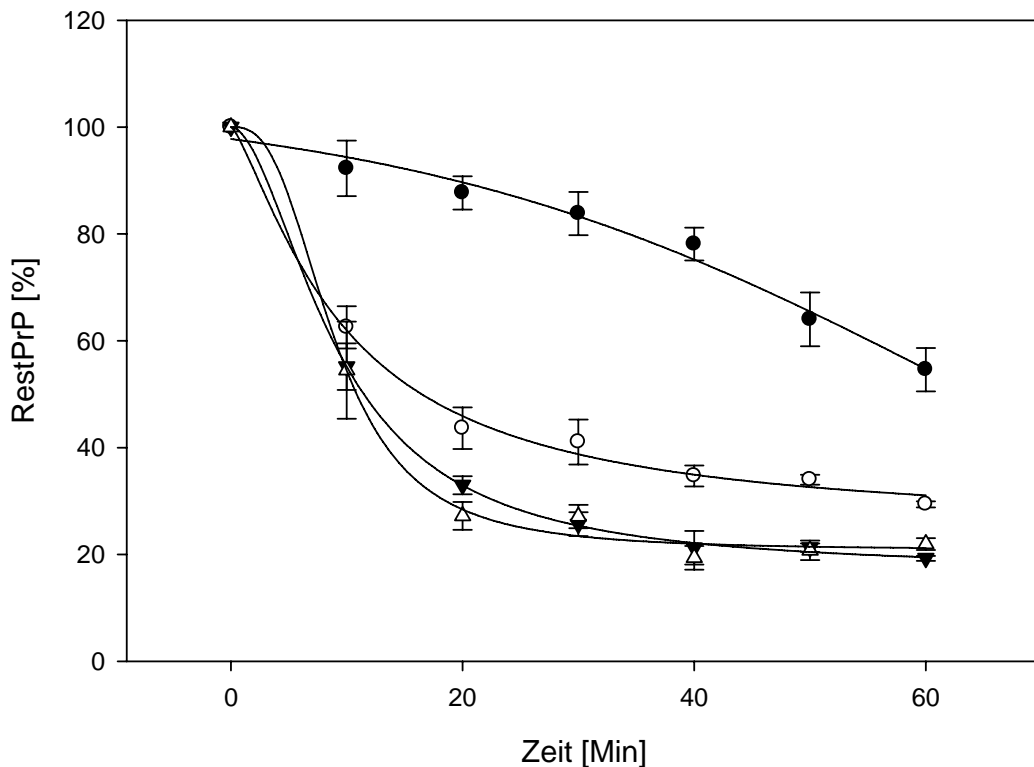


Abbildung 10. PrP-Spaltung nach SK-Zugabe bei verschiedenen Temperaturen.

Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von zwei Messungen als Prozent von der Ausgangskonzentration dargestellt. ● 4°C; ○ 25°C; ▼ 37°C; △ 42°C

Aus diesen Daten ist es zu erkennen, dass die nachweisbaren PrP-Restkonzentrationen nach einer Stunde Inkubation bei 4°C bei 60 % des Ausgangswertes liegen. Demgegenüber zeigen die PrP-Restkonzentrationen für die anderen Temperaturen einen raschen Abfall in den ersten zwanzig Minuten und ab der 40. Minute erreichen sie einen fast plateauähnlichen Verlauf. Am Ende der Inkubationszeit konnte bei Raumtemperatur 29 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden, bei 37°C- 19 % und bei 42°C- 22%. Da zwischen 37°C und 42°C kein signifikanter Unterschied gefunden wurde, wurde die Temperatur von 37°C für alle nachfolgenden SK-Behandlungen der Proben ausgewählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PrP-Spaltung durch Streptokinase-aktiviertes Plasmin im Humanplasma in unserem ELISA-Test nachweisbar und mit einem allgemeinem Variationskoeffizient von 10,3 % gut reproduzierbar ist. Nach einer Stunde Plasminwirkung bei 37°C lässt sich ca. 20 % der Ausgangskonzentration an PrP nachweisen.

3.3 Auswirkung des Guanidins auf den ELISA-Test

Es wurde eine Verdünnungsreihe von Citratplasma im ELISA-Puffer hergestellt. Zu 100 µl von jeder Probe wurde 100 µl 8 M Gdn zugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Proben weiterhin mit ELISA-Puffer verdünnt, so dass es folgende Endkonzentrationen von Gdn entstanden: 0,8 M; 0,4 M und 0,2 M. Nachfolgend wurde die ELISA durchgeführt. Als Kontrolle dienten dieselben Proben ohne Zugabe von Gdn. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11. und Tabelle 8. dargestellt. Es zeigte sich, dass quantitative Messungen von Plasma-PrP in 0,2 M Guanidin möglich sind.

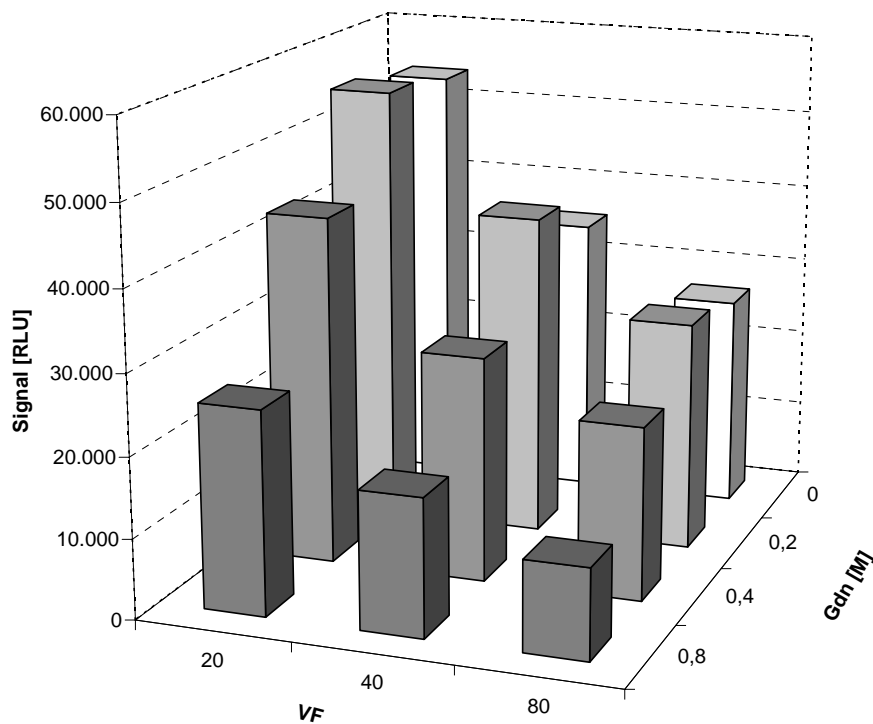


Abbildung 11. Effekt des Guanidins auf den Capture-Antikörper in ELISA.

VF- Verdünnungsfaktor; Gdn [M]- molare Endkonzentration des Guanidins; als Kontrolle wird dieselbe Plasmaprobenreihe ohne Gdn angezeigt (0).

VF	0,8 M	0,4 M	0,2 M
20	0,47	0,81	1,03
40	0,49	0,80	1,15
80	0,42	0,81	1,08

Tabelle 8. Verhältnis nativ/denaturiert für Plasmaproben mit Guanidin.

VF- Verdünnungsfaktor; es sind die Verhältnisse Plasma ohne Guanidin/Plasma mit Guanidin für die unterschiedlichen Verdünnungen und Endkonzentrationen von Guanidin dargestellt.

3.4 Nachweis von Hamster-PrP: nativ und denaturiert

Um plausible Aussagen bei der Arbeit mit einem PrP-Gemisch aus verschiedenen Spezies (Humanplasma und Hamsterhirnhomogenisat) zu treffen, muss die Möglichkeit zur quantitativen Messungen auch für das Hamster-PrP gesichert werden.

Dafür wurden 100 µl von den beiden Hirnhomogenisaten (sowohl von nicht erkrankten Tiere- N-Reihe als auch von an Scrapie erkrankten Tiere- S-Reihe) mit 150 µl PBS gemischt und weiterhin mit PBS durch Faktor 2 bis 1 : 320 verdünnt. Beide Verdünnungsreihen wurden in zwei Teile geteilt, bezeichnet als nativ und denaturiert. Zu jeder Probe der nativen Reihen wurde das gleiche Volumen PBS zugesetzt und zu den denaturierten Reihen das gleiche Volumen 8 M Gdn. Alle Proben wurden parallel für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde jede Probe mit ELISA-Puffer 1:20 verdünnt und in unserem ELISA zweifach ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12. dargestellt.

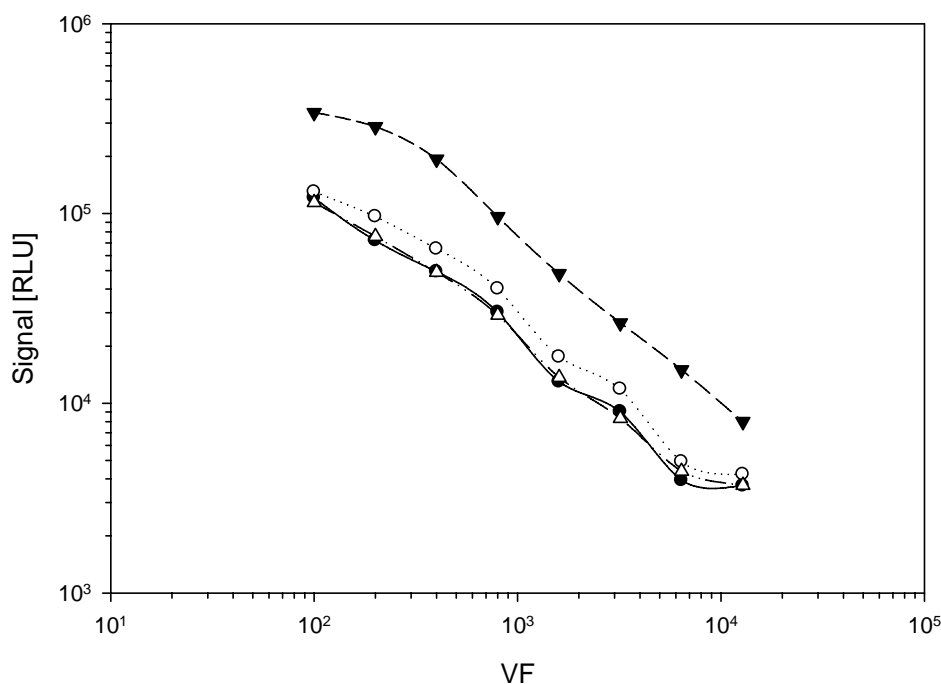


Abbildung 12. Nachweis von Hamster-PrP.

RLU-„relative luminescence units“; VF- Verdünnungsfaktor ● natives N-Hirnhomogenisat; ○ denaturiertes N-Hirnhomogenisat; △ natives S-Hirnhomogenisat; ▼ denaturiertes S-Hirnhomogenisat .

Bei der denaturierten S-Reihe konnte eine Verdünnung von 1: 12 800 und bei den anderen drei Reihen- von 1: 6 400 (Endverdünnung) signifikant nachgewiesen werden. Die Variationskoeffizienten streuten zwischen 0,4 % und 14,2 %. Es wurde auch festgestellt, dass die denaturierte S-Reihe niedrigere Streuung einzelner Messungen zeigte als die native Reihe (VK durchschnittlich

3,7 % bzw. 6,7 %). Bei den N-Reihen war das umgekehrt: VK durchschnittlich 5,1 % für die native Reihe bzw. 6,7 % für die denaturierte Reihe. Alle vier Probenreihen zeigten eine sehr gute und statistisch signifikante Korrelation des gemessenen Signals gegenüber der Verdünnungskorrelationskoeffizienten $r^2 \geq 0,987$. **Somit lässt sich sagen, dass quantitative Messungen von Hamster PrP in diesem Test möglich sind.**

Die Signale von beiden nativen Homogenisaten (aus N- und S-Hirn) zeigten in unserem Test sehr ähnliche Signalstärke bei den entsprechenden Verdünnungspunkten. Da der 3F4 nur PrP^C im nativen Zustand erkennt, ist anzunehmen, dass die PrP^C-Konzentration in unseren Hamsterhirnhomogenisaten, sowohl in dem pathologischen, als auch in dem normalen, sehr ähnlich ist.

Die Behandlung beider Homogenisat-Reihen mit Gdn führte zur Signalerhöhung. Diese Erhöhung war in den N-Reihen schwächer ausgeprägt als in den S-Reihen. Eine Zusammenfassung des Signalverhältnisses denaturiert/nativ ist in Tabelle 9. dargestellt.

EV	N-Hirn	S-Hirn
100	1,07	2,98
200	1,34	3,78
400	1,32	3,94
800	1,33	3,30
1 600	1,35	3,52
3 200	1,32	3,19
6 400	1,25	3,42
12 800	1,15	2,16

Tabelle 9. Verhältnis denaturiert/nativ für die Hamsterhirnhomogenisate.

EV- Endverdünnungsfaktor. Die Homogenisate wurden in ELISA-Puffer verdünnt und danach wie oben beschrieben mit Gdn denaturiert. Anschließend wurden diese in ELISA ausgetestet. Die Signale jedes Verdünnungspunktes aus den denaturierten Reihen wurden durch das entsprechende Signal der nativen Reihen dividiert.

Die Behandlung mit Gdn für eine Stunde des N-Homogenisats führte zu einer durchschnittlichen Signalerhöhung von 127%. Diese Erhöhung ist weitgehend konstant über die ganze Verdünnungsreihe mit leicht abfallender Tendenz mit der abfallenden Konzentration. Die S-Proben nach dieser Behandlung zeigten auch eine relativ konstante Signalerhöhung aber viel stärker als diese bei den N-Proben (329 %). Die nicht ausreichende Sensitivität des Tests bei den letzten zwei Verdünnungen konnte der Grund für die schwächeren Guanidin-Effekte (denaturiert/nativ) sein. Die Signalerhöhung bei den N-Proben könnte dem vollständigen Entfalten der PrP^C-Moleküle und dem daher verbesserten Zugang auf dem linearen 3F4-Epitop zugeschrieben werden. Es ist

unwahrscheinlich, dass auch für SAF32 die Entfaltung eine Rolle spielt, da das Epitop dieses Antikörpers auf dem N-terminalen unstrukturierten Teil des Moleküls liegt.

Die Signalerhöhung bei den S-Proben könnte dem Entfalten der PrP^C-Moleküle und besonders der PrP^{Sc}-Moleküle und dem daher freizugänglichen 3F4-Epitops zugeschrieben werden.

Da wir in dieser Arbeit über kein rekombinantes Hamster-PrP verfügten, um genaue Konzentrationsbestimmungen durchzuführen, wurde für die Versuche mit aufgestockten Plasmen entschieden, die Signale und nicht die Konzentrationen der Proben miteinander zu vergleichen.

3.5 PrP-Nachweis im Plasma mit N-Hirn

In Abbildung 13. sind die ermittelten Signale als RLU gegenüber der Verdünnung des N-Hirnhomogenisats im Plasma dargestellt. In der Tabelle 10 sind die Behandlungseffekte mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgelistet und in Abbildung 14. graphisch dargestellt.

Die SK-Behandlung dieser Proben führte zu einem Abfall der gemessenen Signale, dies spiegelte die Erfassung des restlichen PrP^C nach Plasmin-Spaltung wider und war statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Tabelle 10). Die festgestellte Spaltungsrate mit durchschnittlich 62 % war niedriger als die bei den Plasmaproben allein (Kap. 3.1.). Der Grund dafür könnte sein, dass hier eine andere Berechnungsmethode verwendet wurde, (Signalverhältnis vs. Konzentrationsverhältnis bei Plasmaproben) und andererseits die Tatsache, dass hier meistens andere Plasmin/PrP-Verhältnisse eingesetzt wurden. Eine verminderte Substratspezifität des Plasmins für Hamster-PrP ist auch denkbar, da die Spaltungsrate bei den niedrigeren Verdünnungen höher war, als bei den höheren Verdünnungen, wo das Plasma-PrP einen größeren Anteil an den gesamten PrP hat (Tabelle 10.). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Behandlung der N-Hirn-Plasmaproben mit Gdn nach Plasmin-Spaltung führte zur Signalerhöhung im Vergleich zum SK-Behandlung ohne Gdn. Dies ist leicht zu erklären, nachdem man den Effekt von Gdn allein betrachtet: die Gdn-Zugabe zu den Proben ohne Plasmin-Spaltung verursacht eine Erhöhung der ermittelten Signale. Die Gdn-Zugabe nach Plasmin-Spaltung führt somit zur Erhöhung der Signale von dem Rest-PrP^C (nicht gespaltenen PrP^C) und zwar gleichermaßen, wie im Fall mit nicht gespaltenen Proben. Daher war der Plasmin-Effekt nach Gdn nicht signifikant unterschiedlich von dem Plasmin-Effekt ohne Gdn ($0,62 \pm 0,03$ bzw. $0,63 \pm 0,03$; $p = 0,882$; Tabelle 10.).

Die Denaturierung der nicht gespaltenen Proben mit Guanidin führte zu einer statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Signalerhöhung um durchschnittlich 31 % und blieb über die ganze Verdünnungsreihe fast unverändert. Der Gdn-Effekt mit Plasmin ist per definitionem ein Verhältnis von denaturiertem Rest-PrP^C zu dem nativen Rest-PrP^C (Gleichung 1) und daher sind auch hier keine

signifikanten Unterschiede zu erwarten. Die Untersuchungsergebnisse unterstützten diese Theorie, die beiden Effekte waren sehr ähnlich (Gdn-Effekt= $1,31 \pm 0,06$; Gdn-Effekt mit Pln= $1,30 \pm 0,04$; $p=0,399$; s. Tabelle 10). Auffällig war die steigende Streuung des Gdn-Effekts mit Plasmin mit steigendem Titer (bis zu 25 % Variationskoeffizient), als die des Gdn-Effekts allein.

Die Erklärung für die erhöhte Wiederfindung von PrP^C nach Gdn-Behandlung bei N-Hirn-Plasmaproben, die nur PrP^C enthalten, könnte man durch die Probenherkunft in dem Gemisch erklären. Bei reinen Plasmaproben, frei von Zellen und Zelldebris, führte die Gdn-Zugabe zu einer leichten (max. 20 %) bis gar keinen Erhöhung des gemessenen Signals (Kap. 3.3.), wahrscheinlich durch verbesserten Zugang der Antikörper an die Bindungsstelle nach der vollständigen Entfaltung der PrP-Polypeptidkette. In den Proben von Hirnhomogenisat, trotz der Zelldebris-Sedimentierung durch eine leichte Zentrifugation, verbleiben noch Zellmembranreste in der Lösung. Daher trug die Extraktion des membrangebundenen PrP durch Gdn, 0,1 % Sarkosyl erreicht offensichtlich keine vollständige Extraktion, zur Signalerhöhung stärker bei.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse nach Plasminspaltung größere Streuung. Die Denaturierung der Proben erhöhte die Messsicherheit im Sinne der Reduktion des Variationskoeffizienten (VK-Mittelwert für Pln-Effekt ohne Gdn gegenüber Pln-Effekt mit Gdn: 11,3 % bzw. 6,9 %, VK-Mittelwert für Gdn-Effekt mit Pln gegenüber Gdn-Effekt ohne Pln: 11,7 % bzw. 5,1 %).

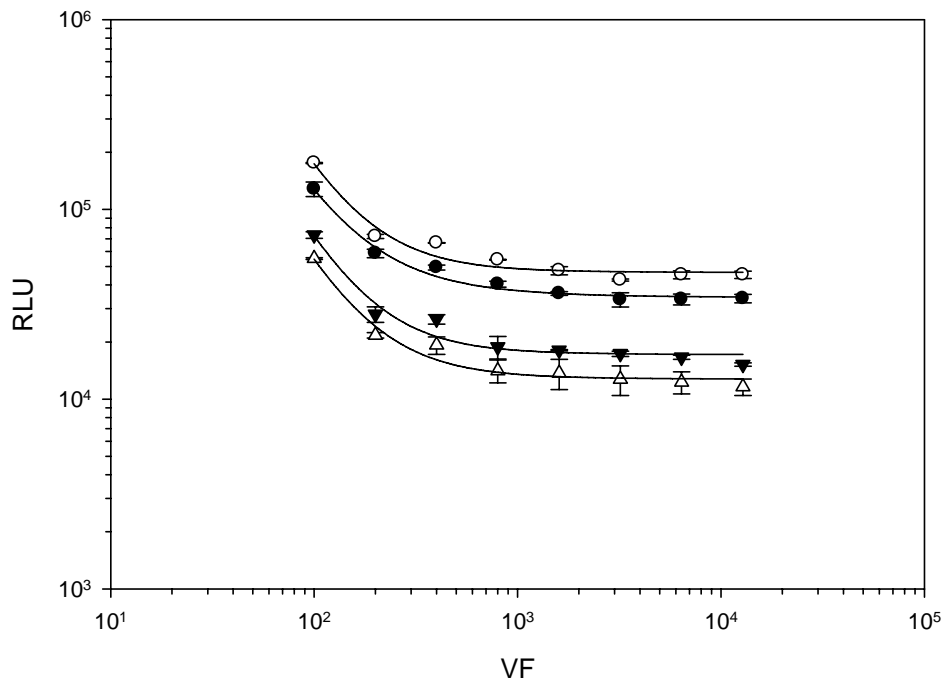


Abbildung 13. Plasma mit N-Homogenisat.

Signalstärke nach unterschiedlichen Behandlungen gegenüber der Verdünnung des Homogenisats. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Untersuchungen dargestellt. RLU- „relative luminescence units“. VF- Endverdünnungsfaktor

○ nach Gdn; ● nativ; ▼ nach SK und Gdn; △ nach SK.

Die Regressionskurven sind durch nichtlineare Regression erstellt; $r^2 > 0,98$. Da das Homogenisat im Plasma verdünnt ist, zeigen die Kurven einen flachen Verlauf bei den höheren Verdünnungen (Plasma-PrP ist über die ganze Verdünnungsreihe konstant).

VF	Pln-Effekt ohne Gdn	SD	Pln-Effekt mit Gdn	SD	Gdn-Effekt ohne Pln	SD	Gdn-Effekt mit Pln	SD
100	0,43	0,05	0,42	0,02	1,37	0,16	1,33	0,05
200	0,37	0,01	0,39	0,04	1,23	0,04	1,29	0,11
400	0,39	0,04	0,40	0,03	1,35	0,05	1,37	0,09
800	0,35	0,05	0,35	0,06	1,35	0,06	1,33	0,00
1 600	0,38	0,09	0,38	0,02	1,32	0,05	1,32	0,33
3 200	0,38	0,05	0,41	0,01	1,27	0,13	1,36	0,29
6 400	0,37	0,03	0,37	0,01	1,35	0,03	1,35	0,21
12 800	0,34	0,02	0,34	0,01	1,33	0,02	1,31	0,15

Tabelle 10. Plasma mit N-Homogenisat- alle Effekte.

VF- Endverdünnungsfaktor; SD- Standardabweichung.

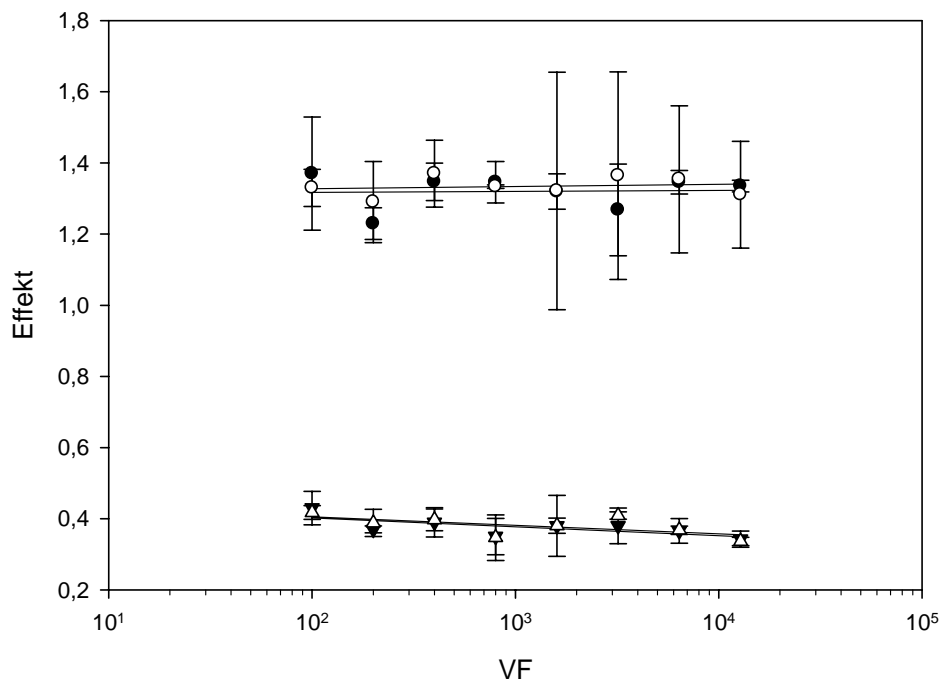


Abbildung 14. Plasma mit N-Homogenisat- alle Effekte.

Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen dargestellt. VF- Endverdünnungsfaktor; ○ Gdn-Effekt mit Pln; ● Gdn-Effekt ohne Pln; ▼ Pln-Effekt ohne Gdn; △ Pln-Effekt mit Gdn.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Proben, die ausschließlich PrP^C enthalten, der Plasmin-Effekt kleiner als 1 (Plasmin-Spaltung) und nicht signifikant abhängig von der PrP-Ausgangskonzentration ist und dass der Guanidin-Effekt durchschnittlich 1,3 beträgt und auch Plasmin- und PrP-Konzentrationsunabhängig ist (Abbildung 14.).

3.6 PrP-Nachweis im Plasma mit S-Hirn

In Abbildung 15. sind die ermittelten Signale als RLU gegenüber der Verdünnung des S-Hirnhomogenisats im Plasma dargestellt. In der Tabelle 11. sind die Behandlungseffekte mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgelistet und in Abbildung 16. graphisch dargestellt.

Der Effekt der Plasmin-Spaltung war bei diesen Proben auch deutlich zu erkennen (Abbildung 15.) und die Signaländerung bei den beiden Behandlungsreihen- mit Gdn und ohne Gdn war auch statistisch signifikant ($p < 0,05$ für beide). Darüber hinaus unterschieden sich die Pln-Effekte mit und ohne Gdn auch statistisch signifikant ($p < 0,05$). Es wurde auch eine starke Abhängigkeit des Plasmin-Effekts mit Guanidin von dem S-Hirnhomogenisat-Verdünnung beobachtet ($r^2 = 0,987$; Abbildung 16.).

Es wurde erwartet, dass sowohl die normalen, als auch die pathologischen Prionen nach ihrer Guanidin-induzierten Entfaltung vom Test erfasst werden können. Und tatsächlich, die höchsten Signale bei den parallelen Verdünnungen wurden immer bei den denaturierten Proben ohne

Spaltung gemessen. Da der Anteil der humanen Plasmaprionen über die ganze Reihe weitgehend konstant ist, ist es anzunehmen, dass der Gdn-Effekt hauptsächlich von dem zugegebenen Hamster-S-Hirnhomogenisat stammt. Auch die festgestellten Signale nach Plasmin-Spaltung und Denaturierung waren höher als diese nach alleiniger Plasmin-Spaltung. Dies deutet darauf hin, dass die Signale der Gdn-unbehandelten Probenreihen hauptsächlich vom PrP^C stammten und die Signale aus der Guanidin-behandelten-Reihen- von den beiden PrP-Isoformen (gesamt PrP=PrP^C +PrP^{Sc}). Somit ist der signifikante Unterschied zwischen den beiden Plasmin-Effekte bei den S-Hirn-Plasmaproben gut zu erklären.

Der Gdn-Effekt bei den nicht gespaltenen Proben und der Gdn-Effekt mit Pln zeigten eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Signalerhöhung und beide verminderten ihren Wert mit der Steigung der S-Hirnhomogenisat-Verdünnung (Abbildung 16. und Tabelle 11.). Durch die Verdünnung des S-Hirnhomogenisats im Plasma wird der Anteil der pathologischen Prionen im Vergleich zu den normalen immer kleiner, welcher sich im abfallenden Verlauf der entsprechenden Kurve (Abbildung 15.), sowie bei dem Gdn-Effekt und bei dem Gdn-Effekt mit Pln, widerspiegelt.

Die Verhältnisse denaturiert/nativ (Gdn-Effekte) waren fast immer höher nach SK-Behandlung als diese ohne SK-Behandlung über die ganze Verdünnungsreihe (Tabelle 11.). Durch die größere Streuung der einzelnen Werte des Gdn-Effekts mit Plasmin unterschieden sich aber nur tendenziell voneinander ($p = 0,084$).

Es wurde eine Streuung der Ergebnisse zwischen 0,3 % und 19,4 % VK beobachtet. Der Pln-Effekt ohne Gdn zeigte einen durchschnittlichen VK von 5,2 % und somit lag er eindeutig niedriger als der VK des Pln-Effekts mit Gdn: 9,5 %. Der Gdn-Effekt ohne Pln zeigte eine kleinere Streuung als der Gdn-Effekt mit Pln: von 0,7 % bis 4,3 % bzw. 2,6 % bis 15,6 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Proben, die sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} enthalten, der Plasmin-Effekt allein auch kleiner als 1 (Plasmin-Spaltung), jedoch die Zugabe des Guanidins zu einer PrP-Konzentrationsabhängigen Erhöhung des Messsignals führt. Die Plasmin-Behandlung der Proben vor Guanidin-Zugabe verstärkt diesen Effekt.

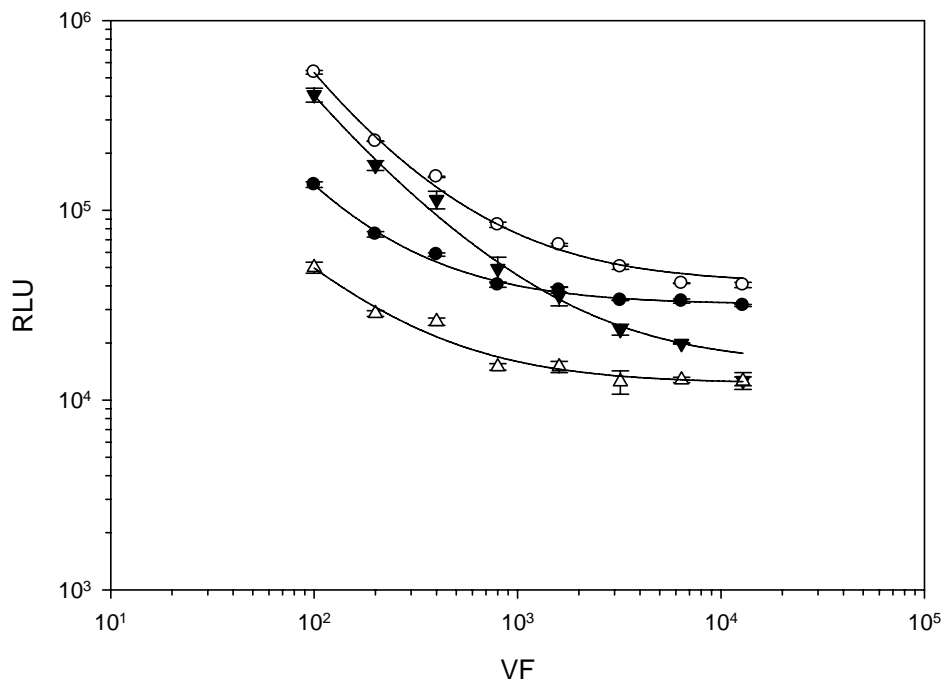


Abbildung 15. Plasma mit S-Hirnhomogenisat.

Signalstärke nach unterschiedlichen Behandlungen gegenüber der Verdünnung des S-Hirnhomogenisats im Plasma. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei Untersuchungen dargestellt. RLU- „relative luminescence units“; VF- Endverdünnungsfaktor.

○ nach Gdn; ▼ nach SK und Gdn; ● nativ; △ nach SK.

Die Regressionskurven sind durch nichtlineare Regression erstellt; $r^2 > 0,97$. Da das Homogenisat im Plasma verdünnt ist, zeigen die Kurven für native Proben einen flachen Verlauf bei den höheren Verdünnungen (Plasma-PrP ist über die ganze Verdünnungsreihe konstant).

VF	Pln-Effekt ohne Gdn	SD	Pln-Effekt mit Gdn	SD	Gdn-Effekt ohne Pln	SD	Gdn-Effekt mit Pln	SD
100	0,37	0,02	0,76	0,06	3,91	0,05	8,12	0,11
200	0,38	0,00	0,75	0,06	3,09	0,13	6,02	0,21
400	0,44	0,02	0,76	0,11	2,57	0,04	4,40	0,41
800	0,37	0,01	0,59	0,10	2,08	0,01	3,29	0,55
1 600	0,39	0,02	0,54	0,08	1,73	0,05	2,37	0,19
3 200	0,37	0,07	0,47	0,03	1,50	0,06	1,88	0,15
6 400	0,38	0,00	0,48	0,00	1,24	0,05	1,55	0,06
12 800	0,40	0,02	0,31	0,02	1,28	0,04	1,01	0,03

Tabelle 11. PS- alle Effekte.

VF- Endverdünnungsfaktor; SD- Standardabweichung.

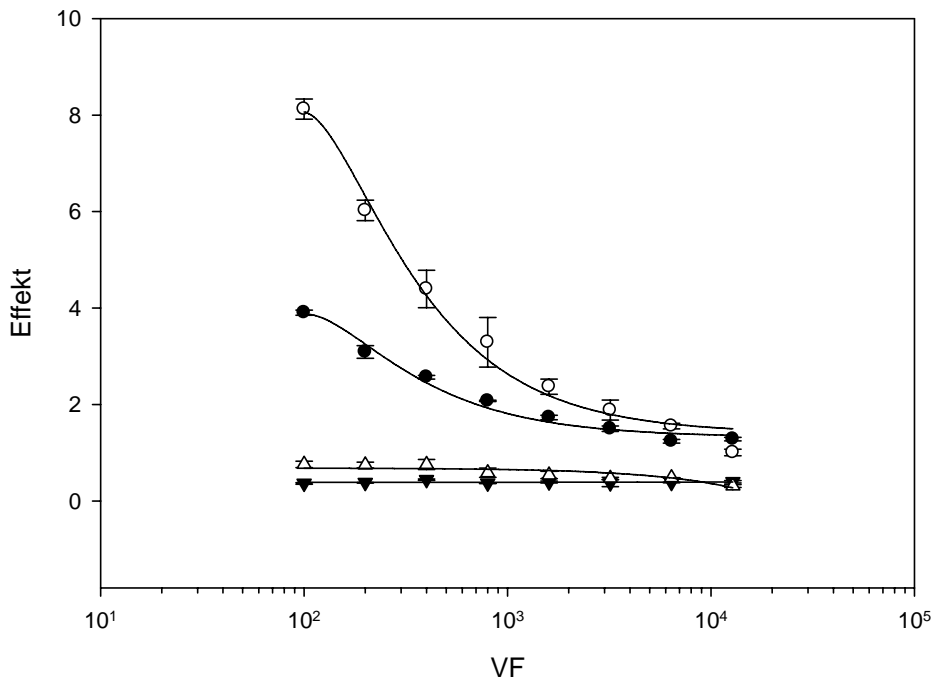


Abbildung 16. PS-Behandlungseffekte.

Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei Messungen dargestellt.

VF- Endverdünnungsfaktor; ○ Gdn-Effekt mit Pln; ● Gdn-Effekt ohne Pln; △ Pln-Effekt mit Gdn; ▼ Pln-Effekt ohne Gdn.

3.7 Vergleich der Ergebnisse von normalen und pathologischen Proben

In diesem Kapitel werden die einzelnen Behandlungseffekte bei normalen und pathologischen Proben verglichen.

VF	Pln-Effekt ohne Gdn		Pln-Effekt mit Gdn	
	PN	PS	PN	PS
100	0,43	0,37	0,42	0,76
200	0,37	0,38	0,39	0,75
400	0,39	0,44	0,40	0,76
800	0,35	0,37	0,35	0,59
1 600	0,38	0,39	0,38	0,54
3 200	0,38	0,37	0,41	0,47
6 400	0,37	0,38	0,37	0,48
12 800	0,34	0,40	0,34	0,31

Tabelle 12. Plasmin-Effekte für die beiden Probenreihen.

Pln- Plasmin; Gdn- Guanidin; PN- Humanplasma mit N-Hirnhomogenisat; PS- Humanplasma mit S-Hirnhomogenisat; VF- Endverdünnungsfaktor.

Der Pln-Effekt ohne Gdn ($\frac{P+SK-G}{P-SK-G}$) unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Reihen ($p=0,292$). Das lässt uns annehmen, dass die PrP^C-Spaltung durch Plasmin identisch in den beiden Probenreihen läuft. Über eine mögliche Spaltung von PrP^{Sc} ist eine Aussage schwierig zu treffen, da der Capture-Antikörper nur natives PrP^C und kein natives PrP^{Sc} erkennt und der genaue Anteil an PrP^{Sc} nicht eindeutig abzuschätzen ist.

Der Pln-Effekt mit Gdn ($\frac{P+SK+G}{P-SK+G}$) hatte ständig einen höheren Wert bei PS-Reihen als PN-Reihen. Er war auch fast über die ganze PS-Verdünnungsreihe höher als der Pln-Effekt allein. Dies spiegelt die Erfassung von intaktem PrP^{Sc} nach Denaturierung der Probe wieder. Mit steigender Verdünnung des S-Homogenisats bzw. fallender Konzentration von PrP^{Sc} neigt der Pln-Effekt mit Gdn zum Pln-Effekt gleicher Probe. **Bei Austestung einer unbekannt Probe auf die beiden Effekte, würden identische Werte für eine Probe ohne nachweisbare Konzentrationen von PrP^{Sc} sprechen und umgekehrt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Effekte (wie in diesem Fall- $p<0,05$) spräche für die Anwesenheit von PrP^{Sc} in der untersuchten Probe.**

VF	Gdn-Effekt ohne Pln		Gdn-Effekt mit Pln	
	PN	PS	PN	PS
100	1,37	3,91	1,33	8,12
200	1,23	3,09	1,29	6,02
400	1,35	2,57	1,37	4,40
800	1,35	2,08	1,33	3,29
1 600	1,32	1,73	1,32	2,37
3 200	1,27	1,50	1,36	1,88
6 400	1,35	1,24	1,35	1,55
12 800	1,33	1,28	1,31	1,01

Tabelle 13. Guanidin-Effekte für die beiden Probenreihen.

Pln- Plasmin; Gdn- Guanidin; PN- Humanplasma mit N-Hirnhomogenisat; PS- Humanplasma mit S-Hirnhomogenisat.

Der Gdn-Effekt ohne Pln ($\frac{P-SK+G}{P-SK-G}$) war signifikant unterschiedlich zwischen den normalen und den pathologischen Proben. Bei PN-Proben, (PrP^{Sc}-Konzentration gleich 0) liefert er uns Information über die Änderung des Signals nach Gdn-Behandlung einer Probe. Bei Proben, die PrP^{Sc} enthalten, ist dieser Effekt proportional dem PrP^{Sc}/PrP^C-Verhältnis.

Der Gdn-Effekt mit $\text{Pln} \left(\frac{P + SK + G}{P + SK - G} \right)$ bei normalen und pathologischen Proben war auch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Diese Werte waren höher als die des Gdn-Effekts allein bei PS-Proben. Bei konstanter Spaltung und Denaturierung ist er hauptsächlich vom Verhältnis $\text{PrP}^{\text{Sc}}/\text{Rest-PrP}^{\text{C}}$ abhängig. Daher verringert sich dieser Effekt parallel mit dem abfallenden PrP^{Sc} -Anteil in der S-Probenreihe und bleibt weitgehend konstant bei der N-Probenreihe.

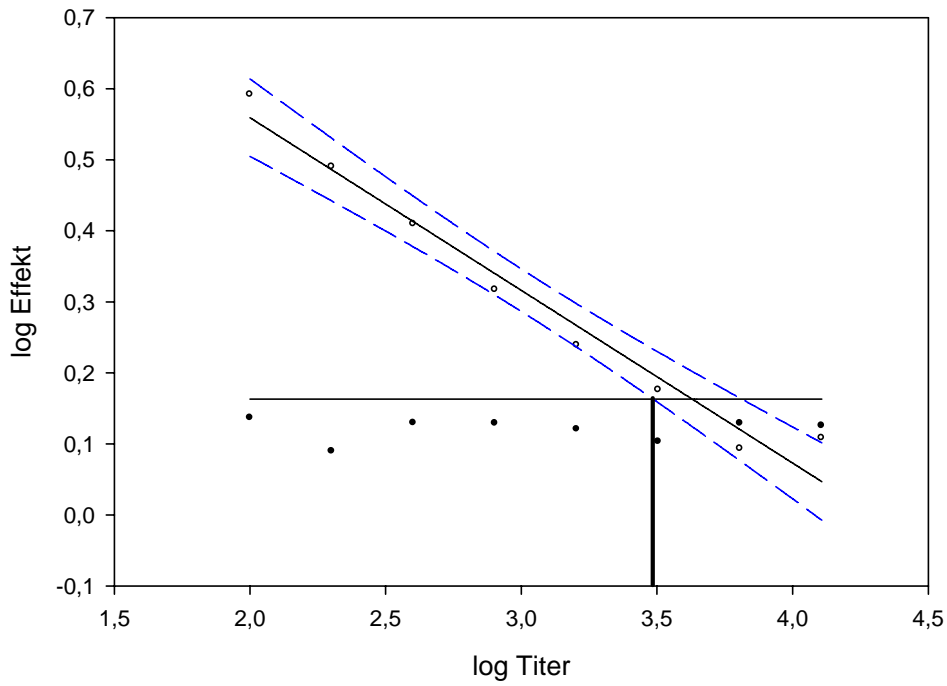
Aus den oben aufgeführten Daten wird klar, dass durch drei von vier Behandlungseffekten der Nachweis von PrP^{Sc} in Humanplasmaproben, die mit Hamsterhirnhomogenisat aufgestockt sind, möglich ist. Dies sind:

1. Pln -Effekt mit Gdn $\left(\frac{P + SK + G}{P - SK + G} \right)$
2. Gdn-Effekt ohne Pln $\left(\frac{P - SK + G}{P - SK - G} \right)$
3. Gdn-Effekt mit Pln $\left(\frac{P + SK + G}{P + SK - G} \right)$

Es stellt sich nunmehr die Frage, welche Sensitivität diese Methoden haben. Aus der weiteren Berechnung wurde der Pln -Effekt mit Gdn ausgeschlossen, da seine Trennschärfe viel geringer ist als die der beiden Gdn-Effekte. Bei einer Spaltungsrate von 100 % (PrP^{C} nach Spaltung gleich 0) entspräche er ohnehin dem reziproken Wert des Gdn-Effekts ohne Plasmin.

Für die Berechnung der Nachweisgrenze kann man aus den Ergebnissen der N-Reihen einen cut-off bilden und die analytische Sensitivität zum Nachweis von PrP^{Sc} berechnen. Als cut-off wird der Mittelwert plus zweimal die Standardabweichung des entsprechenden Effekts bei den N-Reihen angenommen. Damit würden alle PrP^{Sc} -negativen Proben mit 95,5 % Wahrscheinlichkeit unter der cut-off-Grenze liegen. Um den tatsächlichen Titer zu ermitteln, bei dem ein Wert durch diesen Effekt signifikant zu den PrP^{Sc} -positiven Proben zugeschrieben werden kann, wurden zuerst die Werte der entsprechenden Reihen logarithmiert. Für die S-Reihen wurde durch eine lineare Regression die best-fit Kurve ermittelt und der untere 95 % Konfidenzintervall der Regressionskurve berechnet. Der Schnittpunkt auf der x-Achse dieses Konfidenzintervalls mit der cut-off-Linie wurde als Nachweisgrenze (Titer) für das S-Homogenisat im Humanplasma angegeben (Abbildung 17.).

A



B

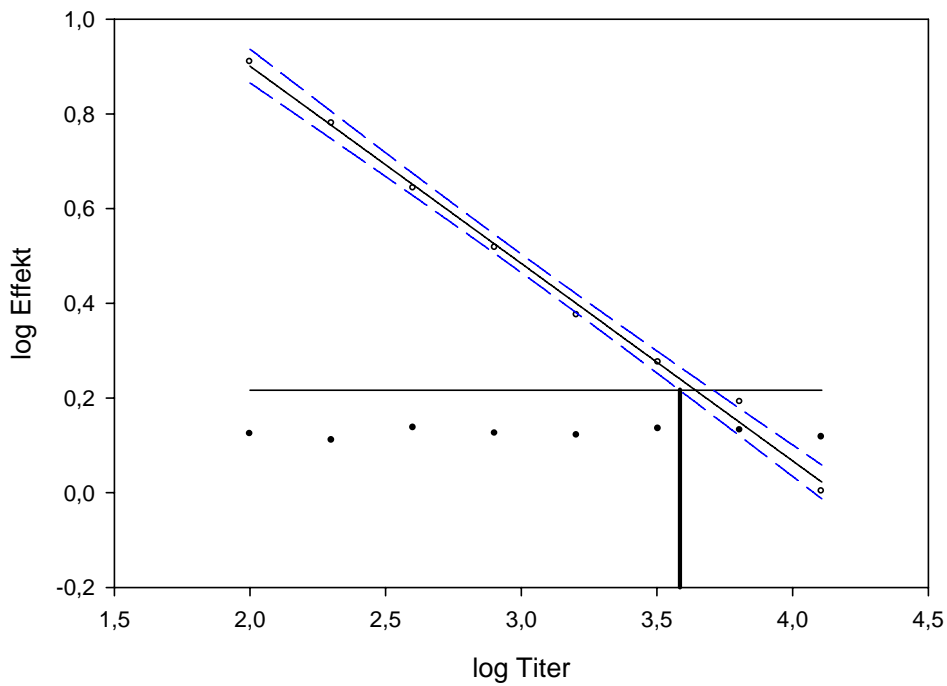


Abbildung 17. Berechnung der theoretischen Nachweisgrenze.

A- Guanidin-Effekt; B- Guanidin-Effekt mit Plasmin.

● N-Reihe; ○ S-Reihe; — cut-off; - - - 95 % Konfidenzintervall

Regressionskoeffizient für Guanidin-Effekt $r^2=0,969$, für Guanidin-Effekt mit Plasmin- $r^2=0,995$.

Für den Guanidin-Effekt ohne Plasmin ergab sich einen cut-off Wert von 1,46 und für den Guanidin-Effekt mit Plasmin von 1,65. Somit liegt die Nachweisgrenze für den Gdn-Effekt ohne Plasmin bei 1:2941 und für Gdn-Effekt mit Plasmin- bei 1: 3810. Daher zeigt die zweite Methode (Gdn-Effekt mit Plasmin) eine Verbesserung der Sensitivität um 23%.

Die hier aufgeführten Titer sind Endverdünnungen auf der Mikrotiterplatte, soweit die Signale aus diesen Verdünnungen verglichen wurden. Jeder Verdünnungspunkt des Hirnhomogenisats im Plasma wurde aber noch 40fach weiterverdünnt (Gdn-Zugabe und ELISA-Puffer). So würde der tatsächliche Titer dann bei 1: 74 bzw. 1: 95 liegen.

Vor kurzem wurden die PrP-Konzentration im normalen und im Scrapie-infizierten Hamsterhirn auf $7,5 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$ bzw. $57,3 \pm 9,6 \mu\text{g/g}$ geschätzt (61). Die in dieser Arbeit verwendeten Homogenisate waren eine 10 % Lösung (1 g Gewebe in 10 ml PBS). Aus diesen Daten könnte man errechnen, dass durch den Gdn-Effekt ohne Plasmin 169 pg PrP^{Sc} und durch den Gdn-Effekt mit Plasmin 131 pg PrP^{Sc} auf der Platte signifikant nachgewiesen werden können. Aufgrund der zusätzlichen Verdünnung, um die Gdn-Interaktionen mit den Antikörpern zu vermeiden, liegt die tatsächliche Konzentration in der Probe viel höher. Man könnte auch mit hoher Sicherheit annehmen, dass das PrP^{Sc} im Überschuss gegenüber PrP^C in den hier verwendeten Proben gewesen war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch Plasminspaltung und nachfolgende Guanidin-Denaturierung zwischen Plasmaproben mit N-Hirnhomogenisat und Plasmaproben mit S-Hirnhomogenisat sensitiver und mit ausreichender Signifikanz unterscheiden lässt, als nur bei einfacher Denaturierung der Proben. Die tatsächliche PrP^{Sc}-Konzentration in den verwendeten Proben liegt jedoch höchstwahrscheinlich im ng/ml-Bereich, was für einen Früherkennungstest im Sinne des Blutspender-Screening nicht ausreichend wäre.

4 Diskussion

Die Sicherheit von Blutprodukten bezüglich einer Infektionsübertragung wird grundsätzlich durch Ausschluss des betroffenen Spenders von der Blutspende gewährleistet. Die Entscheidung für einen Ausschluss wird aufgrund von klinischen Zeichen oder dem Labornachweis des Erregers im Blut getroffen. Während für eine Reihe von Infektionskrankheiten (Hepatitis, HIV u.a.) sensitive Methoden zum Erregernachweis im Blut im präklinischen Stadium zur Verfügung stehen, stellen asymptomatische, aber vCJD-infizierte Spender ein großes Problem der Sicherheit von Blutprodukten dar (143). Daher ist die Entwicklung eines sensitiven und spezifischen Screening-Tests für eine zeitnahe Diagnosestellung von vCJD für das Blutspendewesen von größter Bedeutung.

Die Idee dieser Arbeit stützte sich auf die Tatsache, dass das rekombinante PrP^C durch Plasmin an der Aminosäure Lys110 in zwei Teilen gespalten wird, das PrP^{Sc} jedoch aufgrund seiner pathologischen Faltung nicht und dass das PrP^{Sc} gegenüber Proteinase-Verdauung eine Teilresistenz besitzt (127). Zur Thematik der Spaltung von nativem PrP sowie über die Möglichkeit, diese durch plasmaeigenes Plasminogens durchzuführen, standen keine Literaturangaben zur Verfügung.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine reproduzierbare und relativ schnelle Nachweismethode für PrP^{Sc} im Plasma zu entwickeln.

Hierzu sollte eine Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern verwendet werden. Zuerst musste eine eigene ELISA-Methode entwickelt und validiert werden, so dass die entsprechende Sensitivität und Reproduzierbarkeit des quantitativen PrP^C-Nachweises im Plasma sichergestellt wird. Gleichzeitig sollte ein passendes Antikörperpaar ausgewählt werden, um das ganze PrP-Molekül zu erfassen. Danach sollte die PrP^C-Spaltung durch Plasmin in diesem ELISA-Test untersucht und validiert werden. Anschließend sollte die Möglichkeit zum sensitiven Nachweis von PrP^{Sc} in humanen Plasmaproben, aufgestockt mit Hirnhomogenisaten von an Scrapie erkrankten Hamstern, untersucht werden. Vier verschiedene Ansätze zur Vorbehandlung der Proben wurden ausgetestet und bezüglich ihrer Sensitivität verglichen: native Proben, Proben nach Plasminspaltung, denaturierte Proben und Proben nach Plasminspaltung und Denaturierung.

4.1 ELISA-Test zum Nachweis von PrP

Ein Teil dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines quantitativen ELISA-Tests zum Nachweis von PrP. Der Test wurde als Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern aufgebaut und mit huPrPrec kalibriert. Dies erlaubte eine Sensitivität von 26 pg/ml, berechnet aus der Eichkurve. Dieser Wert ist vergleichbar mit früheren Berichten, in denen die PrP-

Konzentration bestimmt wurde. So beschrieben Völkel et al. (161) in einem ähnlich aufgebauten Test mit zwei monoklonalen Antikörpern- 6H4 und 3F4, eine Sensitivität von ca. 20 pg/ml. In einer früheren Arbeit von Barnard et al. mit dem moAk FH11 als Capture-Antikörper und 3F4 als Detektor-Antikörper, wurde eine Sensitivität von 55,6 pg/ml erreicht (4). Ein lineares Signal konnte in unserem Test mit huPrPrec von 0,02 ng/ml bis 5 ng/ml festgestellt werden. Bei Plasmaproben hingegen konnte eine lineare Beziehung nur im Bereich von 2,6 bis 0,123 ng/ml nachgewiesen werden. Dies ist vereinbar mit den Daten von Völkel et al. bei denen die Nachweisgrenze für PrP im Humanplasma von 20 auf 50 pg/ml limitiert wird. Dies spiegelt den Effekt des Plasmamatrix auf die Hintergrundsignale wieder (138, 161).

In unserem Test ermittelten wir Variationskoeffizienten von 4,6 % bis 7,3 % und von 7,7 % bis 11,5 % in Serie bzw. von-Tag-zu-Tag. Auch die käuflichen ELISA-Tests zum Nachweis von PrP verfügen laut Hersteller über eine vergleichbare Präzision. So zeigt der “Enzyme Immunoassay Kit For The Determination of PrP^C” (SpiBio, Massy Cedex, Frankreich, Kat.Nr. A05201) VK von 4,6 % und 11,1 % in Serie bzw. von-Tag-zu-Tag für humanes Prionprotein. Vergleichbare Variationskoeffizienten von 6,1 % bis 8,8 % in Serie und von 6,2 % bis 9,7 % von-Tag-zu-Tag berichteten auch andere Autoren für ELISA-basierte Tests zum Nachweis von PrP (4).

Die Richtigkeit des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tests wurde durch Aufstockung des Analyts in der Probe überprüft. Dafür wurden genaue Mengen von huPrPrec in einer nativen Matrix (Humanplasma) verdünnt. Die PrP-Konzentration in der Probe wurde vor und nach der Aufstockung gemessen und mit der erwarteten Konzentration verglichen. Eine maximale Abweichung von 8 % von der erwarteten Konzentration wurde festgestellt. Somit lässt sich sagen, dass der von uns entwickelte ELISA-Test einen sensitiven und präzisen quantitativen Nachweis von PrP leisten kann.

4.2 Spalten von PrP^C in Humanplasma

Die meisten Autoren, die das Zusammenwirken des Plasminogens und PrP untersucht haben, verwendeten rekombinantes PrP sowie den Plgn-Aktivator t-PA. Kornblatt et al. zeigten im Jahr 2003 (81), dass das PrP^C durch humanes Plasminogen gespalten wird. Für ihre Untersuchungen verwendeten die Autoren rekombinantes Schaf-PrP, humanes Plasminogen und als Plasminogenaktivator t-PA. Zu einem Reaktionsgemisch aus Reaktionspuffer, recPrP und Plgn im mikromolaren Bereich, wurde t-PA zugegeben. Das Gemisch wurde bei niedrigen Temperaturen (0°C) inkubiert und in verschiedenen Zeitabständen das PrP durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen. Die Spaltungsrate wurde durch Densitometrie gemessen. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde eine 55%-Spaltung des PrP^C durch 0,3 µM Pln für 120 Minuten beobachtet.

Im Unterschied zu anderen Arbeiten wurde in der hier vorgelegten Studie eine Spaltung des nativen PrP^C durch plasmaeigenes Plasmin im Humanplasma nachgewiesen. Dies erfolgte in einem speziell konzipierten ELISA-Test. Mit dem Antikörperpaar 3F4/SAF32-B entsprechend der Epitope beider Antikörper, sollten nur PrP-Moleküle erfasst werden, die zumindest die AS 52-112 haben. Nach erfolgter Spaltung des PrP-Moleküls durch Plasmin an der Primärspaltstelle bei Lys110, werden PrP von 3F4 nicht gebunden (Zerstörung des Epitops) und folglich mit SAF32-B auch nicht detektiert. Dies bedeutet, dass in diesem Test vom Design her nur nicht gespaltene PrP-Moleküle bzw. PrP-Moleküle mit zugänglichem Epitop für 3F4 nachweisbar sind.

Eine weitere Überlegung sprach für die Auswahl von 3F4 als Capture-Antikörper. Grundsätzlich könnte auch ein anderer, C-terminal bindender Antikörper verwendet werden (z.B. SAF61, Epitop: AS 142-160). Nach erfolgter Plasminspaltung würden sich in der Probe C-Segmente (AS 111-231) von PrP befinden, die dann mit den nicht gespaltenen (ganzen, AS 23-231) PrP-Moleküle um die begrenzten Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Das könnte unter Umständen die Sensitivität des Tests für ganze Moleküle (welche er eigentlich detektiert) begrenzen. Als Aktivator für das endogene Plasminogen wurde in unserem Test Streptokinase ausgewählt. Die Streptokinase bildet sehr schnell einen 1:1 stöchiometrischen Komplex mit Plasminogen. Dieser Komplex hat auch eine Plasmin-ähnliche Aktivität und ist viel insensitiver gegenüber α_2 -Antiplasmin als Plasmin (32). Die optimalen Spaltungsbedingungen wurden durch Austestung verschiedener Streptokinase-Konzentrationen und Reaktionstemperaturen ermittelt. Die beste Spaltungsrate wurde nach 60 Minuten Inkubation der Proben mit 44 kU/ml SK bei 37°C erreicht. Es wurden zwischen 19 % und 21 % der PrP-Ausgangskonzentration nachgewiesen, das bedeutet eine 80%-Spaltung der nachweisbaren PrP-Menge.

In unseren Versuchen konnten wir im Unterschied zu Kornblatt et al. keine komplette PrP-Spaltung beobachten. Diese Arbeitsgruppe berichtet über eine komplette Auflösung des elektrophoretischen PrP-Bands nach 128 Minuten Inkubation mit t-PA und Plasminogen. Ein Grund dafür ist, dass die Autoren höhere Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer (μM) verwendeten, um eine schnellere Reaktion zu erreichen. In Plasmaproben ist das Verhältnis Plasminogen/PrP individuell vorgegeben und weit von dem von Kornblatt et al. eingesetzten 1:1 Verhältnis in einem streng kontrollierten Reaktionsgemisch entfernt. Ein anderer Grund ist der Unterschied zwischen rekombinantem und nativem PrP^C. Während das rekombinante PrP nicht glykosyliert ist stellt das Plasma-PrP^C wahrscheinlich ein Gemisch aus de-, mono- und diglykosylierten Peptiden dar. Cuccioloni et al. (43) haben gezeigt, dass die kinetischen Parameter der Komplexbildung zwischen PrP und Plasminogen von pH und Glykosylierung abhängig sind und dass das deglykosylierte native PrP^C eine ähnliche Kinetik der Komplexbildung wie das rekomb-

binante PrP aufweist. Nichtzuletzt sind auch Matrixeffekte des Plasmas als Ursache für die nicht vollständige Spaltung zu erwähnen (61).

4.3 Nachweis von PrP^{Sc} nach Plasminspaltung und Denaturieren

Als Capture-Antikörper in unserem Test wurde der monoklonale Antikörper 3F4 eingesetzt. Die Spezifität dieses Antikörpers schließt humanes und Hamster-PrP ein. Das Epitop ist AS 109-112. 3F4 reagiert sehr gut mit PrP^C, aber nicht mit PrP^{Sc}. Das wird durch die Fehlfaltung des PrP^{Sc} erklärt, so dass die Bindungssequenz des Antikörpers verdeckt wird („buried core“). Nach Denaturieren und Entfalten des PrP^{Sc} zeigt 3F4 eine ähnliche Reaktivität wie mit PrP^C (124). Um einen kompletten Nachweis von PrP^{Sc} zu gewährleisten, sollten die Proben denaturiert werden. Dies erfolgte in unserem Test mittels Guanidin in einer effektiven Konzentration von 4 mol/l.

Es ist klar, dass im ELISA-Test nur PrP nachgewiesen wird und die tatsächliche Unterscheidung zwischen pathologischen (PrP^{Sc}-enthaltenden) und normalen (nur PrP^C enthaltenden) Proben durch die Behandlung der Proben erfolgt (Spalten und/oder Denaturieren). Um den Unterschied zwischen den beiden Probentypen zu erforschen, wurden vier verschiedene Kombinationen aus den Behandlungen untersucht: native, denaturierte, gespaltene und gespaltene und denaturierte Proben. Da unter den hier beschriebenen Testbedingungen keine vollständige (100-prozentige) PrP^C-Spaltung erreicht wurde und um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Probentypen zu ermöglichen, wurden die Effekte der Probenbehandlungen auf das Messsignal als Verhältnis mit Behandlung/ohne Behandlung (s. Kap. 2.2.6.) dargestellt. Als Proben wurden Gemische aus gepooltem Humanplasma und Hamsterhirnhomogenisaten aus gesunden und an Scrapie erkrankten Tiere im Terminalstadium verwendet.

Es hat sich herausgestellt, dass drei von diesen vier Behandlungskombinationen PrP^{Sc} in Humanplasmaproben nachweisen können. Der Plasmin Effekt mit Guanidin stellt das Verhältnis zwischen dem Messsignal nach Plasminspaltung und nachfolgender Denaturierung gegenüber dem Messsignal nach alleiniger Denaturierung der Probe. Bei einer Spaltungsrate von 100 % entspräche er dem reziproken Wert des Guanidin-Effekts ohne Plasmin und daher wurde er aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Der Guanidin-Effekt ohne Plasmin stellt das Verhältnis zwischen dem Messsignal nach alleiniger Denaturierung gegenüber dem Messsignal einer nativen (nicht behandelten) Probe dar. Er beruht ausschließlich auf die Zugänglichkeit des 3F4-Epitops im PrP^{Sc} nach Denaturierung. Somit stellt er eine Information über die Ratio Gesamt-PrP (sowohl PrP^{Sc} als auch PrP^C) zu PrP dar und ist proportional der PrP^{Sc}-Konzentration in der Probe. Die Nachweisgrenze dieses Effekts wurde von uns auf einer Endverdünnung des Scrapie-Hirnhomogenisats von 1: 2 941 ($10^{-3,5}$) berechnet. Aufgrund der zusätzlichen Probenverdünnung,

um die Interferenzen von Guanidin mit den Antikörpern zu vermeiden, liegt die Ausgangsverdünnung jedoch nur bei 1:74. Der Guanidin-Effekt mit Plasmin stellt das Verhältnis zwischen dem Messsignal nach Plasminspaltung und nachfolgender Denaturierung gegenüber dem Messsignal nach alleiniger Plasminspaltung der Probe. Hier wird die Spaltbarkeit des PrP^C durch Plasmin und die Zugänglichkeit des 3F4-Epitops im PrP^{Sc} nach Denaturierung verwendet. Dieser Effekt zeigte eine Verbesserung der Sensitivität von 23 % gegenüber dem Guanidin-Effekt allein- Nachweisgrenze von 1: 3 810 ($10^{-3,6}$) bzw. 1: 95.

Für die alleinige Spaltbarkeit des PrP^C durch Plasmin und die Resistenz des PrP^{Sc} spricht der Fakt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spaltungsraten in beiden Probenotypen beobachtet wurden. Auch die Signaldifferenzen von denaturierten Scrapie-Proben und nativen Scrapie-Proben ohne Plasminspaltung und nach Plasminspaltung unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die meisten zugelassenen Tests zum Nachweis von BSE trennen beide Isoformen von PrP nach limitierter Proteinase K-Verdauung. Nach dieser Behandlung wird PrP^C komplett und PrP^{Sc} nur teilweise zu Protease-resistenten PrP^{res} verdaut (128). Es gibt aber Hinweise dafür, dass PK-sensitive PrP^{Sc}-Isoformen (Konformer) existieren, die auch für die TSE-Pathogenese relevant sein können (122, 169). Plasmin hingegen hat durch seine Primärspaltstelle für PrP bei Lys110 eine viel engere Substratspezifität als Proteinase K (126). Die Region, in dem sich diese Primärspaltstelle befindet, wird als Schlüsselregion für die Konformationsänderung während der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} angesehen (52, 148). Die Frage, inwieweit die oben genannten PK-sensitiven PrP^{Sc}-Isoformen auch Plasmin sensitiv sind, bleibt offen.

Die Tatsache, dass erst nach PrP^{Sc}-Denaturieren das Epitop für 3F4 zugänglich wird, wurde auch im „conformation dependent immunoassay“ (CDI) von Safar et al. (138) verwendet. In diesem auch ELISA-basierten Test werden die Verhältnisse denaturiert/nativ verwendet, um zwischen nur PrP^C und PrP^{Sc} zu unterscheiden. Für die PrP^{Sc}-Entfaltung wurde auch Guanidin eingesetzt und die Signalerfassung erfolgte durch zeitaufgelöste Fluoreszenz (DELFI). Die Sensitivität dieses Tests wurde mit einer Verdünnung von ca. 10^{-4} für Scrapie-Prionen in Hamsterhirnhomogenisat (138) und von $10^{-3,7}$ für BSE und CWD-Prionen angegeben (137). Ein wesentlicher Unterschied von dem hier vorgelegten Test ist jedoch die Verwendung eines Anreicherungsschrittes vor der eigentlichen Austestung und zwar die Präzipitation des PrP durch Phosphorwolframat. Für diese Sensitivität könnte auch die Berechnungsmethode bei CDI beitragen (Nachweisgrenze gegenüber dem Medianwert der normalen Proben im Vergleich zu Mittelwert +3 mal die Standardabweichung).

Vor kurzem wurden die PrP-Konzentration im normalen und im Scrapie-infizierten Hamsterhirn auf $7,5 \pm 0,9$ $\mu\text{g/g}$ bzw. $57,3 \pm 9,6$ $\mu\text{g/g}$ geschätzt (61). Die eingesetzte Methode implementiert e-

benfalls einen Anreicherungsschritt. Dies erlaubte den Autoren auch die Berechnung der Konzentration von PrP^{Sc} im Hamster-Plasma, die bei 32 fg/ml lag. Die von uns verwendeten Homogenisate waren eine 10% Lösung (1 g Gewebe in 10 ml PBS). Aus diesen Daten könnte man errechnen, dass durch den Gdn-Effekt ohne Plasmin 1,69 ng/ml PrP^{Sc} und durch den Gdn-Effekt mit Plasmin 1,31 ng/ml PrP^{Sc} auf der Platte signifikant nachgewiesen werden können. Diese Sensitivität ist leider für einen Früherkennungstest im Sinne des Blutspender-Screening nicht ausreichend.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch Plasminspaltung und nachfolgende Denaturierung zwischen Plasmaproben mit N-Hirnhomogenisat und Plasmaproben mit S-Hirnhomogenisat sensitiver und mit ausreichender Signifikanz unterscheiden lässt, als nur bei einfacher Denaturierung der Proben. Somit könnte diese Methode als Plattform zur Entwicklung eines PrP^{Sc}-Screening-Tests dienen.

5 Zusammenfassung

Die Möglichkeit der Übertragung von vCJD durch Bluttransfusionen stellt ein großes Risiko für das Blutspendewesen dar. Dieses Risiko könnte durch die Einführung eines Screening-Tests zum Nachweis von vCJD in präklinischen Stadien minimiert werden. Auf der Suche nach einer geeigneten Plattform zur Entwicklung eines Screening-Test im Blut wurde die PrP^C-Spaltung durch mittels Streptokinase (SK) aktiviertes Plasminogen und/oder Aufdecken von Kryptepitopen in PrP^{Sc} nach Denaturierung untersucht. In einem speziell konzipierten ELISA-Test mit zwei monoklonalen Antikörpern wurde die PrP^C-Spaltung durch endogenes Plasmin nachgewiesen. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C mit 44 kU/ml SK wurden nur 20 % der PrP^C-Ausgangskonzentration im Plasma detektiert. Humane Plasmaproben, aufgestockt mit Hirnhomogenisaten aus gesunden und an Scrapie erkrankten Hamstern, wurden nach vier verschiedene Vorbehandlungen im ELISA ausgetestet: native Proben, Proben nach Plasminspaltung, denaturierte Proben und Proben nach Plasminspaltung und Denaturierung.

Unter diesen Testbedingungen konnte keine PrP^{Sc}-Spaltung durch SK-aktiviertes Plasminogen festgestellt werden. Die Denaturierung der pathologischen Proben konnte eine Scrapie-Hirnhomogenisat-Verdünnung in Humanplasma von $10^{-3,5}$ signifikant von den normalen Proben unterscheiden. Die Einführung der Plasminspaltung vor der Denaturierung erzeugte einen signifikanten Unterschied der pathologischen Proben von den normalen Proben bis zu einer Hirnhomogenisat-Verdünnung in Humanplasma von $10^{-3,6}$.

Der entwickelte ELISA-Test ist ein neues und relativ einfaches Verfahren zum Nachweis von PrP^{Sc} in humanem Plasma. Nach Optimierung der Nachweisgrenze könnte er zum Blutspender-Screening-Test weiterentwickelt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

AS	Amniosäuresequenz
BSE	Bovine spongiforme encephalopathy
CDI	Conformation dependent Immunoassay
CJD	Creutzfeld-Jakob-Erkrankung
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EUE	exotic ungulate encephalopathy
FFI	„Fatal familial insomnia“- tödliche familiäre Schlaflosigkeit
FSE	Feline spongiforme encephalopathy
Gdn	Guanidin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann–Sträussler–Scheinker-Syndrom
HRP	Horseradish Peroxidase
huPrPrec	Humanes rekombinantes PrP
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Proteinase K
Plgn	Plasminogen
Pln	Plasmin
PMCA	Protein misfolding cycling amplification
PrP ^C	Die normale, nicht infektiöse Isoform des PrP
PrP ^{Sc}	Die pathologische, infektiöse Isoform des PrP
RLU	Relative luminescence units
SAF	Scrapieassoziierte Fibrillen
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SK	Streptokinase
TME	Transmissible mink-encephalopathy
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
vCJD	Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung
VK%	Variationskoeffizient in Prozent

7 Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

Abbildung 1. Schematische Darstellung der PrP ^C -Struktur.....	10
Abbildung 2. Testdesign.....	27
Abbildung 3. Probenbehandlung.....	28
Abbildung 4. Titrieren des Detektor-Antikörpers SAF32-B.....	31
Abbildung 5. Plasmaverdünnungsreihen.....	33
Abbildung 6. PrP-Restkonzentrationen in drei Plasmaproben nach SK-Zugabe.....	38
Abbildung 7. PrP-Restkonzentrationen als % von der Ausgangskonzentration.....	39
Abbildung 8. Streptokinase-Interferenz im ELISA.....	40
Abbildung 9. PrP-Konzentration im Citratplasma ohne SK-Zugabe.....	41
Abbildung 10. PrP-Spaltung nach SK-Zugabe bei verschiedenen Temperaturen.....	42
Abbildung 11. Effekt des Guanidins auf den capture Antikörper in ELISA.....	43
Abbildung 12. Nachweis von Hamster-PrP.....	44
Abbildung 13. Plasma mit N-Homogenisat.....	48
Abbildung 14. Plasma mit N-Homogenisat- alle Effekte.....	49
Abbildung 15. Plasma mit S-Hirnhomogenisat.....	51
Abbildung 16. PS-Behandlungseffekte.....	52
Abbildung 17. Berechnung der theoretischen Nachweisgrenze.....	55

7.2 Tabellen

Tabelle 1. Humane TSE (nach 159, mit Modifikationen).....	5
Tabelle 2. Vergleich der biochemischen Charakteristika von PrP ^C , PrP ^{Sc} und PrP ²⁷⁻³⁰ (nach 159, mit Modifikationen).....	12
Tabelle 3. Titrieren des Detektor-Antikörpers SAF32-B.....	31
Tabelle 4. Analytische Sensitivität.....	32
Tabelle 5. Linearität der quantitativen Messung von PrP ^C in Humanplasma.....	33
Tabelle 6. Präzisionsmerkmale des Tests.....	34
Tabelle 7. Ergebnisse der Wiederfindung-Versuche.....	35
Tabelle 8. Verhältnis nativ/denaturiert für Plasmaproben mit Guanidin.....	43
Tabelle 9. Verhältnis denaturiert/nativ für die Hamster-Hirnhomogenisate.....	45
Tabelle 10. Plasma mit N-Homogenisat- alle Effekte.....	48
Tabelle 11. PS- alle Effekte.....	51
Tabelle 12. Plasminwirkungen für die beiden Probenreihen.....	52
Tabelle 13. Guanidineffekte für die beiden Probenreihen.....	53

8 Literaturverzeichnis

1. Aksamit A, Preissner M, Homburger A. Quantitation of 14-3-3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2001;57:728–730.
2. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967;214(90):764–766.
3. 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.* 1995; 176, 403-411.
4. Barnard G, Helmick B, Madden S, Gilbourne C, Patel R. The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE. *Luminescence* 2000;15:357-362.
5. Barnewitz K, Maringer M, Mitteregger G, Giese A, Bertsch U, Kretzschmar HA. Unaltered prion protein cleavage in plasminogen-deficient mice. *Membr Cell Bioph Biochem* 2006; 17; 53-59
6. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986; 46, 417-428.
7. Beekes M, Otto M, Wiltfang J, Bahn E, Poser S, Baier M. Late increase of serum S100 beta protein levels in hamsters after oral or intraperitoneal infection with scrapie. *J. Infect. Dis.* 1999;180:518–520.
8. Bellon A, Seyfert-Brandt W, Lang W, Baron H, Groner A, Vey M. Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J. Gen. Virol.* 2003; 84, 1921-1925.
9. Bendheim P, Barry R, DeArmond J, Stites D, Prusiner S. Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* 1984; 310, 418-421.
10. Bohmfalk J, Fuller G. Plasminogen is synthesized by primary cultures of rat hepatocytes. *Science* 1980; 209: 408–10.
11. Bolton D, McKinley M, Prusiner S. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218(4579):1309–1311.

12. Bolton D, McKinley M, Prusiner S. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry* 1984; 23, 5898-5906.
13. Bolton D, Meyer R, Prusiner S. Scrapie PrP27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 1985; 53, 596-606.
14. Borchelt D, Taraboulos A, and Prusiner S. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 16188-16199.
15. Bosque P, Ryou C, Telling G, Peretz D, Legname G, DeArmond S et al. Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99(6):3812–3817.
16. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(42):39145–39149.
17. Boxrud P, Verhamme I, Bock P. Resolution of conformational activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by Streptokinase. *J Biol Chem* Vol. 2004; 279, No. 35, 36633–36641
18. Brown D, Qin K, Herms J, Madlung A, Manson J, Strome R et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997;390:684–687.
19. Brown D, Schmidt B, Groschup M, Kretzschmar H. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur. J. Cell Biol.* 1998;75(1):29–37.
20. Brown H, Goller N, Rudelli R, Merz G, Wolfe G, Wisniewski H et al. The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol.* 1990 (Berl.) 80(1):1–6.
21. Brown P, Cervenakova L, Diringer H. Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2001; 137:5–13.
22. Brown P. Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sang.* 2005; 89:63–70.
23. Bruce M, Will R, Ironside J, McConnell I, Drummond D, Suttie A et al. Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997;389: 489-501.

24. Bler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H, DeArmond S et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356, 577-582.
25. Burger D, Hartsough G. Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.* 1965;115(4):393-399.
26. Carmona P, Monleon E, Monzon M, Badiola J, Monreal J. Raman analysis of prion protein in blood cell membranes from naturally affected scrapie sheep. *Chem. Biol.* 2004;11:759-764.
27. Cashman N, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak R, Bolton D et al. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 1990;61(1):185-192.
28. Castilla J, Saa P, Soto C. Detection of prions in blood. *Nat. Med.* 2005;11:982-985.
29. Caughey B, Chesebro B. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends in Cell Biology* 1997;7:56-63.
30. Caughey B, Raymond G. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J. Virol.* 1993;67:643-663.
31. Caughey B. Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cellculture. *British Medical Bulletin* 1993;49:860-872.
32. Cederholm-Williams S, Decock F, Lijnen H, Collen D. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and α 2-antiplasmin. *Eur J Biochem* 1979;100:125-127.
33. Chang B, Cheng X, Yin S, Pan T, Zhang H, Wong P et al. Test for detection of disease-associated prion aggregate in the blood of infected but asymptomatic animals. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007;14:36-43.
34. Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blttler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 1996;347:1181.
35. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985; 315:331-333.
36. Cohen F, Pan K, Huang Z, Baldwin M, Fletterick R, Prusiner S. Structural clues to prion replication. *Science* 1994;264(5158):530-531.

37. Cohen F, Prusiner S. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:793–819.
38. Collen D, Lijnen H. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991;78: 3114-24.
39. Collinge J, Palmer M. Molecular genetics of human prion diseases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1994;343:371–378.
40. Collinge J, Sidle K, Meads J, Ironside J, Hill A. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of ‘new variant’ CJD. *Nature* 1996;383:685-690.
41. Collinge J, Whittington M, Sidle K, Smith C, Palmer M., Clarke A et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994;370:295–297.
42. Creutzfeldt H. Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung. *Z. f. d. ges. Neurol. Und Psych.*, 1920;1–18.
43. Cuccioloni M, Amici M, Eleuteri A, Biagetti M, Barocci S, Angeletti M. Binding of recombinant PrPc to human plasminogen: kinetic and thermodynamic study using a resonant mirror biosensor. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 2005;58:728–734.
44. Curin S, Bresjanac M, Popovic M, Pretnar H, Galvani V, Ruprecht R et al., Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob’s diseaseaffected and normal brain tissue. *J. Biol. Chem.* 2004;279:3694–3698.
45. Dati F. Referenzmaterialien und Richtlinien zur Standardisierung labordiagnostischer Methoden. In: Thomas L. Labor und Diagnose. 6. Auflage. Frankfurt/Main, Deutschland: TH-Books-Verlagsgesellschaft, 2005:1882-1914
46. Deleault N, Harris B, Rees J, Supattapone S. From the cover: formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:9741–9746.
47. Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G et al. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res.* 2004;64(2):719–727.
48. Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe A, Streeten B, Cowen D. Letter: Possible person-to- person transmission of Creutzfeldt–Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 1974;290(12):692–693.

49. Eigen M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry* 1996;63:A1-A18.
50. Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner *Biochem* 2002;41:6891–6896.
51. Fischer M, Roeckl C, Parizek P, Schwarz H, Aguzzi A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 2000; 408: 479-83.
52. Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993;362:543–546
53. Gajdusek D, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of Kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* 1957;257(20):974– 978.
54. Gerstmann J, Straussler E, Scheinker I. Über eine eigenartige hereditäre familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1936;154:736–762.
55. Gibbs C, Bolis C. Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol. Psychiatry* 1997;2(2):146–147.
56. Glock B, Winter M, Rennhofer S, Brunholz E, Troscher D, Reisacher R et al. Transcript level of erythroid differentiation-related factor, a candidate surrogate marker for transmissible spongiform encephalopathy diseases in blood, shows a broad range of variation in healthy individuals. *Transfusion* 2003;43:1706–1710.
57. Graner E, Mercadante A, Zanata S, Forlenza O, Cabral A, Veiga S et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000;76(1):85–92.
58. Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N. Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res* 2008;39: 33-37.
59. Green A. Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2002;28:427–440.

60. Green AJ, Jackman R, Marshall TA, Thompson EJ. Increased S-100b in the cerebrospinal fluid of some cattle with bovine spongiform encephalopathy, *Vet. Rec.* 1999; 145:107–109.
61. Gregori L, Gray B, Rose E, Spinner D, Kascsak R, Rohwer R. A sensitive and quantitative assay for normal PrP in plasma. *J Vir Meth.* 2008;149: 251-259.
62. Griffith J. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967;215(105):1043–1044.
63. Grosset A, Moskowitz K, Nelsen C, Pan T, Davidson E, Orser C. Rapid pre-symptomatic detection of PrPSc via conformationally responsive palindromic PrP peptides. *Peptides* 2005;26:2193–2200.
64. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989;274: 1-13.
65. Harris D, Lele P, Snider W. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90(9):4309–4313.
66. Health Protection Agency, National Press Releases
http://www.hpa.org.uk/hpa/news/articles/press_releases/2007/070118_vCJD.htm
67. Herms J, Kretzschmar H, Titz S, Keller B. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 1995;7:2508- 2512.
68. Herms J, Tings T, Dunker S, Kretzschmar H. Prion Protein Affects Ca(2+)-Activated K(+) Currents in Cerebellar Purkinje Cells. *Neurobiol. Dis.* 2001;8: 324-330.
69. Hewitt P, Llewelyn C, Mackenzie J, Will R. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 2006;91:221-30.
70. Hill A, Butterworth R, Joiner S, Jackson G, Rossor M, Thomas D et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999;353:183-189.
71. Hill A, Desbruslais M, Joiner S, Sidle K, Gowland I, Collinge J. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997;389:448-450.

72. Hope J, Morton L, Farquhar C, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin R. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 1986;5(10):2591– 2597.
73. Hornshaw M, McDermott J, Candy J. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;207(2):621– 629.
74. Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* 1921;70:132-146.
75. Jeffrey M, Wells G. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* 1988;25(5):398–399.
76. Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, et al. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 1987;61:3688-3693.
77. Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet. Rec.* 1990;127(17):418–420.
78. Kirschbaum W. Zwei eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems nach Art der spastischen Pseudosklerose (Jakob). *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1924;92:175– 220.
79. Kitamoto T, Tateishi J, Tashima T, Takeshita I, Barry RA, DeArmond SJ, et al. Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* 1986;20:204-208.
80. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991;252(5006):668– 674.
81. Kornblatt JA, Marchal S, Rezaei H, Kornblatt MJ, Balny C, Lange R, et al. The fate of the prion protein in the prion/plasminogen complex. *Biochem and Biophys Res Comm* 2003;305:518–522.

82. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 1997;390:74–77.
83. Kraus M. Plasminogen In: Thomas L. Labor und Diagnose. 6. Auflage. Frankfurt/Main, Deutschland: TH-Books-Verlagsgesellschaft, 2005:877-878.
84. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 1986;122(1):1–5.
85. Laffont-Proust I, Faucheux BA, Hässig R, Sazdovitch V, Simon S, Grassi J, et al. The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. *FEBS Lett.* 2005;579(28):6333-7
86. Lansbury PT Jr, Caughey B. The chemistry of scrapie infection: Implications of the “ice 9” metaphor. *Chem. Biol.* 1995;2(1):1–5.
87. Lasch P, Beekes M, Schmitt J, Naumann D. Detection of preclinical scrapie from serum by infrared spectroscopy and chemometrics. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;387:1791–1800.
88. Lasch P, Schmitt J, Beekes M, Udelhoven T, Eiden M, Fabian H, et al. Antemortem identification of bovine spongiform encephalopathy from serum using infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* 2003;75:6673–6678.
89. Lasmézas CI, Deslys JP, Demalmay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, et al. BSE transmission to macaques. *Nature* 1996;381:743-744.
90. Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, et al. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* 1992;166:333-341.
91. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al. Synthetic mammalian prions. *Science* 2004;305:673–676.
92. Liao YC, Lebo RV, Clawson GA, Smuckler EA. Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 1986;233:364– 367.
93. Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, et al. Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J. Immunol.* 2001;166:3733–3742.

94. Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:2403-2407.
95. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-21.
96. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* 1986;315:997-1003.
97. Magnusson S, Petersen TE, Sottrup-Jensen L. Complete primary structure of prothrombin: Isolation and reactivity of ten carboxylated glutamic residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. In: Reich, E, Rifkin, DB, & Shaw, E, Eds. *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1975:123-4
98. Maissen M, Roeckl C, Glatzel M, Goldmann W, Aguzzi A. Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. *Lancet* 2001;357:2026-2028.
99. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 1994;8:121-127.
100. Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, DeArmond SJ, et al. Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:1630-1638.
101. McGowan JP. Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.* 1922;5:365-375.
102. McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, et al. Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J. Virol.* 1991;65:1340-1351.
103. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330:132-37.
104. Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. Abnormal fibrils from scrapie infected brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1981;54:63-74.

105. Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat. Med.* 2001;7:361–364.
106. Missler U, Wiesmann M, Wittmann G, Magerkurth O, Hagenstrom H, Measurement of glial fibrillary acidic protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin. Chem.* 1999;45:138–141.
107. Morel E, Fouquet S, Chateau D, Yvernault L, Frobert Y, Pincon-Raymond M, et al. The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J. Biol. Chem.* 2004;279:1499–1505.
108. Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardiere C. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J. Gen. Virol.* 2001;82:2017–2024.
109. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, et al. Signal transduction through prion protein. *Science* 2000;289:1925–1928.
110. Moussa A, Coleman AW, Bencsik A, Leclere E, Perret F, Martin A, Perron H. Use of streptomycin for precipitation and detection of proteinase K resistant prion protein (PrP^{sc}) in biological samples. *Chem. Commun. (Camb.)* 2006;9:973–975.
111. Nagase H. Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378: 151-60.
112. Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Purro M, et al. Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J.* 2005;24:2472–2480.
113. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985;40:735-746.
114. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192–197.
115. Otto M, Wiltfang J. Differential diagnosis of neurodegenerative diseases with special emphasis on Creutzfeldt-Jakob disease. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003;21:191–209.

116. Paltrinieri S, Comazzi S, Spagnolo V, Rondena M, Ponti W, Ceciliani F. Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 2004;52:1639–1645.
117. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:10962–10966.
118. Pan T, Chang B, Wong P, Li C, Li R, Kang SC, et al. An aggregation-specific enzyme-linked immunosorbent assay: detection of conformational differences between recombinant PrP protein dimers and PrP(Sc) aggregates. *J. Virol.* 2005;79:12355–12364.
119. Pan T, Sethi J, Nelsen C, Rudolph A, Cervenakova L, Brown P, et al. Detection of misfolded prion protein in blood with conformationally sensitive peptides. *Transfusion* 2007;47:1418–1425.
120. Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou WQ, et al. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat. Med.* 2003;9:893–899.
121. Parveen I, Moorby J, Allison G, Jackman R. The use of non-prion biomarkers for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in the live animal. *Vet. Res.* 2005;36:665–683.
122. Pastrana MA, Sajnani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C et al. Isolation and characterisation of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* 2006;45:15710–15717.
123. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in PRPN codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004;364:527-9.
124. Peretz D, Williamson RA, Matsunaga Y, Serban H, Pinilla C, Bastidas RB, et al. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol.* 1997;273:614-22
125. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem* 1990;265: 6104–11.

126. Praus M, Kettelgerdes G, Baier M, Holzhütter HG, Jungblut PR, Maissen M, et al. Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH(2)-terminal fragment PrP23-110. *Thromb Haemost* 2003;89:812-9.
127. Prusiner SB, Groth D, Serban A, Stahl N, Gabizon R. Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:2793–2797.
128. Prusiner SB. Molecular biology and genetics of prion diseases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1994;343:447–463.
129. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982;216:136–144.
130. Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 1980;208:1036–37.
131. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Berlin, Deutscher Ärzte-Verlag, 2007;15.
132. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–321). *Nature* 1996;382:180–182.
133. Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, et al. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986;140:758–765.
134. Ruth L. The quest for new prion tests. *Anal. Chem.* 2003;75:32A–36A.
135. Saa P, Castilla J, Soto C. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 2006;313:92–94.
136. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001;411:810–813.
137. Safar J, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, et al. Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nature Biotech* 2002;20:1147-1150.

138. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 1998;4:1157–1165.
139. Saito H, Hamilton SM, Tavill AS, Louis L, Ratnoff OD. Production and release of plasminogen by isolated perfused rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 6837–40.
140. Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 1995;245:362–374.
141. Schuster V, Hügler B, Tefs K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost* 2007;5:2315-22.
142. Scientific report of the European Food Safety Authority on the evaluation of seven new rapid post mortem BSE tests, 16 November 2004 at http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620780462.htm
143. Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, et al. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15137-15142.
144. Seitz R, von Auer F, Blümel J, Burger R, Buschmann A, Dietz K, et al. Impact of vCJD on blood supply. *Biologicals* 2007;35:79-97.
145. Shaked Y, Engelstein R, Gabizon R. The binding of prion proteins to serum components is affected by detergent extraction conditions, *J. Neurochem.* 2002;82:1–5.
146. Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:15922–15928.
147. Sigurdsson B. Rida-a chronic encephalitis of sheep-with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.* 1954;110:341–354.
148. Singh N, Gu Y, Bose S, Kalepu S, Mishra RS, Verghese S. Prion peptide 106–126 as a model for prion replication and neurotoxicity. *Front Biosci* 2002;7:60–71

149. Sottrup-Jensen L. The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one „mini“ plasminogen (MW 38000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. *Prog Chem Fibrinolysis Thrombolysis* 1978;3:191–209.
150. Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83:7358–7362.
151. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, et al. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 1993;32:1991-2002.
152. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 1987;51:229–240.
153. Stahl N, Prusiner SB. Prions and prion proteins. *FASEB J.* 1991;5:2799–2807.
154. Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, et al. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science* 2004;305:1283–1286.
155. Tanji K, Saeki K, Matsumoto Y, Takeda M, Hirasawa K, Doi K, et al. Analysis of PrPc mRNA by in situ hybridization in brain, placenta, uterus and testis of rats. *Intervirology* 1995;38:309–315.
156. Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB. Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 1992;3:851-863.
157. Thormar H. Slow infections of the central nervous system II. *Z. Neurol.* 1971;199:151–166.
158. Tyler JW, Lakritz J, Weaver D, Johnson G, VanMetre D, Smith K, et al. The 14-3-3 cerebrospinal fluid immunoassay lacks utility in the diagnosis of clinical scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001;13:537–539.
159. Vana K, Zuber C, Nikles D, Weiss S. Novel Aspects of Prions, Their Receptor Molecules, and Innovative Approaches for TSE Therapy. *Cell and Mol Neurobiology.* 2007;27:107-128
160. Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.* 2003;86:538–344.

161. Völkel D, Zimmermann K, Zerr I, Bodemer M, Lindner T, Turecek PL et al. Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic CJD or other neurologic diseases. *Transfusion* 2001;41: 441–448
162. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 1987;121:419– 420.
163. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921-925.
164. Williams ES, Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 1980;16:89–98.
165. Windl O, Dempster M, Estibeiro P, Lathe R. A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene* 1995;159:181–186.
166. World Intellectual property Organisation, Patentscope at [www. Wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2007123345](http://www.Wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2007123345)
167. Wroe SJ, Pal S, Durrenajak S, Harpreet H, Macfarlane R, Joiner S, et al. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt- Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 2006;368:2061-7.
168. Wyatt JM. Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 1990;126:513-517.
169. Yakovleva O, Janiak A, McKenzie C, McShane L, Brown P, Cervenakova L. Effect of protease treatment on plasma infectivity in variant Creutzfeldt–Jakob disease mice. *Transfusion* 2004;44:1700–1705
170. Zanusso G, Farinazzo A, Prelli F, Fiorini M, Gelati M, Ferrari S, et al. Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. *J Biol Chem.* 2004;279:38936-42
171. Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnes TC, Loskutoff DJ, et al. Plasminogen has a broad extrahepatic distributions. *Thromb Haemost* 2002;87:493–501.

172. Zou WQ, Zheng J, Gray DM, Gambetti P, Chen SG. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:1380–1385.

9 Danksagung

Besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Axel Pruß aussprechen, für die stets zuverlässige und engagierte Betreuung bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit.

Auch bei Herrn Prof. Dr. med. Dr.-Ing. Holger Kieseewetter und Herrn Prof. Dr. med. Abdulgar Salama möchte ich mich sehr herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung und die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Michael Baier aus dem Robert-Koch-Institut für seine kontinuierliche Ansprechbarkeit bei allen aufkommenden Fragen sowie allen Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung in Laborangelegenheiten.

Mein ganz persönlicher Dank gehört meiner Ehefrau, die mich immer wieder ermutigt und angehalten hat, Begonnenes auch zu vollenden.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Erklärung

Ich, Aleksandar Grigorov, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Entwicklung einer Methode zum Nachweis von pathologischen Prionen
mittels Plasminspaltung in humanem Plasma**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum: 02.10.2008

Unterschrift: