

# Untersuchungen zu Assoziationen von Mikrosatelliten und Kandidatengen mit der Scrapieempfänglichkeit beim Schaf

Daniela Katharina Zieleniewicz

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. G. Erhardt

**Untersuchungen zu Assoziationen  
von Mikrosatelliten und Kandidatengen  
mit der Scrapieempfindlichkeit  
beim Schaf**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Daniela Katharina Zieleniewicz**

Tierärztin aus Bad Homburg

Gießen, 2009

#### **Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek - Einheitsaufnahme**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

#### **Titel:**

Untersuchungen zu Assoziationen von Mikrosatelliten und Kandidatengenomen mit der Scrapieempfindlichkeit beim Schaf

#### **Autorin:**

Daniela Katharina Zieleniewicz

ISBN 13: 978-3-86844-183-3

Elektronische Ausgabe: <http://geb.uni-giessen.de/geb>

© **SV**Sierke Verlag, Göttingen  
Am Steinsgraben 19  
37085 Göttingen

[www.sierke-verlag.de](http://www.sierke-verlag.de)

Alle Rechte vorbehalten.

Das Werk - einschließlich seiner Teile - ist urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. G. Erhardt

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 21. Juli 2009



Meiner Mutter



Folgende Publikation ist Teil dieser Dissertation:

Lühken, G., Zieleniewicz, D., Brandt, H. R., Buschmann, A., Groschup, M. H. & Erhardt, G. (2007). Microsatellites *MCMA53* and *MCMA16* on OAR15 are associated with susceptibility to atypical scrapie. *Anim. Genet.* **38**, 88-9.



# Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                            |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                    | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>                                             | <b>3</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Transmissible spongiforme Enzephalopathien.....</b>                     | <b>3</b>  |
| 2.1.1      | Die „protein-only“-Hypothese .....                                         | 3         |
| 2.1.2      | Das zelluläre Prionprotein .....                                           | 4         |
| 2.1.3      | Umwandlung von PrP <sup>C</sup> zu PrP <sup>Sc</sup> .....                 | 5         |
| 2.1.4      | Prionenstämme .....                                                        | 7         |
| 2.1.5      | Übertragung und Speziesbarriere .....                                      | 8         |
| <b>2.2</b> | <b>Scrapie beim Schaf.....</b>                                             | <b>9</b>  |
| 2.2.1      | Verbreitung.....                                                           | 9         |
| 2.2.2      | Klassische Scrapie.....                                                    | 12        |
| 2.2.2.1    | Klinische Symptomatik .....                                                | 12        |
| 2.2.2.2    | Infektionswege .....                                                       | 13        |
| 2.2.2.3    | Pathogenese .....                                                          | 13        |
| 2.2.2.4    | Pathologie.....                                                            | 14        |
| 2.2.2.5    | Nachweis im Western Blot.....                                              | 15        |
| 2.2.3      | Atypische Scrapie.....                                                     | 16        |
| 2.2.3.1    | Klinische Symptomatik / Problematik der Diagnose bei Asymptomatik .....    | 17        |
| 2.2.3.2    | Infektionswege und Pathogenese .....                                       | 18        |
| 2.2.3.3    | Pathologie.....                                                            | 19        |
| 2.2.3.4    | Nachweis im Western Blot.....                                              | 19        |
| <b>2.3</b> | <b>Genetische Grundlagen der Scrapieresistenz beim Schaf.....</b>          | <b>20</b> |
| 2.3.1      | Klassische Scrapie.....                                                    | 20        |
| 2.3.1.1    | Das Prionproteingen .....                                                  | 20        |
| 2.3.1.2    | Allele mit hoher Scrapieempfänglichkeit.....                               | 22        |
| 2.3.1.3    | Allele mit hoher Scrapieresistenz.....                                     | 23        |
| 2.3.1.4    | Sonstige Prionproteinallele .....                                          | 24        |
| 2.3.1.5    | Situation in der deutschen Schafpopulation .....                           | 24        |
| 2.3.2      | Atypische Scrapie.....                                                     | 25        |
| <b>2.4</b> | <b>BSE .....</b>                                                           | <b>26</b> |
| 2.4.1      | Potentielle Bedeutung der Scrapie des Schafes für die BSE des Rindes ..... | 26        |
| 2.4.2      | BSE beim Schaf .....                                                       | 27        |
| 2.4.3      | Einfluss des ovinen PrP-Genotyps auf die BSE-Empfänglichkeit.....          | 28        |
| <b>2.5</b> | <b>Rechtsgrundlagen zur Scrapiebekämpfung beim Schaf.....</b>              | <b>28</b> |
| 2.5.1      | TSE-Überwachungssysteme.....                                               | 29        |
| 2.5.2      | Verfütterungsverbot .....                                                  | 29        |
| 2.5.3      | Spezifizierte Risikomaterialien .....                                      | 29        |
| 2.5.4      | Zuchtprogramme .....                                                       | 29        |
| 2.5.5      | Maßnahmen im Seuchenfall.....                                              | 30        |
| <b>2.6</b> | <b>Einflussnahme anderer Genorte auf die TSE-Resistenz .....</b>           | <b>31</b> |

---

|            |                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.1      | QTL für TSE-Resistenz auf Mauschromosomen 9 und 2 .....      | 32        |
| 2.6.2      | QTL für TSE-Resistenz auf Mauschromosom 7 .....              | 33        |
| 2.6.3      | Mikrosatelliten .....                                        | 34        |
| <b>2.7</b> | <b>Kandidatengene für Scrapieresistenz.....</b>              | <b>35</b> |
| 2.7.1      | Cathepsine B und D.....                                      | 35        |
| 2.7.1.1    | Cathepsin B .....                                            | 35        |
| 2.7.1.2    | Cathepsin D .....                                            | 36        |
| 2.7.2      | Calpain 2 .....                                              | 38        |
| 2.7.3      | Kallikrein 1.....                                            | 40        |
| 2.7.4      | Transforming Growth Factor, $\beta$ 1 .....                  | 41        |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                           | <b>44</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material.....</b>                                         | <b>44</b> |
| 3.1.1      | Probenmaterial .....                                         | 44        |
| 3.1.2      | DNA zur Standardisierung der Fragmentanalyse.....            | 45        |
| 3.1.3      | Geräte und Verbrauchsmaterialien.....                        | 45        |
| 3.1.4      | Chemikalien und Reaktionskits.....                           | 47        |
| 3.1.5      | Größenstandards.....                                         | 48        |
| 3.1.6      | Enzyme.....                                                  | 48        |
| 3.1.7      | Oligonukleotide.....                                         | 49        |
| 3.1.8      | Computerprogramme .....                                      | 49        |
| <b>3.2</b> | <b>Methoden zur Probenverarbeitung .....</b>                 | <b>49</b> |
| 3.2.1      | Isolierung genomischer DNA.....                              | 49        |
| 3.2.2      | Quantifizierung der genomischen DNA.....                     | 49        |
| <b>3.3</b> | <b>Methoden zur Mikrosatellitenanalyse.....</b>              | <b>50</b> |
| 3.3.1      | Amplifikation der Mikrosatelliten durch PCR .....            | 50        |
| 3.3.2      | Agarosegelelektrophorese .....                               | 51        |
| 3.3.3      | Typisierung der Mikrosatelliten mittels Fragmentanalyse..... | 51        |
| 3.3.3.1    | Herstellung des Polyacrylamidgels .....                      | 52        |
| 3.3.3.2    | Durchführung der Gelelektrophorese.....                      | 52        |
| 3.3.3.3    | Standardisierung der Ergebnisse .....                        | 52        |
| 3.3.4      | Statistische Auswertung .....                                | 53        |
| <b>3.4</b> | <b>Methoden zur Kandidatengenanalyse.....</b>                | <b>53</b> |
| 3.4.1      | PCR-Amplifikation spezifischer Genregionen.....              | 53        |
| 3.4.1.1    | Primerauswahl .....                                          | 53        |
| 3.4.1.2    | PCR-Reaktionsansatz .....                                    | 53        |
| 3.4.1.3    | Thermocyclerprotokoll.....                                   | 54        |
| 3.4.2      | Reinigung und Mengenbestimmung von PCR-Produkten.....        | 55        |
| 3.4.2.1    | Aufreinigung der PCR-Produkte.....                           | 55        |
| 3.4.2.2    | Mengenschätzung mittels Agarosegelelektrophorese .....       | 55        |
| 3.4.3      | Sequenzierung .....                                          | 55        |
| 3.4.3.1    | Sequenzierreaktion .....                                     | 55        |
| 3.4.3.2    | Sequenzierung am halbautomatischen Sequenziergerät.....      | 56        |

---

|            |                                                                     |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.4      | Nachweis von Mutationen.....                                        | 56         |
| 3.4.4.1    | PCR-RFLP .....                                                      | 56         |
| 3.4.4.2    | PCR-ACRS.....                                                       | 58         |
| 3.4.4.3    | ASPCR .....                                                         | 59         |
| 3.4.4.4    | Nested PCR mit anschließendem RFLP.....                             | 60         |
| 3.4.5      | Statistische Auswertung .....                                       | 62         |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>                                             | <b>63</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Mikrosatellitenanalyse .....</b>                                 | <b>63</b>  |
| 4.1.1      | Allelfrequenzen in von atypischer Scrapie betroffenen Herden .....  | 63         |
| 4.1.2      | Allelfrequenzen in von klassischer Scrapie betroffenen Herden ..... | 68         |
| <b>4.2</b> | <b>Kandidatengenanalyse .....</b>                                   | <b>72</b>  |
| 4.2.1      | Cathepsin B .....                                                   | 72         |
| 4.2.2      | Cathepsin D .....                                                   | 75         |
| 4.2.3      | Calpain, Large Polypeptide L2.....                                  | 77         |
| 4.2.4      | Kallikrein 1.....                                                   | 81         |
| 4.2.5      | Transforming Growth Factor, $\beta$ 1 .....                         | 84         |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>                                             | <b>87</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>Mikrosatellitenanalyse .....</b>                                 | <b>87</b>  |
| 5.1.1      | Signifikanzen in von atypischer Scrapie betroffenen Herden .....    | 87         |
| 5.1.2      | Signifikanzen in von klassischer Scrapie betroffenen Herden.....    | 89         |
| <b>5.2</b> | <b>Kandidatengenanalyse .....</b>                                   | <b>90</b>  |
| 5.2.1      | Cathepsin B .....                                                   | 91         |
| 5.2.2      | Cathepsin D .....                                                   | 92         |
| 5.2.3      | Calpain, Large Polypeptide L2.....                                  | 99         |
| 5.2.4      | Kallikrein 1.....                                                   | 103        |
| 5.2.5      | Transforming Growth Factor, $\beta$ 1 .....                         | 104        |
| <b>5.3</b> | <b>Ausblick.....</b>                                                | <b>105</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                        | <b>108</b> |
| <b>7</b>   | <b>SUMMARY.....</b>                                                 | <b>111</b> |
| <b>8</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                   | <b>113</b> |

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Modell des murinen Prionoproteins von Aminosäure 1 bis 254 nach Vana et al. (2007). Der flexible N-Terminus enthält eine Region mit mehreren Octarepeats (■). Der globuläre C-Terminus beinhaltet drei  $\alpha$ -Helices (○○○) und zwei  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (□). An den beiden Enden des Proteins befinden sich Signalsequenzen (■), die während der Prozessierung entfernt werden. .... 4
- Abbildung 2: Modell für die Replikation von Prionen nach Collinge & Clarke (2007) (Keimbildungshypothese). Die Vermehrung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  geht vonstatten, indem Monomere des zellulären Prionoproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) an ein bestehendes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregat gebunden werden (a) und dieses die Konformationsänderung der  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Moleküle zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  fördert (b). Teilt sich das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregat (c), steht eine größere Menge an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Polymeren zur Verfügung, um die Umwandlung von weiteren  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Molekülen herbeizuführen (d). ..... 6
- Abbildung 3: Modell für die Replikation von Prionen nach Cohen et al. (1994) (Heterodimerhypothese). Das zelluläre Prionoprotein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) wird durch zufällige strukturelle Veränderungen in die teilweise entfaltete Intermediärform  $\text{PrP}^*$  überführt (a). Diese kann sich zurück zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  falten (a), abgebaut werden oder zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  umgewandelt werden. Normalerweise werden keine signifikanten Mengen von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gebildet. Im Falle einer Infektion jedoch stimuliert exogenes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  die Umwandlung von  $\text{PrP}^*$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (c), indem es mit diesem einen Komplex bildet (b). Das entstandene  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  stimuliert wiederum die weitere Bildung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (d). .... 7
- Abbildung 4: Infektionsweg der Scrapie nach Aguzzi & Sigurdarson (2004). Nach oraler Aufnahme dringt das infektiöse Agens über die Gaumenmandel (1) in die medialen Retropharyngeallymphknoten (2) sowie über die Peyer'schen Plaques des caudalen Jejunums und Ileums in die Mesenteriallymphknoten (3) ein. Über efferente Nervenstränge gelangen die Prionen zum einen über den *Nervus vagus* (4) in das Gehirn (6) zum anderen über den *Nervus splanchnicus* (5) in die graue Substanz des thorakalen Rückenmarks. .... 14
- Abbildung 5: Charakteristisches Bandenmuster von atypischen (Nor98) und klassischen (Class.) Scrapiefällen im TeSeE<sup>TM</sup> Western Blot mit Negativkontrolle (Neg) und Größenmarker (MM). Pfeil weist auf die nur bei atypischen Scrapieisolaten vorkommende Bande von unter 15 kDa hin. Abbildung von Dr. Sylvie Benestad, National Veterinary Institute, Norwegen, aus „Opinion of the scientific panel on biological hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in small ruminants“ (EFSA, 2005). .... 16
- Abbildung 6: Für die Scrapieresistenz bedeutsame Basenaustausche (fettgedruckt) in Codons 136, 154 und 171 im ovinen *Prionoproteingen* und daraus resultierende Aminosäureaustausche an den entsprechenden Positionen im ovinen Prionoprotein nach Hunter (2007) und Erhardt (2005). P Promotorregion, ■■■ 3'- bzw. 5'-UTR, □ Leseraster (ORF), A Alanin, V Valin, R Arginin, H Histidin, Q Glutamin ..... 21
- Abbildung 7: Schätzung der Anzahl der in Großbritannien gemeldeten Scrapiefälle pro Jahr pro eine Millionen Schafe eines jeden Genotyps (GSJM) in Großbritannien. Daten von Baylis & Goldmann (2004): Den Daten liegen die Genotypen von ca. 14 000 britischen Schafen und die Genotypen von allen bis zum Zeitpunkt der Entstehung der Publikation von Baylis und Goldmann (2004) gemeldeten Scrapiefällen zugrunde. Aus dieser Schätzung kann ein Eindruck über die relative Scrapieempfindlichkeit eines jeden Genotyps gewonnen werden (Baylis & Goldmann, 2004). .... 23

- Abbildung 8: Primer für die ACRS-PCR des Gens *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  sowie im PCR-Produkt resultierende Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BseGI*. ..... 58
- Abbildung 9: Funktionsprinzip der allelspezifischen PCR (ASPCR). Bei Basenfehlpaarung am 3'-Ende erfolgt keine Amplifikation des PCR-Produkts, sondern nur bei Komplementarität an dieser Position. Die zusätzliche Fehlpaarung an drittletzter Stelle des Primers erhöht die Spezifität der Bindung. .... 60
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der nested PCR nach Müller (2001). In der ersten PCR-Reaktion (a) liegen die Primer ( $\Rightarrow$ ) außerhalb des letztendlich gewünschten PCR-Fragments ( $\blacksquare$ ). Aus genomischer DNA ( $\blacksquare$ ) wird ein Produkt ( $\square$ ) amplifiziert, das als Matrize in die zweite PCR-Reaktion (b) eingesetzt wird. Spezifische interne Oligonukleotide ( $\Rightarrow$ ) vervielfältigen nun das gewünschte Amplifikat (c). .... 61
- Abbildung 11: Allelfrequenzen des Markers *MCMA53* der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 101, 109 und 113 ..... 64
- Abbildung 12: Allelfrequenzen des Markers *MCMA16* der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 192, 206 und 212 ..... 64
- Abbildung 13: Allelfrequenzen des Markers *MCMA159* der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 142, 146, 150 und 154 ..... 68
- Abbildung 14: Partielle Sequenz des ovinen *Cathepsin B*, beginnend im Exon 9, endend im Exon 10, mit Nukleotidsubstitution an Position 391 im neunten Intron. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt. .... 72
- Abbildung 15: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des neunten Introns des ovinen *Cathepsin B*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten Fragmente in der Größe von 320 bp und 264 bp, Tiere des Genotyps TT wiesen stattdessen ein 584 bp großes Fragment auf. Heterozygote Tiere (CT) zeigten alle drei Fragmente im Gelbild. Ein Kontrollschnitt gewährleistete die Funktionsfähigkeit des Systems, indem die Größe des Amplifikates von 665 bp auf 584 bp reduziert wurde. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, unv. = unverdautes PCR-Produkt..... 73
- Abbildung 16: Partielle Sequenz des ovinen *Cathepsin D*, beginnend im Exon 7, endend im Exon 9, mit Nukleotidsubstitutionen an Position 12 des neunten Exons, Position 49 des siebten Introns sowie Position 20 und 44 des Intron 8. Weiterhin dargestellt sind eine Deletion (.....), die die 17. bis 23. Base des Intron 8 betrifft, und ein bei Vorliegen des C-Allels durch das Programm ESEfinder identifizierter Exon Splicing Enhancer (ESE) ( $\blacktriangleleft\blacktriangleright$ ). Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt..... 75
- Abbildung 17: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten ein 138 bp großes Fragment, der Genotyp TT wies ein 116 bp großes Fragment auf. Heterozygote Tiere (CT) zeigten beide Fragmente im Gelbild. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23..... 76
- Abbildung 18: Partielle Sequenz des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* (Oar) im Alignent mit einem Teil der humanen Gensequenz (Hsa) (Hata et al., 1989, GenBank Nr.: J04700) beginnend im Promotor endend im Exon 1. Das Startcodon ist kursiv und unterstrichen dargestellt. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben geschrieben. An der 191. Position vor Beginn des ersten Exons wurde

- eine Nukleotidsubstitution detektiert. Bei Vorliegen des G-Allels wurde an dieser Position eine potentielle Bindungsstelle für das Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (◄==►) detektiert. CDS = kodierende Sequenz..... 78
- Abbildung 19: Allelspezifische PCR zur Differenzierung der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons in der Promotorregion des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2*. Das G-Allel mit einer Größe von 504 bp (a) und das T-Allel mit einer Größe von 439 bp (b) wurden in zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen nachgewiesen. Kleinere Kontrollfragmente (305 bp und 240 bp) schlossen falsch-negative Resultate aus: Lag das getestete Allel also nicht vor, war nur das Kontrollfragment auf dem Gelbild zu sehen (-). Durch Kombination der Ergebnisse beider PCR-Amplifikationen konnte der Genotyp der Tiere bestimmt werden (c). M = FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, ready-to-use ..... 79
- Abbildung 20: Restriktionsverdau zur Absicherung der Ergebnisse im Bezug auf den Nachweis der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2*. Tiere mit dem Genotyp GG wiesen ein 145 bp großes Fragment im Gelbild auf. TT-homozygote Tiere zeigten eine Bande in der Größe von 111 bp im Gelbild. Bei heterozygoten Tieren (GT) waren Fragmente beider Größen zu sehen. Ein Kontrollschnitt produzierte eine 79 bp große Bande im Gelbild. Die Negativkontrolle (Neg.) war wegen der hohen Sensitivität der nested PCR obligatorisch. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23 ..... 80
- Abbildung 21: Partielle Sequenz des ovinen *Kallikrein 1*, beginnend im Exon 3, endend im Exon 5, mit Nukleotidsubstitution an Position 392 des vierten Introns. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt. .... 82
- Abbildung 22: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen *Kallikrein 1*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten ein 307 bp großes Fragment, Tiere mit dem Genotyp TT wiesen ein 371 bp großes Fragment im Gelbild auf. Bei heterozygoten Tieren (CT) waren beide Fragmente zu sehen. Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Systems wurde ein 153 bp großes Kontrollfragment produziert. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, unv. = unverdautes PCR-Produkt ..... 83
- Abbildung 23: Partielle Sequenz des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$* , beginnend im Intron 6, endend im Exon 7, mit identifizierter Nukleotidsubstitution an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt. .... 84
- Abbildung 24: ACRS zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des Exon 7 im sechsten Intron des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$* . Der Genotyp TT stellte sich als 154 bp große Bande im Gelbild dar. Tiere, die den Genotyp GG trugen, zeigten ein 129 bp großes Fragment. Heterozygote Tiere (GT) wiesen beide Banden im Gelbild auf. Zur besseren Darstellung wurde stets ein unverdautes PCR-Produkt (unv.) zusätzlich mit auf das Gel geladen. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23..... 85

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Anzahl der im Jahr 2006 in den EU-Mitgliedsstaaten* detektierten scrapiepositiven Schafe (Jahresbericht 2006 der Europäischen Kommission, 2007) sowie die Schafpopulationen der einzelnen Staaten (FAOSTAT, 01/2008) geordnet nach der sich daraus für 2006 ergebenden Inzidenz. ....                                                                                                                                                            | 11 |
| Tabelle 2: Wesentliche Charakteristika der atypischen Scrapie im Vergleich mit Eigenschaften der klassischen Scrapie. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 17 |
| Tabelle 3: QTL-Analysen für TSE-Empfänglichkeit bei der Maus. Der jeweiligen Studie sind das zur Inokulation verwendete TSE-Isolat und die chromosomale Lokalisation der detektierten QTL zugeordnet. Weiterhin werden beschriebene Geschlechtseffekte (♂/♀-Effekt) aufgeführt. ....                                                                                                                                                                        | 32 |
| Tabelle 4: Überblick über einige Expressionsstudien, die die Genexpression in Gehirnen von scrapieinfizierten Mäusen untersuchten. Die Anzahl (n) der detektierten Gene, die sich deutlich in ihrer Expression zwischen scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren oder zwischen den mit unterschiedlichen Scrapieisolaten infizierten Tieren unterschieden, ist wie auch die zur Infektion der Versuchstiere verwendeten Scrapieisolate aufgeführt. .... | 33 |
| Tabelle 5: Anzahl (n) der von klassischer und atypischer Scrapie betroffenen Herden sowie der scrapiepositiven Tiere (Fall) und Kontrolltiere (Kontroll) mit Rassenzuordnung. ....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 45 |
| Tabelle 6: Primersequenzen der Mikrosatelliten, deren chromosomale Lokalisation im Schafgenom (Oar) sowie die zur Markierung der Primer verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. ....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 50 |
| Tabelle 7: Primersequenzen der Kandidatengene und Genbankressourcen (Bta = <i>Bos taurus</i> , Oar = <i>Ovis aries</i> ), auf denen sie basieren. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 54 |
| Tabelle 8: Für die Amplifikation der einzelnen Gene verwendete Annealingtemperaturen und Elongationszeiten. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 54 |
| Tabelle 9: Zur Sequenzierung der einzelnen Gene eingesetzte Sequenzierprimer und verwendete Annealingtemperaturen (Annealingt.) ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 56 |
| Tabelle 10: Primer für die PCR-RFLP-Analyse der Gene <i>Cathepsin D</i> und <i>Kallikrein 1</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 57 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung der Verdauansätze zur RFLP-Analyse der Gene <i>Cathepsin B</i> , <i>Cathepsin D</i> und <i>Kallikrein 1</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 57 |
| Tabelle 12: Primer für die allelspezifische PCR (ASPCR) zur Amplifikation von Allelen des Wildtyps (-G) bzw. mit Mutation (-T) des Gens <i>Calpain, Large Polypeptide L2 (CAPN2)</i> inklusive zusätzlichem Vorwärtsprimer zur Amplifikation des Kontrollfragmentes (-Kontrollfr.). ....                                                                                                                                                                    | 59 |
| Tabelle 13: Innenliegende Primer für die Amplifikation von <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i> in einer nested PCR. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 62 |
| Tabelle 14: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont) sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl. ....                                                                                                                                                                                                                                                              | 66 |
| Tabelle 15: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall <sup>ML</sup> ) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont <sup>ML</sup> ) aus Merinolandschafherden sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl. ....                                                                                                                                                                                                      | 67 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 16: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont) sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse.<br>n = Tierzahl.....                                                                                            | 70 |
| Tabelle 17: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall <sup>KS</sup> ) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont <sup>KS</sup> ) aus der Herde KS sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl .....                                               | 71 |
| Tabelle 18: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des Intron 9 des ovinen <i>Cathepsin B</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl.....                                                                    | 73 |
| Tabelle 19: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des Intron 9 des ovinen <i>Cathepsin B</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.....                                                                                    | 74 |
| Tabelle 20: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen <i>Cathepsin D</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl.....                                                                | 77 |
| Tabelle 21: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen <i>Cathepsin D</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. ....                                                                               | 77 |
| Tabelle 22: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl .              | 81 |
| Tabelle 23: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.....                           | 81 |
| Tabelle 24: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen <i>Kallikrein 1</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl.....                                                            | 83 |
| Tabelle 25: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen <i>Kallikrein 1</i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. ....                                                                           | 84 |
| Tabelle 26: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6 des ovinen <i>Transforming Growth Factor, <math>\beta 1</math></i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl ..... | 86 |
| Tabelle 27: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6 des ovinen <i>Transforming Growth Factor, <math>\beta 1</math></i> der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. ....                 | 86 |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |                                                                        |
|--------------|------------------------------------------------------------------------|
| A            | Alanin                                                                 |
| ACRS         | Amplification Created Restriction Site                                 |
| AS           | Aminosäure                                                             |
| ASPCR        | Allelspezifische Polymerasekettenreaktion                              |
| bp           | Basenpaare                                                             |
| BSE          | Bovine Spongiforme Enzephalopathie                                     |
| <i>BseGI</i> | Restriktionsenzym <i>BseGI</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> G) |
| <i>BseYI</i> | Restriktionsenzym <i>BseYI</i> ( <i>Bacillus species</i> 2521)         |
| <i>BsmFI</i> | Restriktionsenzym <i>BsmFI</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> F) |
| bzw.         | beziehungsweise                                                        |
| ca.          | circa                                                                  |
| CJD          | Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung                                           |
| cM           | centi Morgan                                                           |
| CWD          | Chronic Wasting Disease                                                |
| DNA          | Desoxyribonucleinsäure                                                 |
| dNTP         | Desoxy-Nucleosidtriphosphat                                            |
| ELISA        | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                                      |
| ER           | Endoplasmatisches Retikulum                                            |
| et al.       | <i>et alii</i>                                                         |
| EU           | Europäische Union                                                      |
| fCJD         | familiäre Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung                        |
| GPI          | Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol                                         |
| H            | Histidin                                                               |
| h            | Stunde                                                                 |
| HWG          | Hardy-Weinberg-Gleichgewicht                                           |
| iCJD         | iatrogene Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung                        |
| i.d.R.       | in der Regel                                                           |
| JLU          | Justus-Liebig-Universität                                              |
| K            | Lysin                                                                  |
| kDa          | kilo Dalton                                                            |
| K-EDTA       | Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure                                    |
| kg           | Kilogramm                                                              |
| <i>LweI</i>  | Restriktionsenzym <i>LweI</i> ( <i>Listeria welshimeri</i> )           |
| min          | Minute                                                                 |
| ml           | Mililiter                                                              |
| mM           | millimolar                                                             |
| mRNA         | messenger Ribonucleinsäure                                             |
| <i>MvaI</i>  | Restriktionsenzym <i>MvaI</i> ( <i>Micrococcus varians</i> RFL19)      |
| n            | Anzahl                                                                 |
| <i>N.</i>    | <i>Nervus</i>                                                          |

|                   |                                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| ng                | Nanogramm                                         |
| NSP               | National Scrapie Plan                             |
| OH                | Oberer Hardthof                                   |
| p. a.             | zur Analyse                                       |
| PCR               | Polymerasekettenreaktion                          |
| pmol              | Picomol                                           |
| <i>PRNP</i>       | <i>Prionproteingen</i>                            |
| PrP               | Prionprotein                                      |
| PrP <sup>C</sup>  | zelluläres Prionprotein                           |
| PrP <sup>Sc</sup> | pathologische Isoform des Prionproteins           |
| Q                 | Glutamin                                          |
| <i>QTL</i>        | <i>Quantitative Trait Locus</i>                   |
| R                 | Arginin                                           |
| RFLP              | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus          |
| rpm               | Umdrehungen pro Minute                            |
| s                 | Sekunde                                           |
| SAF               | Scrapie assoziierte Fibrillen                     |
| sCJD              | sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung |
| T                 | Threonin                                          |
| <i>Taq</i>        | <i>Thermus aquaticus</i>                          |
| TME               | Transmissible Mink Enzephalopathie                |
| TSE               | Transmissible Spongiforme Enzephalopathie         |
| U                 | Unit                                              |
| UTR               | untranslated region                               |
| V                 | Valin                                             |
| vCJD              | neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung    |
| ZNS               | Zentrales Nervensystem                            |
| °C                | Grad Celsius                                      |
| µl                | Microliter                                        |
| µM                | micromolar                                        |
| %                 | Prozent                                           |

# 1 Einleitung

Die Scrapie des Schafes gehört wie auch die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) des Rindes und die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) des Menschen zur Gruppe der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) (Chesebro, 2003). Da der Zusammenhang zwischen der *new variant* CJD (vCJD) des Menschen und der BSE des Rindes als gesichert gilt (Bruce et al., 1997, Hill et al., 1997) und die Scrapie des Schafes als Ursache der BSE-Epidemie nicht ausgeschlossen werden kann (European Commission, 2001), ist die Scrapieüberwachung und -bekämpfung nicht nur aus Gründen der Tiergesundheit, sondern vor allem aus Gründen des Verbraucherschutzes indiziert (Verordnung (EG) 999/2001). In diesem Zusammenhang ist die Zucht auf Scrapieresistenz beim Schaf von großer Bedeutung (Verordnung (EG) 999/2001).

Das *Prionproteingen* (PRNP) ist beim Schaf mit der Empfänglichkeit für Scrapie assoziiert (Goldmann et al., 1994, Belt et al., 1995). Schafe mit den Aminosäuren Alanin (A), Arginin (R) und Arginin (R) an Position 136, 154 und 171 des ovinen Prionproteins weisen eine erhöhte Scrapieresistenz auf (Baylis & Goldmann, 2004). In homozygoter Form galten die Träger dieser Proteinvariante lange Zeit als resistent. Ende der neunziger Jahre wurde jedoch in Norwegen eine neue, atypische Form der Scrapie beschrieben (Benestad et al., 2003), an der auch Tiere mit dem Genotyp ARR/ARR erkrankten (Buschmann et al., 2004b). Mittlerweile wird europaweit über das Auftreten von atypischen Scrapiefällen beim Schaf berichtet (De Bosschere et al., 2004, Gavier-Widen et al., 2004, Onnasch et al., 2004, Orge et al., 2004, Everest et al., 2006, Arsac et al., 2007, Vidal et al., 2007). Aber auch drei Fälle von klassischer Scrapie bei ARR-homozygoten Tieren sind inzwischen bekannt geworden (Ikeda et al., 1995, Groschup et al., 2007). Somit ist der Erfolg der Scrapieeradikation durch Selektion auf den ARR-Haplotyp in Frage gestellt und es muss nach weiteren genetischen Faktoren gesucht werden, die die Scrapieempfindlichkeit beim Schaf beeinflussen.

In zahlreichen Studien wurden *Quantitative Trait Loci* (QTL) für TSE-Resistenz am Mausmodell identifiziert, darunter auf den Chromosomen zwei, sieben und neun (Stephenson et al., 2000, Lloyd et al., 2002, Moreno et al., 2003). Diese murinen Chromosomen weisen homologe Bereiche zu den ovinen Chromosomen 14 und 15 auf (OXGRID, 11/2008).

Des Weiteren befinden sich in den beschriebenen QTL Gene, die in einen funktionellen Zusammenhang mit TSE gebracht wurden, wie z. B. *Cathepsin D*, *Kallikrein 1* und *Transforming Growth Factor,  $\beta$ 1* auf Mausechromosom sieben (Moreno et al., 2003). Weiterhin sind *Calpain*, *Large Polypeptide L2* und *Cathepsin B*, deren Produkte *in vitro* auf

die Akkumulation von pathogenem Prionprotein (PrP<sup>Sc</sup>) in der Zelle einwirken (Luhr et al., 2004a, Luhr et al., 2004b, Yadavalli et al., 2004), funktionelle Kandidatengene für die Scrapieempfindlichkeit beim Schaf.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zur Identifikation weiterer Genorte, die für die Scrapieempfindlichkeit beim Schaf von Bedeutung sind, beigetragen werden, damit die züchterische Selektion auf Scrapieresistenz in Zukunft sowohl im Hinblick auf klassische als auch auf atypische Scrapie noch effektiver und erfolgreicher vonstatten gehen kann. Ziel ist es, die Allele von auf OAR 14 und 15 gelegenen Mikrosatelliten auf mögliche Assoziationen mit der Empfindlichkeit von Schafen für atypische und / oder klassische Scrapie zu überprüfen. Weiterhin sollen Polymorphismen in den funktionellen und / oder positionellen Kandidatengen *Cathepsin B*, *Cathepsin D*, *Calpain*, *Large Polypeptide L2*, *Kallikrein 1* und *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  identifiziert und auf eine Assoziation mit Scrapieempfindlichkeit beim Schaf untersucht werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Transmissible spongiforme Enzephalopathien*

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind neurodegenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) mit letalem Ausgang. Sie werden durch Akkumulation eines posttranslational modifizierten zellulären Proteins bedingt und weisen lange, Monate bis Jahre andauernde Inkubationszeiten auf. Histologisch sind sie durch schwammartige (spongiforme) Veränderungen im Gehirn gekennzeichnet (Prusiner, 1998, zusammengefasst durch Chesebro, 2003).

TSE kommen bei verschiedenen Tierarten sowie beim Menschen vor: Die älteste TSE ist die Scrapie des Schafes. Obwohl in vielen Veröffentlichungen (Hörnlmann, 2001, Ebringer et al., 2004) das Jahr 1732 als Erstbeschreibung genannt wird, ist die Scrapie beim Schaf nachweislich erst seit 1750 bekannt (Schneider et al., 2007). Bei der Ziege wurde die Scrapie erst 1942 beschrieben (Lantier et al., 1996). Weiterhin sind beispielhaft Chronic Wasting Disease der Wildwiederkäuer und die Transmissible Mink Enzephalopathie der Nerze zu nennen (Chesebro, 2003).

Die bedeutendste TSE des Menschen ist die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD). Sie kann entweder sporadisch auftreten (sCJD), durch Infektion iatrogen erworben (iCJD) oder familiär durch autosomal-dominante Mutation im zellulären *Prionproteingen* (fCJD) bedingt sein (Wadsworth & Collinge, 2007).

In den 80er Jahren erkrankten in England Rinder an einer neuartigen TSE, der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE). Diese erregte öffentliche Besorgnis, als Mitte der 90er Jahre eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) auftrat, die ursächlich auf denselben Prionproteinstamm zurückzuführen war wie die BSE des Rindes (Hilton, 2006).

#### 2.1.1 Die „protein-only“-Hypothese

Obwohl noch andere Entstehungsmechanismen, wie zum Beispiel Virionen, als Auslöser der TSE diskutiert werden, hat sich die von Prusiner postulierte „protein-only“-Hypothese (Prusiner et al., 1990, Prusiner, 1991b) als derzeitige Lehrmeinung durchgesetzt (Weissmann, 2004):

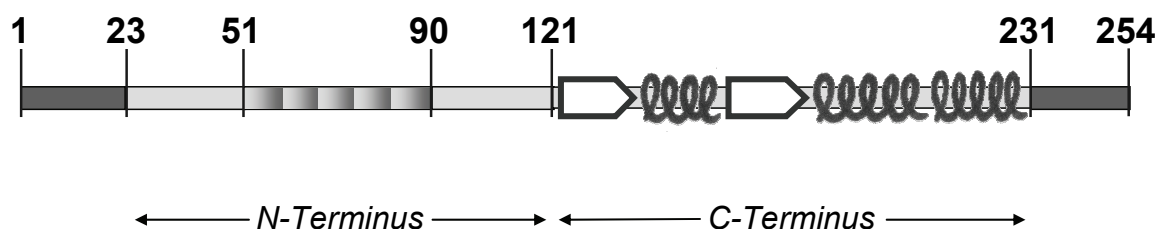
Hier wird als ursächliches Agens ein infektiöses Protein, das so genannte Prion (Akronym von „proteinaceous infectious particle“) angesehen (Prusiner, 1982). Dieses pathogene Prionprotein, im Hinblick auf Scrapie als PrP<sup>Sc</sup> bezeichnet, gleicht in seiner Aminosäurezusammensetzung einem körpereigenen Protein, dem zellulären Prionprotein

(PrP<sup>C</sup>) (Chesebro et al., 1985, Oesch et al., 1985). Wesentliche Unterschiede sind jedoch in der Konformation der beiden Proteine zu finden: Während das PrP<sup>C</sup> zum größten Teil in  $\alpha$ -Helices vorliegt, weist das PrP<sup>Sc</sup> einen geringeren Anteil an  $\alpha$ -Helices und vorwiegend  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf (Pan et al., 1993). Im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> ist PrP<sup>Sc</sup> in nichtdenaturierenden Detergenzien unlöslich und weist eine wesentlich höhere Proteaseresistenz auf (Prusiner, 1982, Oesch et al., 1985).

### 2.1.2 Das zelluläre Prionprotein

PrP<sup>C</sup> ist bei zahlreichen Wirbeltierarten, unter anderem bei Vögeln und Fischen nachgewiesen worden (Schätzl et al., 1995, Gibbs & Bolis, 1997, Wopfner et al., 1999) und weist innerhalb der Säugetierspezies einen hohen Konservierungsgrad auf (Wopfner et al., 1999). In Gehirnen von adulten Tieren wird es konstitutiv exprimiert. Eine hohe Expression ist in Neuronen, aber unter anderem auch in Astrozyten, Endothelzellen, Perizyten und Mikroglia zu finden (Chesebro et al., 1985, Brown et al., 1990). Auch außerhalb des Gehirns können nennenswerte Gehalte von PrP<sup>C</sup> in verschiedenen Organsystemen, wie Herz- und Skelettmuskulatur (Oesch et al., 1985, Brown et al., 1990, Brown et al., 1998), Lunge (Oesch et al., 1985, Brown et al., 1990) und Darm (Morel et al., 2004) sowie in Zellen des Immunsystems (Paltrinieri et al., 2004) nachgewiesen werden.

Das zelluläre Prionprotein besteht aus einer flexiblen unstrukturierten N-terminalen Region (Donne et al., 1997) und einer geordneten globulären Region am C-Terminus, welche drei  $\alpha$ -Helices und zwei antiparallel ausgerichtete  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen beinhaltet (Riek et al., 1996) (Abbildung 1). An beiden Enden befinden sich Signalsequenzen, die während der Prozessierung des Proteins entfernt werden (Vana et al., 2007).



**Abbildung 1: Modell des murinen Prionproteins von Aminosäure 1 bis 254 nach Vana et al. (2007). Der flexible N-Terminus enthält eine Region mit mehreren Octarepeats (■). Der globuläre C-Terminus beinhaltet drei  $\alpha$ -Helices (〰) und zwei  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (▢). An den beiden Enden des Proteins befinden sich Signalsequenzen (■), die während der Prozessierung entfernt werden.**

PrP<sup>C</sup> wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und passiert auf seinem Weg an die Zelloberfläche den Golgi-Apparat. Während seiner Prozessierung werden im rER N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharidketten an zwei Bindungsstellen des N-Terminus angefügt. Die Glykosylierung ist variabel, was je nach der Anzahl der besetzten Bindungsstellen in un-, mono- und diglykosylierten Glykoformen resultiert. Zusätzlich zur N-Glykosylierung wird eine einzelne Disulphidbrücke zwischen zwei Cysteinen am C-Terminus gebildet. Schließlich wird nach Abspaltung der C-terminalen Signalsequenz ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker angehängt. Die angefügten Oligosaccharide werden im Golgi-Apparat modifiziert und anschließend wird PrP<sup>C</sup> an die Zelloberfläche transportiert, wo es mit Hilfe des GPI-Ankers arretiert wird (Harris, 1999, Lawson et al., 2005). Von der Zelloberfläche aus wird PrP<sup>C</sup> kontinuierlich zu endozytischen Kompartimenten und wieder zurück auf die Zelloberfläche prozessiert. Dabei bleiben über 95% des internalisierten PrP<sup>C</sup> intakt, der Rest wird am N-Terminus geschnitten (Shyng et al., 1993).

Kodiert wird das PrP<sup>C</sup> vom *Prionproteingen* (*PRNP*), das beim Menschen auf Chromosom 20 (Liao et al., 1986, Sparkes et al., 1986), bei der Maus auf Chromosom 2 (Sparkes et al., 1986) und bei Rind, Ziege (Iannuzzi et al., 1998) und Schaf (Iannuzzi et al., 1998, Lühken et al., 2006) auf Chromosom 13 liegt. Das murine PrP<sup>C</sup> wird als Vorläuferprotein von 254 Aminosäuren synthetisiert (Prusiner, 1991a). Beim Mensch besteht es aus 253 (Kretzschmar et al., 1986) und beim Schaf aus 256 Aminosäuren (Tranulis, 2002).

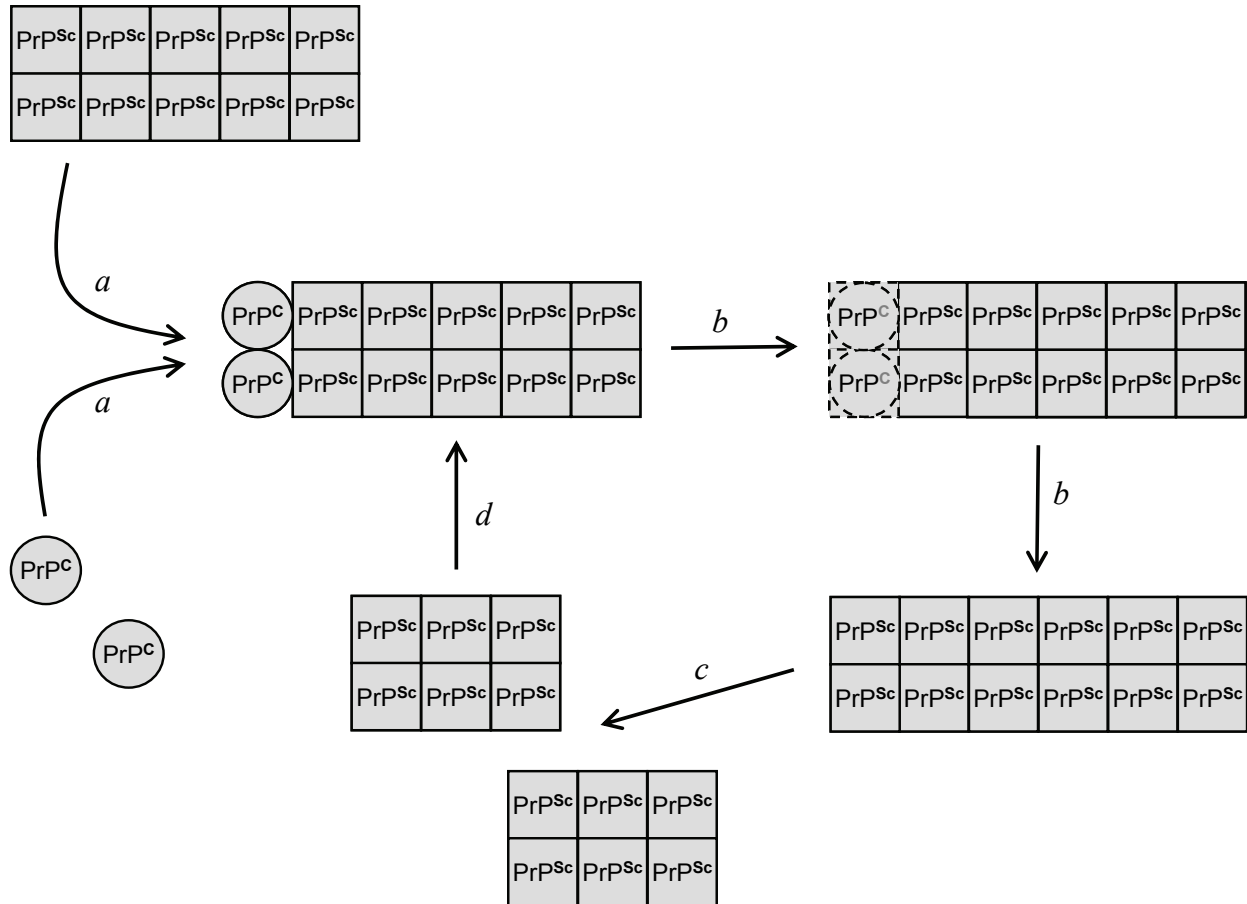
PrP-Knock-out-Mäuse, bei denen das *PRNP* ausgeschaltet war, erwiesen sich als resistent gegen Scrapie: Bei ihnen wurden nach intracerebraler Infektion mit einem mausadaptierten Prionenisolat weder scrapiespezifische pathologische Veränderungen noch eine nennenswerte Vermehrung von PrP<sup>Sc</sup> festgestellt, was den Rückschluss zulässt, dass PrP<sup>C</sup> für die Pathogenese von Prionenerkrankungen essentiell ist (Büeler et al., 1993).

### **2.1.3 Umwandlung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>**

Die Bildung von PrP<sup>Sc</sup> aus PrP<sup>C</sup> ist ein posttranslationaler Prozess (Borchelt et al., 1990). Im Hinblick auf den genauen Verlauf existieren zwei unterschiedliche Hypothesen:

Das eine Model propagiert die Abhängigkeit der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung von einem keimabhängigen Polymerisationsprozess (Keimbildungshypothese): Es wird davon ausgegangen, dass die Konformation von PrP<sup>Sc</sup> eine geringere Stabilität als die des PrP<sup>C</sup> aufweist. Die Konversion von PrP<sup>C</sup> nach PrP<sup>Sc</sup> ist reversibel und wird erst durch ein sich anlagerndes PrP<sup>Sc</sup>-Aggregat stabilisiert. Die Bildung des initialen Keims eines solchen PrP<sup>Sc</sup>-Aggregates erfordert eine Mindestmenge an infektiösem PrP<sup>Sc</sup>, so dass bei Unterschreitung dieses Grenzwertes der kettenreaktionsartige Umwandlungsprozess nicht in Gang kommt. Sobald eine ausreichende

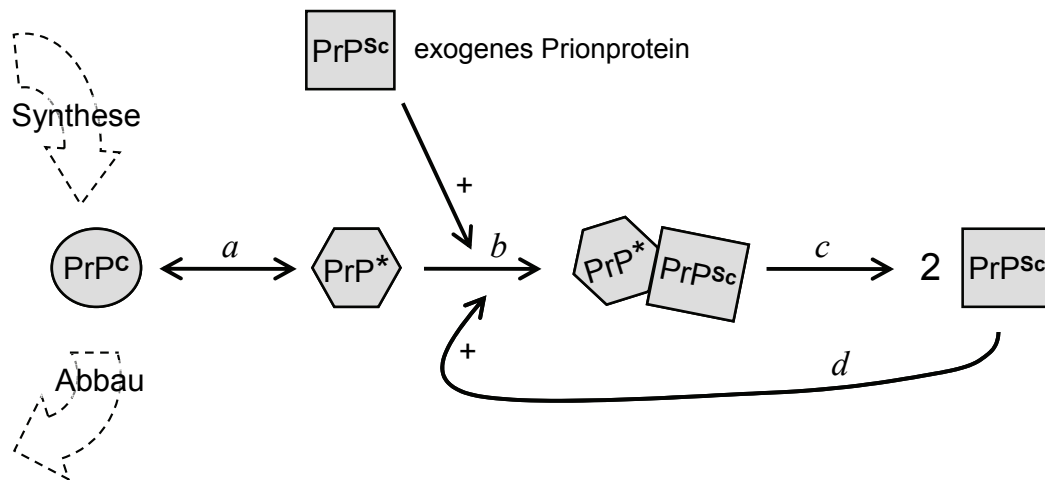
Menge an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  vorhanden ist, lagert sich dieses zusammen und der entstandene Keim fördert die Umwandlung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , indem er an das neu gebildete  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  bindet und dessen Konformation stabilisiert (Abbildung 2) (Caughey et al., 1995, Chakraborty et al., 2005).



**Abbildung 2: Modell für die Replikation von Prionen nach Collinge & Clarke (2007) (Keimbildungshypothese).** Die Vermehrung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  geht vonstatten, indem Monomere des zellulären Prionoproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) an ein bestehendes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregat gebunden werden (a) und dieses die Konformationsänderung der  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Moleküle zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  fördert (b). Teilt sich das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Aggregat (c), steht eine größere Menge an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Polymeren zur Verfügung, um die Umwandlung von weiteren  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Molekülen herbeizuführen (d).

Die andere Hypothese (Heterodimerhypothese) nimmt eine höhere Stabilität des  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gegenüber dem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  an, geht aber dafür nicht von einer selbstständigen Konformationsänderung des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zur pathogenen Isoform hin aus (Prusiner et al., 1990, Prusiner, 1991b). Hier existiert ein durch zufällige Strukturänderungen aus  $\text{PrP}^{\text{C}}$  entstandenes, teilweise entfaltetes Monomer ( $\text{PrP}^*$ ), das ein Zwischenprodukt in der Genese von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  darstellt.  $\text{PrP}^*$  kann entweder wieder zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zurück umgewandelt, abgebaut oder aber zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  umgeformt werden. Normalerweise werden auf diese Weise keine signifikanten Mengen von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gebildet. Im Falle einer infektiösen Prionenerkrankung aber stimuliert exogenes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  die Umwandlung von  $\text{PrP}^*$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , indem es mit  $\text{PrP}^*$  einen Komplex bildet und ihm

als Matrize dient. Die  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Bildung ist nicht reversibel und die entstandenen  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Moleküle regen wiederum die Generierung neuer  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Moleküle an (Cohen et al., 1994) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Modell für die Replikation von Prionen nach Cohen et al. (1994) (Heterodimerhypothese).** Das zelluläre Prionprotein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) wird durch zufällige strukturelle Veränderungen in die teilweise entfaltete Intermediärform  $\text{PrP}^*$  überführt (a). Diese kann sich zurück zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  falten (a), abgebaut werden oder zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  umgewandelt werden. Normalerweise werden keine signifikanten Mengen von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gebildet. Im Falle einer Infektion jedoch stimuliert exogenes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  die Umwandlung von  $\text{PrP}^*$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (c), indem es mit diesem einen Komplex bildet (b). Das entstandene  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  stimuliert wiederum die weitere Bildung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (d).

### 2.1.4 Prionenstämme

Als Auslöser von TSE fungieren unterschiedliche Stämme von Prionproteinen, die durch die physikochemischen Eigenschaften des  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  voneinander unterschieden werden können (Bessen & Marsh, 1992, Collinge et al., 1996). Allein im Hinblick auf die Scrapie existiert eine Vielzahl von Prionenstämmen, die sich in genetisch definierten Inzuchtlinien von Mäusen durch festgelegte Inkubationszeiten und bestimmte neuropathologische Verteilungsmuster auszeichnen (Bruce, 1993). Ein aus einem an Scrapie erkrankten Tier gewonnenes Scrapieisolat kann aus mehreren Scrapiestämmen bestehen (Kimberlin & Walker, 1978b). Auch im Gehirnmaterial von vCJD-Patienten sowie eines an BSE erkrankten Rindes wurden mehr als ein einzelner  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Typ detektiert (Yull et al., 2006).

TSE können nicht nur innerhalb einer Art, sondern auch zwischen unterschiedlichen Arten durch Inokulation oder orale Aufnahme übertragen werden (Kimberlin & Walker, 1978a, Prusiner et al., 1985, Chesebro, 2003). Um also seine individuellen Merkmale beibehalten zu können, muss der jeweilige Prionproteinstamm seine individuellen Charakteristika dem Prionprotein seines Wirtes aufzwingen, selbst wenn dieser einer anderen Spezies angehört als der vorhergehende Wirt (Collinge & Clarke, 2007). Der beim Rind für BSE verantwortliche

Prionenstamm zum Beispiel überträgt sich effektiv auf eine Vielzahl von anderen Spezies, bewahrt jedoch seine biologischen Eigenschaften auch während der Passage durch eine Tierart mit abweichender Primärstruktur des Prionoproteins (Bruce et al., 1994).

Die drei prinzipiellen Glykoformen liegen bei jedem Prionenstamm in einem für ihn typischen Verhältnis vor, welches auch während der Passage durch einen Wirt mit einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz des Prionoproteins beibehalten wird (Collinge et al., 1996). Auch zeichnet sich jeder Stamm durch eine ihm eigene Konformation aus, die ihn von den anderen unterscheidet. Dieses lässt sich nach Proteinase K-Verdau durch ein individuelles Bandenmuster darstellen (Collinge et al., 1996, Telling et al., 1996).

Prionoproteinstämme können jedoch auch mutieren. Dieses geschieht im Allgemeinen bei der Passage durch einen neuen Wirt mit geringer Kompatibilität. Eine solche Mutation kann, muss aber nicht zwangsläufig bei der Übertragung auf eine andere Spezies oder intraspezifisch bei Übertragung auf Individuen mit abweichender PrP-Primärsequenz auftreten (Collinge & Clarke, 2007).

### **2.1.5 Übertragung und Speziesbarriere**

Die Übertragung von Prionenerkrankungen innerhalb einer Art ist wesentlich effektiver als die Übertragung zwischen Individuen, die verschiedenen Spezies angehören, weshalb in diesem Zusammenhang von einer „Speziesbarriere“ gesprochen wird: PrP-Knock-out-Mäuse, die zelluläres Hamsterprionprotein exprimieren, erkranken nach Inokulation mit PrP<sup>Sc</sup> aus Hamstergehirnen nach kurzer Zeit an Scrapie, zeigen aber sehr lange Inkubationszeiten, wenn sie mit Mäuseprionstämmen infiziert werden (Büeler et al., 1993). Klassische CJD-Prionen lassen sich auf Mäuse des Wildtyps nicht oder nur gelegentlich mit längeren Inkubationszeiten übertragen. Im Gegensatz dazu sind transgene Mäuse, die statt des murinen PrP<sup>C</sup> humanes PrP<sup>C</sup> exprimieren, hochgradig empfänglich für diese (Collinge et al., 1995, Hill et al., 1997).

Prusiner et al. (1990) postulierten, dass die Prionenvermehrung am effizientesten vonstatten gehe, wenn PrP<sup>Sc</sup> und PrP<sup>C</sup> in ihrer Primärstruktur identisch sind, da das infektiöse PrP<sup>Sc</sup> die Vermehrung von Prionprotein nach seinem Vorbild bestimme.

Büeler et al. (1993) konnten bestätigen, dass ein Mangel an Homologie zwischen infektiösem PrP<sup>Sc</sup> und zellulärem Prionoproteinen der Wirtsspezies den Ausbruch der Krankheit verzögert. Ein von Collinge & Clarke (2007) vorgeschlagenes Modell beschreibt den Einfluss der Primärsequenz des Wirtsprionoproteins folgendermaßen: Eine bestimmte Primärsequenz des Prionoproteins lässt nur eine definierte Anzahl von Konformationen zu. Überschneidet sich die Auswahl an möglichen Konformationen, die für das PrP<sup>Sc</sup> bei zwei verschiedenen Spezies

möglich wären, würde dieses in einer verhältnismäßig einfachen Übertragung der Infektion zwischen diesen beiden Spezies resultieren. Hätten zwei andere Spezies durch ihre Primärsequenz bedingt keine für das PrP<sup>Sc</sup> mögliche Konformation gemeinsam, wäre die Speziesbarriere sehr groß und eine Übertragung wäre nur durch eine Veränderung des infektiösen Prionenstammes möglich (Collinge & Clarke, 2007).

Aber auch der jeweilige Prionenstamm beeinflusst den Erfolg der Übertragung auf eine andere Spezies. So können vCJD-Prionen effizient auf Mäuse des Wildtyps übertragen werden, während die Übertragung auf Mäuse, die das humane PrP<sup>C</sup> exprimieren, verglichen mit einer Infektion durch klassische CJD-Prionentypen weniger erfolgreich ist (Hill et al., 1997). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen vCJD-Prionen und CJD-Prionen (siehe oben), obwohl beide eine identische PrP-Primärstruktur besitzen. Zwei Stämme, die in derselben Wirtsspezies vermehrt werden, können also durchaus unterschiedliche Speziesbarrieren zu einer anderen Tierart aufweisen (Hill et al., 1997, Collinge & Clarke, 2007).

## **2.2 Scrapie beim Schaf**

### **2.2.1 Verbreitung**

Schon im achtzehnten und neunzehnten Jahrhundert wurde in England und Kontinentaleuropa über die Scrapie beim Schaf berichtet. Im zwanzigsten Jahrhundert, besonders nach dem zweiten Weltkrieg, verbreitete sich die Krankheit weltweit durch den interkontinentalen Handel bestimmter Schafrassen, wie z.B. dem Merino (Detwiler & Baylis, 2003).

Die Scrapie gelangte in den 50er Jahren auch nach Australien und Neuseeland, wo sie jedoch durch strenge Handelsbeschränkungen und die komplette Eliminierung aller Importtiere sowie deren Kontakttiere zurückgedrängt werden konnte (Detwiler & Baylis, 2003). Derzeit gelten beide Länder als scrapiefrei (Buschmann & Groschup, 2005).

Ansonsten muss ohne verlässliche Daten aus TSE-Überwachungsprogrammen, die das Gegenteil beweisen, davon ausgegangen werden, dass die Scrapie in fast allen Ländern der Welt vorkommt, selbst wenn dort noch keine Fälle von Scrapie beschrieben worden sind (Buschmann & Groschup, 2005). Die höchsten Inzidenzen wurden über die Jahre vom Vereinigten Königreich, Frankreich, den Niederlanden, Spanien, Irland, Zypern und den USA gemeldet (Buschmann & Groschup, 2005).

Aus Tabelle 1 kann ein Eindruck über die derzeitige Situation bezüglich des Vorkommens von Scrapie in Europa gewonnen werden. Sie gibt die Anzahl der im Jahr 2006 detektierten

Scrapiefälle in den Staaten, die am 31. Dezember 2006 Mitglied der Europäischen Union waren (EU-25), an:

In Zypern wurden sowohl absolut als auch relativ zur Schafpopulation gesehen die meisten Scrapiefälle festgestellt. Die Scrapie trat hier zum ersten Mal im Jahr 1985 auf (Toumazos, 1988) und breitete sich in den Folgejahren rasant aus (Toumazos, 1991, Gravenor et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Seuche auf die Einfuhr von Schafen aus von Scrapie betroffenen Ländern zurückzuführen ist, weil die einheimischen Schafrassen Zyperns einen hohen Grad an Resistenz gegen eine Infektion aufzuweisen scheinen (Gravenor et al., 2004). Da infizierte Tiere während der lange andauernden Inkubationszeiten unerkant blieben, konnte sich die Seuche durch den innerzypriotischen Schafhandel ausbreiten (Gravenor et al., 2004). Die aktive TSE-Überwachung, die auch eine Erkennung von scrapieinfizierten Tieren in der Inkubationszeit ermöglicht, wurde in Zypern erst mit seinem EU-Beitritt im Mai 2004 eingeführt (Jahresbericht 2005 der Europäischen Kommission, 2006). Dies muss in Anbetracht der verhältnismäßig großen Anzahl der im Jahre 2006 detektierten scrapiepositiven Schafe berücksichtigt werden.

Frankreich weist im Jahr 2006 eine hohe Scrapieinzidenz auf (Tabelle 1). Es ist jedoch zu beachten, dass in Frankreich EU-weit (EU-25) mit Abstand die meisten TSE-Tests durchgeführt wurden (Jahresbericht 2006 der Europäischen Kommission, 2007). Im Vergleich zu Griechenland weist Frankreich bei vergleichbarer Schafpopulation zwar eine größere Anzahl von scrapiepositiven Schafen auf, hier waren aber nur 0,1% aller dem TSE-Monitoring unterzogenen Schafe positiv während in Griechenland immerhin 2,7% aller durchgeführten Tests ein positives Ergebnis lieferten (Jahresbericht 2006 der Europäischen Kommission, 2007).

In Deutschland wurden bis einschließlich des Jahres 2001 nur vereinzelt Scrapiefälle gemeldet (BMELV, 01/2008). Mit Beginn des aktiven Scrapiemonitorings im Jahr 2002 erfuhr die Anzahl der detektierten scrapiepositiven Schafe einen starken Anstieg und erreichte ihren Höhepunkt mit 43 bestätigten Scrapiefällen im Jahr 2004 (BMELV, 01/2008). Bei der Auflistung nach Scrapieinzidenz / 100 000 Schafe im Jahr 2006 (Tabelle 1) befindet sich Deutschland im Vergleich zu den anderen Mitgliedsstaaten im unteren Mittelfeld. Hier ist auch das Vereinigte Königreich einzuordnen, das zwar 2006 eine größere Anzahl von Scrapiefällen meldete (Tabelle 1), welche aber im Verhältnis zur Gesamtpopulation gesehen nur einen geringen Anteil ausmachten.

Bei den Mitgliedsstaaten, die im Jahr 2006 keinen Fall von Scrapie beim Schaf meldeten, handelt es sich um Staaten mit kleineren Schafpopulationen ( $n < 400\,000$ ) (Tabelle 1). In der

Tschechischen Republik war im Jahr 2005 ein Fall von Scrapie beim Schaf aufgetreten (Jahresbericht 2005 der Europäischen Kommission, 2006).

**Tabelle 1: Anzahl der im Jahr 2006 in den EU-Mitgliedsstaaten\* detektierten scrapiepositiven Schafe (Jahresbericht 2006 der Europäischen Kommission, 2007) sowie die Schafpopulationen der einzelnen Staaten (FAOSTAT, 01/2008) geordnet nach der sich daraus für 2006 ergebenden Inzidenz.**

| Mitgliedsstaat         | Schafpopulation | Scrapiefälle | Inzidenz / 100 000 Schafe |
|------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|
| Zypern                 | 272 192         | 1327         | 487,5                     |
| Slowenien              | 129 352         | 40           | 30,9                      |
| Frankreich             | 8 908 106       | 747          | 8,4                       |
| Niederlande            | 1 725 000       | 84           | 4,9                       |
| Italien                | 7 954 000       | 320          | 4,0                       |
| Griechenland           | 8 790 192       | 296          | 3,4                       |
| Slowakei               | 320 487         | 10           | 3,1                       |
| Irland                 | 5 969 600       | 123          | 2,1                       |
| Belgien                | 153 976         | 3            | 1,9                       |
| Portugal               | 3 583 000       | 65           | 1,8                       |
| Finnland               | 116 653         | 2            | 1,7                       |
| Schweden               | 479 700         | 8            | 1,7                       |
| Dänemark               | 206 000         | 3            | 1,5                       |
| Vereinigtes Königreich | 34 722 000      | 313          | 0,9                       |
| Deutschland            | 2 560 300       | 24           | 0,9                       |
| Spanien                | 22 513 970      | 135          | 0,6                       |
| Ungarn                 | 1 405 000       | 7            | 0,5                       |
| Estland                | 49 600          | 0            | 0,0                       |
| Lettland               | 41 600          | 0            | 0,0                       |
| Litauen                | 29 208          | 0            | 0,0                       |
| Luxemburg              | 9 644           | 0            | 0,0                       |
| Malta                  | 14 642          | 0            | 0,0                       |
| Österreich             | 325 728         | 0            | 0,0                       |
| Polen                  | 300 802         | 0            | 0,0                       |
| Tschechische Republik  | 148 412         | 0            | 0,0                       |

\* Staaten, die am 31.12.2006 Mitglied der Europäischen Union waren

## **2.2.2 Klassische Scrapie**

### **2.2.2.1 Klinische Symptomatik**

Wie alle TSE zeichnet sich auch die klassische Form der Scrapie durch lange Inkubationszeiten aus: 18 Monate bis 5 Jahre nach Exposition mit dem infektiösen Agens kann eine klinische Symptomatik beobachtet werden (Bulgin et al., 2006, Bulgin & Melson, 2007). Es sind jedoch auch extrem kurze Inkubationszeiten von ungefähr einem Jahr beschrieben worden (Bulgin et al., 2006, Bulgin & Melson, 2007). Ein akuter Verlauf mit heftiger Symptomatik und kürzerer Dauer sowie ein chronischer Verlauf mit milderer, dafür aber länger andauernder Symptomatik sind bekannt (Capucchio et al., 2001). Allerdings treten auch perakute Verlaufsformen mit sofortigem Festliegen auf (Bulgin et al., 2006).

Als die wichtigsten klinischen Befunde sind Verhaltensänderungen, Sensibilitätsstörungen, Störungen der Tiefensensibilität sowie motorische Fehlfunktionen zu nennen (Mechelli & Mantovani, 1988, Petrie et al., 1989, Vargas et al., 2005). Außerdem werden gelegentlich Ausfälle der Kopfnerven beobachtet, die sich in schlaff herabhängenden Ohren, fehlendem Pupillar- oder Drohreflex äußern können (Vargas et al., 2005).

Die Änderungen des Verhaltens zählen zu den ersten klinischen Anzeichen, die im Verlauf der klassischen Scrapie festgestellt werden (Vargas et al., 2005). Rastlosigkeit, Ängstlichkeit und Überempfindlichkeit auf externe Stimuli, wie Geräusche oder menschliche Annäherung (Kümper, 1994, Hunter, 2003, Vargas et al., 2005), aber auch Schläfrigkeit (Kümper, 1994) sowie eine Abneigung gegen äußere Beschränkungen (Vargas et al., 2005) sind möglich. Nicht selten starren die Tiere leer vor sich hin oder werden plötzlich aggressiv (Bulgin & Melson, 2007).

Zeichen von Hypersensitivität lassen sich leicht durch Kratzen des Rückens provozieren: Die Schafe strecken daraufhin den Hals und machen knabbernde Bewegungen mit Lippen und Zunge (Petrie et al., 1989, Kümper, 1994, Bulgin & Melson, 2007). In fortgeschrittenem Stadium scheuern sich die Tiere an Zäunen oder benagen sich, was dann in Wollverlust und abgeriebenen teils nackten Hautpartien resultiert (Petrie et al., 1989, Kümper, 1994, Hunter, 2003).

Störungen der Tiefensensibilität zeigen sich in Hyporeflexie vornehmlich der Hintergliedmaßen, seltener der Vordergliedmaßen (Vargas et al., 2005).

Ataxien werden zunächst in schnellen Gangarten sichtbar: Die mangelnde Koordination von Vorder- und Hinterhand äußert sich in einem hoppelnden Gang (Vargas et al., 2005, Bulgin & Melson, 2007). Die Tiere können nicht mehr galoppieren und bewegen sich stattdessen in

einem schnellen Trab fort, was der Krankheit im Deutschen die Bezeichnung „Traberkrankheit“ einbrachte (Kümper, 1994). Die Vorderbeine werden dabei im Lauf oft extrem hoch geworfen (Petrie et al., 1989, Vargas et al., 2005). Durch zunehmende Schwäche und Inkoordination haben betroffene Schafe immer größere Schwierigkeiten beim Aufstehen (Petrie et al., 1989), bis sie endgültig festliegen (Kümper, 1994).

Trotz erhaltenem Appetit magern die Tiere oft zusehends ab (Kümper, 1994), was wahrscheinlich auf einen Verlust an Muskelmasse zurückzuführen ist (Vargas et al., 2005). Kann sich ein Schaf nicht mehr aus eigener Kraft aufrichten, tritt der Tod innerhalb von 1-2 Wochen ein (Bulgin & Melson, 2007).

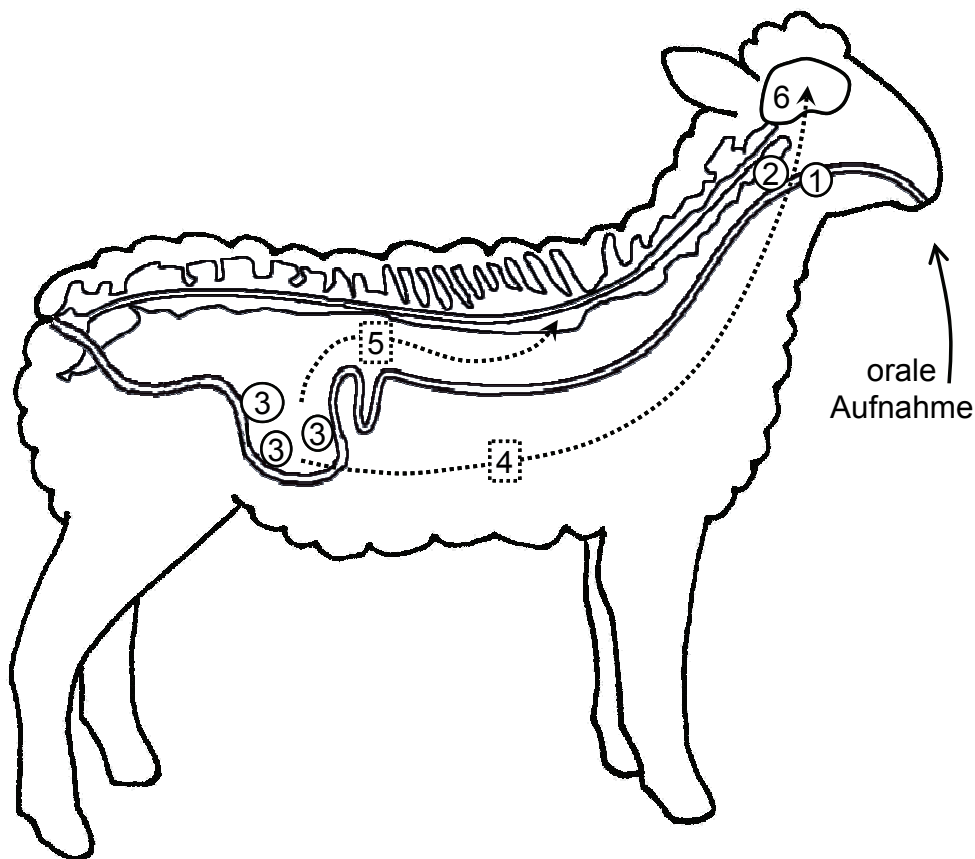
#### **2.2.2.2 Infektionswege**

Die klassische Form der Scrapie wird sowohl vertikal von der Mutter auf das Lamm als auch horizontal auf andere Herdenmitglieder übertragen: Die Plazenta des infizierten Muttertieres kann schon während der Inkubationszeit einen massiven PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt aufweisen (Lacroux et al., 2007). *In utero* ist das Lamm höchstwahrscheinlich noch keinem Kontakt mit infektiösem Material ausgesetzt (Tuo et al., 2001, Andreoletti et al., 2002). Während der Geburt werden jedoch mit dem Aufbrechen der Fruchthüllen neben Geburtskanal und Euter auch das gesamte Umfeld und das Lamm selbst mit infektiösem Material kontaminiert. Auch die Herdenmitglieder nehmen die infektiösen Proteine aus der verunreinigten Umgebung beim Weiden oder direktem Kontakt mit der infektiösen Nachgeburt auf (Tuo et al., 2001). Weidegründe, auf denen scrapiepositive Schafe gehalten wurden, können auch nach einigen Jahren noch für darauf aufgetriebene Schafe infektiös sein (Brown & Gajdusek, 1991, Buschmann & Groschup, 2005, Seidel et al., 2007). Direkter Kontakt zwischen Schafen aus verschiedenen Herden durch die Nutzung gemeinsamer Weidegründe oder Einsatz derselben Zuchtböcke, sowie Tierbewegungen zwischen den Herden (Zu- und Verkauf) steigern das Risiko der Übertragung von klassischer Scrapie immens (Hopp et al., 2001).

#### **2.2.2.3 Pathogenese**

Nach oraler Aufnahme dringt das infektiöse Agens in die Gaumenmandel und die Peyer'schen Plaques des caudalen Jejunums und Ileums ein. In diesem Stadium der Infektion wird PrP<sup>Sc</sup> auch in den mit der Gaumenmandel assoziierten medialen Retropharyngeallymphknoten und in den an die Peyer'schen Plaques angeschlossenen Mesenteriallymphknoten festgestellt. Von hier aus breitet sich das scrapieauslösende Agens in andere, nicht mit dem Verdauungstrakt assoziierte lymphatische Gewebe aus. Die Neuroinvasion beginnt im enterischen Nervensystem, von wo aus eine retrograde Ausbreitung

über efferente, den Verdauungstrakt innervierende parasympathische und sympathische Nervenstränge stattfindet: So gelangen die Prionen zum einen über den *Nervus vagus* in dessen sich in der *Medulla oblongata* befindlichen dorsalen Motornukleus (*Nucleus vagus dorsalis*) und zum anderen über den *Nervus splanchnicus* in die graue Substanz des thorakalen Rückenmarks (Andreoletti et al., 2000, van Keulen et al., 2002) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Infektionsweg der Scrapie nach Aguzzi & Sigurdarson (2004).** Nach oraler Aufnahme dringt das infektiöse Agens über die Gaumenmandel (1) in die medialen Retropharyngeallymphknoten (2) sowie über die Peyer'schen Plaques des caudalen Jejunums und Ileums in die Mesenteriallymphknoten (3) ein. Über efferente Nervenstränge gelangen die Prionen zum einen über den *Nervus vagus* (4) in das Gehirn (6) zum anderen über den *Nervus splanchnicus* (5) in die graue Substanz des thorakalen Rückenmarks.

#### 2.2.2.4 Pathologie

Im mikroskopischen Bild zeigen sich charakteristische schwammartige Veränderungen des Gewebes, die als Vakuolisierung bezeichnet werden. In allen Bereichen des Gehirns, die von Vakuolisierung betroffen sind, können PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen detektiert werden. Umgekehrt sind jedoch nicht alle Regionen, die PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen aufweisen, automatisch auch von Vakuolisierung heimgesucht (van Keulen et al., 1995). Im Hirnstamm auf Höhe des Obex ist

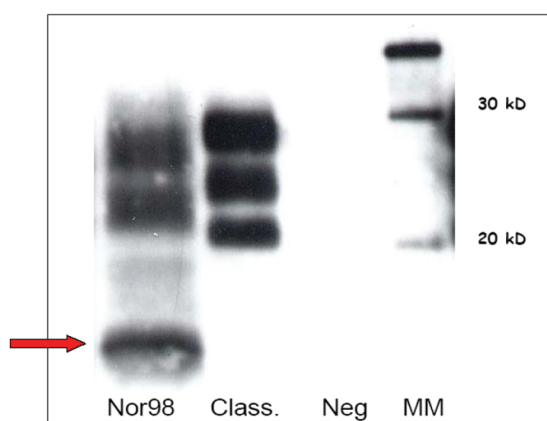
schon früh eine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> im Zusammenhang mit vakuolären Läsionen zu finden, was diese Gehirnregion für die Diagnostik der klassischen Scrapie prädestiniert (Gavier-Widen et al., 2005). Im dorsalen Motornukleus des Vagusnerves sind die beschriebenen pathologischen Veränderungen ebenfalls besonders stark ausgeprägt. Er ist deswegen vor allem für die Diagnostik von asymptomatischen sowie von sich in einem frühen Stadium befindlichen Infektionen, unverzichtbar (van Keulen et al., 1995, Gavier-Widen et al., 2005).

Es sind zahlreiche Verteilungsmuster von PrP<sup>Sc</sup> im Schafgehirn beschrieben worden, die von dem jeweiligen Scrapieisolat abhängen. PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen werden immunhistochemisch in Form von feinen Granula in den Perikaryen von Nervenzellen, insbesondere der Motorneurone des Hirnstammes und des zerebellären *Nucleus fastigii*, aber auch in Purkinje- und Pyramidenzellen der Großhirnrinde, nachgewiesen (van Keulen et al., 1995, Gonzalez et al., 2002). Auch im Zytoplasma von Gliazellen ist PrP<sup>Sc</sup> in Form von größeren Granula und teils eiförmigen Ablagerungen lokalisiert. Dies ist am deutlichsten im Hirnstamm und der weißen Substanz des Kleinhirns ausgeprägt. Perivaskulär finden sich PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulationen insbesondere in der thalamischen / hypothalamischen Region des Hirnstammes sowie in Klein- und Großhirnrinde, teilweise in Form von Plaques (Gonzalez et al., 2002). PrP<sup>Sc</sup> lagert sich weiterhin peripher an Neurone und Astrozyten sowie deren Fortsätze an. Verschiedene Formationen von PrP<sup>Sc</sup> sind z.B. auch als amorphe Plaques, konfluierende netzartige Strukturen oder feine Granula im Neuropil gelegen (van Keulen et al., 1995, Gonzalez et al., 2002).

#### **2.2.2.5 Nachweis im Western Blot**

Die meisten diagnostischen Tests für die Detektierung von PrP<sup>Sc</sup> (ELISA, Western Blot) beruhen auf der Ausnutzung seiner Proteaseresistenz und der Identifikation durch PrP-spezifische Antikörper (Gavier-Widen et al., 2005).

Im Western Blot ist entsprechend der drei Glykoformen, in denen PrP<sup>Sc</sup> vorliegen kann, ein charakteristisches Bandenmuster zu beobachten: die oberste Bande zeigt die stärkste Ausprägung und entspricht der diglykosylierten Fraktion des PrP<sup>Sc</sup>, die mittlere Bande (monoglykosylierte Fraktion) ist von nächstgrößter Intensität. Die unglykosylierte Fraktion des PrP<sup>Sc</sup> stellt sich in der unteren Bande dar, welche die schwächste Ausprägung besitzt (Stack et al., 2002). Alle drei Banden sind schwerer als 15 kDa. Ihr Molekulargewicht variiert von 16 – 30 kDa (EFSA, 2005) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Charakteristisches Bandenmuster von atypischen (Nor98) und klassischen (Class.) Scrapiefällen im TeSeE<sup>TM</sup> Western Blot mit Negativkontrolle (Neg) und Größenmarker (MM). Pfeil weist auf die nur bei atypischen Scrapieisolaten vorkommende Bande von unter 15 kDa hin. Abbildung von Dr. Sylvie Benestad, National Veterinary Institute, Norwegen, aus „Opinion of the scientific panel on biological hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in small ruminants” (EFSA, 2005).**

### 2.2.3 Atypische Scrapie

1998 traten in Norwegen die ersten Scrapiefälle auf, benannt als Nor98, die in ihren Charakteristika deutlich von den für klassische Scrapie typischen Merkmalen abwichen (Benestad et al., 2003) (Tabelle 2). Nach Beginn der verstärkten TSE-Überwachung in den EU-Mitgliedsstaaten im Jahre 2002 wurden in vielen Ländern, so in Deutschland (Buschmann et al., 2004b), Frankreich (Arsac et al., 2007), Portugal (Orge et al., 2004), Belgien (De Bosschere et al., 2004), Schweden (Gavier-Widen et al., 2004), Spanien (Vidal et al., 2007), Irland (Onnasch et al., 2004) und Großbritannien (Everest et al., 2006) weitere Scrapiefälle dieser Art, als atypisch bezeichnet, detektiert. (Die überwiegende Mehrheit der atypischen Scrapiefälle ist den Nor98-Fällen ähnlich wenn nicht sogar identisch mit ihnen, außerhalb Norwegens werden jedoch sowohl die Bezeichnungen „Nor98“, „Nor98-like“ als auch „atypische Scrapie“ verwendet (Benestad et al., 2008).) In der Schweiz wurden im Rahmen der in den Jahren 2004 bis 2005 durchgeführten aktiven und passiven TSE-Überwachung sechs Schafe mit atypischer Scrapie identifiziert (Nentwig et al., 2007). Auch in den USA (Cook, 2007) und in Südamerika (Epstein et al., 2005) wurde über das Auftreten von atypischen Scrapiefällen berichtet.

**Tabelle 2: Wesentliche Charakteristika der atypischen Scrapie im Vergleich mit Eigenschaften der klassischen Scrapie.**

|                                          | atypische Scrapie                                                                                                                                                                                                                                                                                | klassische Scrapie                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| betroffene Altersgruppen                 | alle Altersgruppen betroffen, Mehrheit der Fälle > 5 Jahre (Lühken et al., 2007)                                                                                                                                                                                                                 | Auftreten der klinischen Symptomatik i.d.R. im Alter von 2 – 5 Jahren (EFSA, 2005)                                                                                                                                                                                                          |
| Anzahl der positiven Tiere pro Herde     | meist nur ein Tier pro Herde betroffen (Lühken et al., 2007)                                                                                                                                                                                                                                     | oft mehr als ein Tier pro Herde betroffen (Lühken et al., 2007)                                                                                                                                                                                                                             |
| charakteristische Symptomatik            | progressive symmetrische Ataxie, Nervosität und Ängstlichkeit, Gewichtsverlust bei erhaltenem Appetit (Benestad et al., 2003, Onnasch et al., 2004, Orge et al., 2004)<br>meistens im Rahmen von aktiver TSE-Überwachung detektiert (gefallene oder asymptomatische Tiere) (Lühken et al., 2007) | Hypersensitivität (Pruritus), Wollverlust durch Scheuern (Petrie et al., 1989)<br>Ataxie, Werfen der Vorderbeine, Hoppeln der Hinterbeine, Hypermetrie (Vargas et al., 2005)<br>Nervosität und Ängstlichkeit (Kümper, 1994)<br>Gewichtsverlust bei erhaltenem Appetit (Petrie et al., 1989) |
| Beteiligung des lymphatischen Systems    | kein Nachweis von PrP <sup>Sc</sup> in lymphatischen Geweben (Benestad et al., 2003, Buschmann et al., 2004b)                                                                                                                                                                                    | PrP <sup>Sc</sup> kann in lymphatischen Geweben, wie Tonsillen, Lymphknoten, GALT, Milz nachgewiesen werden (Andreoletti et al., 2000, van Keulen et al., 2002)                                                                                                                             |
| Immunhistopathologie                     | vakuoläre Degeneration und PrP <sup>Sc</sup> -Ablagerungen hauptsächlich im Neuropil des Kleinhirns und der Großhirnrinde, geringgradig im Hirnstamm, gelegentlich im Obex (Benestad et al., 2003, Buschmann et al., 2004b)                                                                      | vakuoläre Degeneration und PrP <sup>Sc</sup> -Ablagerungen besonders ausgeprägt im Hirnstamm auf Höhe des Obex und im dorsalen Motornukleus des Vagusnerves (Gavier-Widen et al., 2005)                                                                                                     |
| Western Blot („Mild-PK“ WB (EFSA, 2005)) | von klassischer Scrapie abweichendes Bandenmuster, zusätzliche Bande < 15 kDa (EFSA, 2005)                                                                                                                                                                                                       | drei Hauptbanden (> 15 kDa) (EFSA, 2005)                                                                                                                                                                                                                                                    |

### 2.2.3.1 Klinische Symptomatik / Problematik der Diagnose bei Asymptomatik

Bei von atypischer Scrapie betroffenen Schafen ist progressive symmetrische Ataxie das hervorstechendste klinische Symptom. Nervosität und Ängstlichkeit wie auch Gewichtsverlust bei erhaltenem Appetit werden ebenfalls häufig gesehen (Benestad et al., 2003, Onnasch et al., 2004, Orge et al., 2004). Wollverlust ist nur selten zu beobachten (Madec et al., 2004). Die Krankheit kommt in allen Altersgruppen vor, wobei jedoch die Mehrheit der atypisch scrapiepositiven Tiere über 5 Jahre alt ist. Es wurde sogar über einige

bis zu 20 Jahre alte Schafe berichtet, die von atypischer Scrapie betroffen waren. Somit liegt das Durchschnittsalter wesentlich höher, als dies bei der klassischen Form der Scrapie der Fall ist (Benestad et al., 2003, Lühken et al., 2007) (Tabelle 2). Oft werden positive Tiere noch vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome der Routineschlachtung zugeführt, bei der im Rahmen EU-weiter TSE-Überwachungsprogramme die Diagnose gestellt wird (Buschmann et al., 2004b, De Bosschere et al., 2004, Lühken et al., 2007).

Es ist jedoch zu erwähnen, dass nicht alle in diesem Rahmen gebräuchlichen und in der EU anerkannten Schnelltestverfahren diese asymptomatischen atypischen Scrapiefälle detektieren (Buschmann et al., 2004a). In Ländern, in denen Schnelltests genutzt werden, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen, wird die tatsächliche Anzahl der Scrapiefälle sowie die Prävalenz der Krankheit ernsthaft unterschätzt. Es wird davon ausgegangen, dass in Deutschland auf diese Weise im Mittel 12% der Scrapiefälle nicht detektiert worden sind (Buschmann et al., 2004a). In Schleswig-Holstein zum Beispiel wurde in den Jahren von 2002 – Anfang 2006 kein atypischer Scrapiefall nachgewiesen, obwohl dieses Bundesland die zweitgrößte Schafpopulation Deutschlands aufweist und die Erkrankung gleichmäßig über ganz Deutschland verbreitet ist (Lühken et al., 2007).

### **2.2.3.2 Infektionswege und Pathogenese**

Im Gegensatz zur klassischen Form der Scrapie konnte PrP<sup>Sc</sup> bei der atypischen Scrapie nicht in lymphatischen Geweben, wie Mandibular- oder Retropharyngeallymphknoten, Tonsillen, Milz oder den Nickhäuten nachgewiesen werden (Benestad et al., 2003, Buschmann et al., 2004b, De Bosschere et al., 2005) (Tabelle 2), was das Risiko der Ausbreitung durch horizontale Ansteckung verringert (De Bosschere et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass meist nur ein Tier pro Herde betroffen ist, was auf einen niedrigen Infektionsdruck hinweist (Benestad et al., 2003). In Deutschland waren innerhalb der Zeitspanne von Januar 2002 bis Februar 2006 in 91,6% der von atypischer Scrapie betroffenen Herden ausschließlich Einzeltiere betroffen. Bei 5 von 7 Herden, in denen mehr als ein atypischer Scrapiefall auftrat, handelte es sich um sehr große Herden mit bis zu 5000 Tieren. Die übrigen 2 Herden waren immerhin 500 – 1000 Tiere groß (Lühken et al., 2007). Aus diesem Grund ist auch eine spontane Genese der Krankheit in der Diskussion (De Bosschere et al., 2005, Lühken et al., 2007). Le Dur et al. (2005) infizierten erfolgreich Mäuse, die das ovine PrP<sup>C</sup> exprimierten, intrazerebral mit atypischer Scrapie und gaben so unabhängig von ihrem Entstehungsmechanismus einen Hinweis auf die infektiöse Natur der Erkrankung. Des Weiteren konnte die atypische Scrapie experimentell zwischen zwei Schafen übertragen werden (Simmons et al., 2007). Unter natürlichen Bedingungen hingegen konnten

keine für die Übertragung signifikanten Risikofaktoren wie Tierkontakt oder –bewegungen zwischen Herden im Bezug auf die atypische Form der Scrapie festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass das Ansteckungsrisiko unter natürlichen Bedingungen eher gering, wenn überhaupt vorhanden ist (Hopp et al., 2006).

### **2.2.3.3 Pathologie**

Histopathologisch unterscheidet sich die Verteilung der Läsionen im Gehirn von atypisch scrapiepositiven Tieren deutlich von dem bisher für die klassische Scrapie bekannten Verteilungsmuster (Tabelle 2). Eine vakuoläre Degeneration lässt sich hauptsächlich im Neuropil insbesondere des Kleinhirns und der Großhirnrinde und nur geringgradig im Hirnstamm, gelegentlich im Obex, feststellen (Benestad et al., 2003, Buschmann et al., 2004b). Der *Nucleus vagus dorsalis* als der bei klassischer Scrapie erste von Vakuolisierung und PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung betroffene Nukleus des ZNS, dort aus diesem Grund auch Bestandteil der Routinediagnostik, ist bei der atypischen Scrapie hingegen nicht betroffen (Orge et al., 2004). Im Hinblick darauf, dass zunehmend atypische Scrapiefälle festgestellt werden, wird empfohlen, neben der obligatorischen Obexprobe auch das Kleinhirn zu beproben und auf das Vorliegen einer TSE zu untersuchen (Gavier-Widen et al., 2005).

Immunhistochemisch zeigen sich PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen zu einem hohen Maße in der Molekularzellschicht, teilweise auch in den übrigen Bereichen des Kleinhirns, weniger im Neuropil des frontalen Cortex, Diencephalon und Obex (Buschmann et al., 2004b, Onnasch et al., 2004). Dies steht im Gegensatz zur klassischen Form der Scrapie, wo PrP<sup>Sc</sup> vor allem an der Zellmembran von Neuronen und Astrozyten in Medulla oblongata und Pons akkumuliert (van Keulen et al., 1995). Auffällig bei der atypischen Form der Scrapie ist die diffuse Verteilung des PrP<sup>Sc</sup>. Sie unterscheidet sich deutlich von dem typisch fleckigen Erscheinungsbild der perivaskulären PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen, wie es im Thalamus von klassisch scrapiepositiven Tieren zu finden ist (Benestad et al., 2003).

### **2.2.3.4 Nachweis im Western Blot**

Bei atypischen Scrapiefällen, insbesondere bei den als Nor98 bezeichneten Fällen, wird im Western Blot eine zusätzliche Bande in der Größe von ca. 12 kDa detektiert (Benestad et al., 2003, Buschmann et al., 2004b, De Bosschere et al., 2004, Gavier-Widen et al., 2004) (Abbildung 5, Tabelle 2). Klingeborn et al. (2006) legten bei zwei schwedischen Schafen mit atypischer Scrapie das Molekulargewicht dieser Bande auf 7 kDa fest. Es werden jedoch nicht bei allen atypischen Scrapiefällen Banden in dieser Größenordnung beobachtet, was auf das Vorhandensein von mindestens zwei atypischen Scrapiestämmen mit unterschiedlichem

Phänotyp hinweist (Buschmann et al., 2004a). Auch die Intensität der drei bereits von der klassischen Scrapie bekannten PrP<sup>Sc</sup>-Banden weicht beim atypischen Isolat ab: Hier ist das Signal der unglykosylierten Fraktion (untere Bande) genauso stark wie das der diglykosylierten Fraktion (obere Bande) (Buschmann et al., 2004b).

## **2.3 Genetische Grundlagen der Scrapieresistenz beim Schaf**

### **2.3.1 Klassische Scrapie**

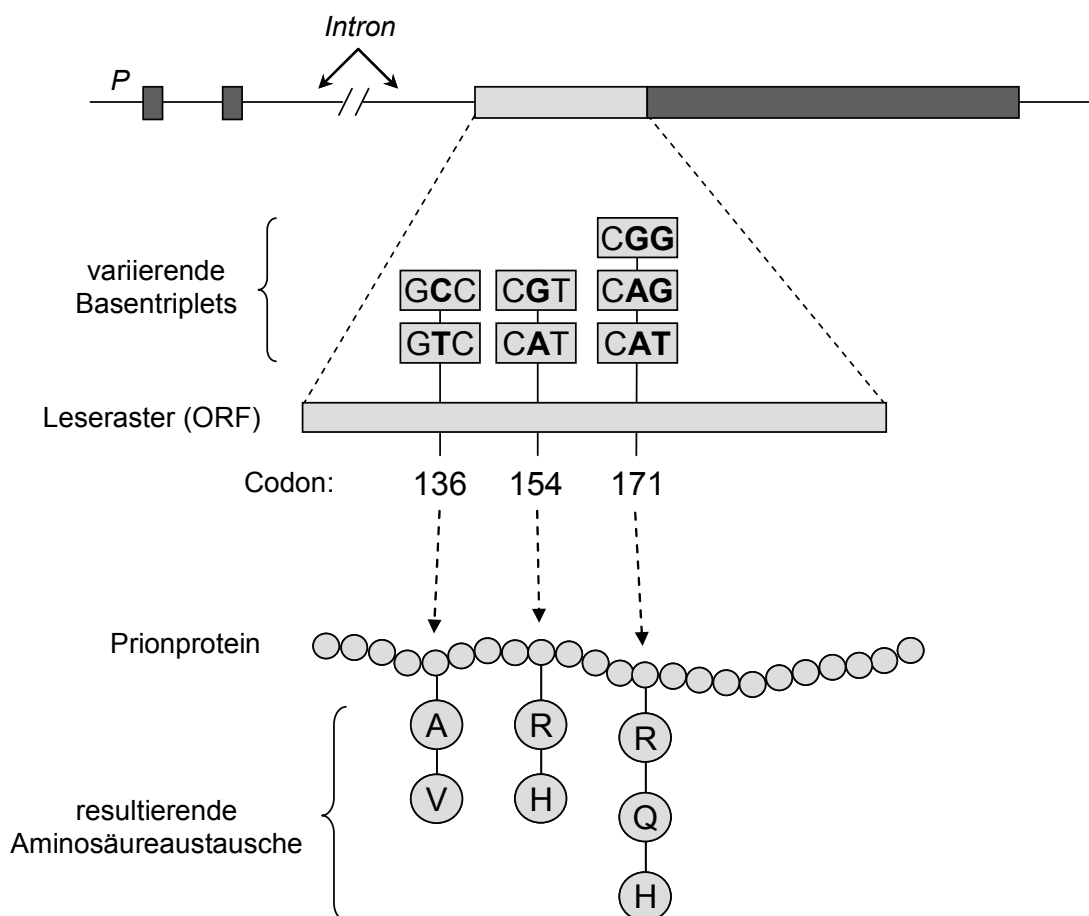
#### **2.3.1.1 Das Prionproteingen**

Das *Prionproteingen* (*PRNP*), das für das ovine Prionprotein kodiert, liegt beim Schaf auf Chromosom 13 (Iannuzzi et al., 1998, Lühken et al., 2006). Es besteht aus drei Exons, von denen die ersten beiden im 5'-UTR-Bereich liegen. Das dritte Exon kodiert für ein offenes Leseraster (ORF) von 256 Codons (Goldmann et al., 1990, Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 6).

Im *PRNP* sind zahlreiche Basenaustausche gefunden worden, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, davon wurde für folgende Austausche eine Assoziation mit Scrapieresistenz nachgewiesen (Acin et al., 2004, Baylis & Goldmann, 2004): An Codon 136 des ovinen *PRNPs* führt ein Einzelbasenpaaraustausch dazu, dass an der entsprechenden Stelle im Prionprotein die Aminosäure Valin (V) an die Stelle von Alanin (A) tritt. An Position 154 des ovinen Prionproteins können Arginin (R) oder Histidin (H) eingebaut werden und an Position 171 kann Arginin (R) durch Glutamin (Q) oder Histidin (H) ersetzt werden (Hunter, 2003) (Abbildung 6). Der jeweilige Haplotyp, im Folgenden auch als Allel bezeichnet, wird durch die Aminosäurekürzel an den entsprechenden Stellen in Reihenfolge angegeben. So wird ein Allel mit den Aminosäuren Alanin, Arginin und Arginin an den Positionen 136, 154 und 171 des ovinen Prionproteins als A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>R<sub>171</sub> oder einfach als ARR beschrieben. Für die Bezeichnung des Genotyps werden dann die beiden Allele in Folge genannt (Hunter, 2003).

Obwohl 12 mögliche Kombinationen der unterschiedlichen Aminosäuren bestehen, werden überwiegend die fünf Haplotypen VRQ, ARR, ARQ, ARH und AHQ beobachtet (Belt et al., 1995), aus welchen 15 Genotypen resultieren, die mit Scrapieempfindlichkeit assoziiert sind (Hunter, 2003, Baylis & Goldmann, 2004). Kutzer et al. (2002) detektierten in Deutschland außerdem die zwei seltenen Allelvarianten VRR und AHR. VRR trat ausschließlich bei Nolana-Schafen auf, während AHR bei den Rassen Nolana, Suffolk und Texel gefunden wurde (Kutzer et al., 2002).

An den drei genannten Positionen im Prionprotein wurden aber auch andere Aminosäureaustausche beschrieben: Guo et al. (2003) detektierten einen Polymorphismus im Prionproteingen, der zu der Aminosäure Lysin and Position 171 führt. Der daraus resultierende Haplotyp ARK wurde in spanischen und griechischen Schafrassen gefunden (Acin et al., 2004, Billinis et al., 2004). Es wird vermutet, dass dieser Aminosäureaustausch einen gewissen Effekt auf die Scrapieempfindlichkeit hat, jedoch erschwert die niedrige Frequenz eine konkrete Beweisführung (Baylis & Goldmann, 2004). Billinis et al. (2004) wiesen den Haplotyp T<sub>136</sub>RQ nach. Für diesen Aminosäureaustausch steht der Beweis einer Assoziation mit Scrapieresistenz noch aus (Baylis & Goldmann, 2004).



**Abbildung 6:** Für die Scrapieresistenz bedeutsame Basenaustausche (fettgedruckt) in Codons 136, 154 und 171 im ovinen *Prionproteingen* und daraus resultierende Aminosäureaustausche an den entsprechenden Positionen im ovinen Prionprotein nach Hunter (2007) und Erhardt (2005). *P* Promotorregion, ■ 3'- bzw. 5'-UTR, ■ Leseraster (ORF), A Alanin, V Valin, R Arginin, H Histidin, Q Glutamin

Es ist erwähnenswert, dass kürzlich auch an den Positionen 137, 142 und 176 seltene Aminosäureaustausche mit Scrapieresistenz in Verbindung gebracht wurden: So haben die Aminosäureaustausche Threonin gegen Methionin an Position 137, Lysin gegen Isoleucin an

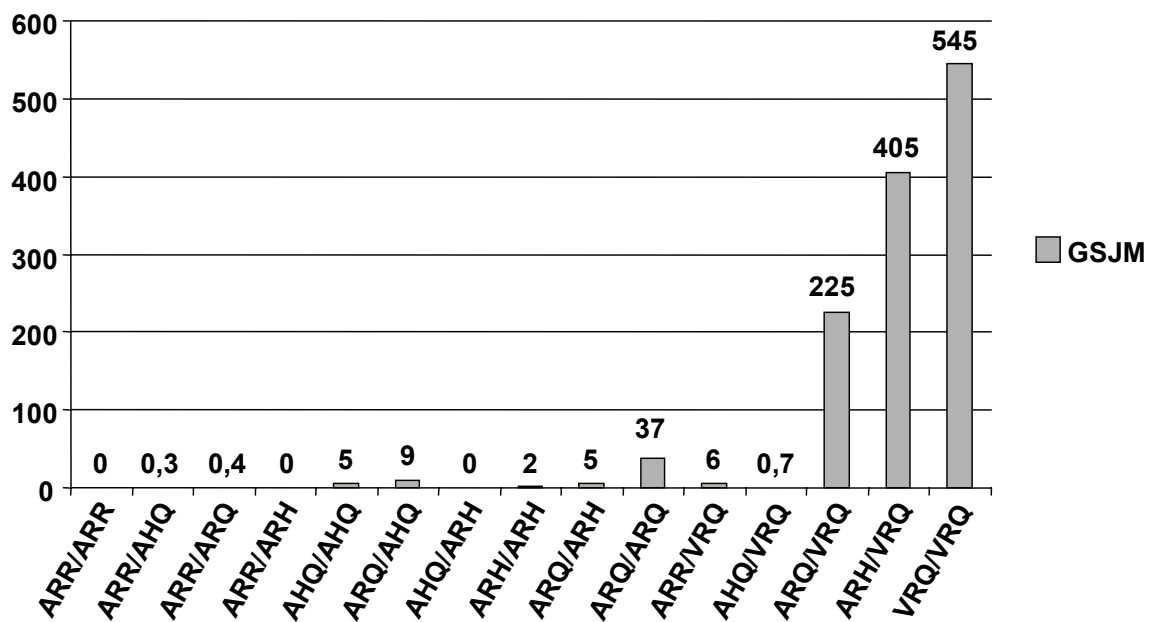
Position 142 und Lysin gegen Asparagin an Position 176 des ovinen Prionproteins in Verbindung mit dem A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>-Allel im Hinblick auf die Empfänglichkeit für klassische Scrapie einen protektiven Effekt (Vaccari et al., 2007).

### **2.3.1.2 Allele mit hoher Scrapieempfindlichkeit**

Der Prionproteingenotyp beeinflusst die Empfänglichkeit für klassische Scrapie sowie die Dauer der Inkubationszeit (Hunter, 2003) und scheint einen Einfluss auf die PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation im Gehirn auszuüben (Gonzalez et al., 2002).

Der Zusammenhang zwischen dem PrP-Genotyp und der TSE-Empfänglichkeit wurde zuerst bei einer routinemäßig mit Scrapie infizierten Versuchsherde von Cheviot-Schafen der NPU (Neuropathogenesis Unit) in Großbritannien beobachtet: Hier wiesen Tiere, die homozygot für das VRQ-Allel waren, eine deutlich kürzere Inkubationszeit auf als heterozygote Tiere (VRQ/ARQ oder VRQ/ARR) (Goldmann et al., 1991, Houston et al., 2002). In derselben Herde hatten sich auch Tiere auf natürlichem Wege mit der Krankheit infiziert. Hunter et al. (1996) stellten fest, dass auch hier der VRQ/VRQ-Genotyp, aber auch der VRQ/ARQ-Genotyp ein hohes Risiko hatte, an Scrapie zu erkranken. Baylis & Goldmann (2004) setzten die Genotypen von in Großbritannien gemeldeten Scrapiefällen ins Verhältnis zu den in der britischen Schafpopulation vorliegenden Genotypfrequenzen und konnten so den hohen Grad an Scrapieempfindlichkeit, der mit dem VRQ-Allel assoziiert ist, darstellen. Demnach weisen insbesondere der VRQ/VRQ-Genotyp, aber auch Genotypen mit nur einem VRQ-Allel, wie ARH/VRQ und ARQ/VRQ einen hohen Grad an Scrapieempfindlichkeit auf (Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7).

In einigen Rassen, wie z.B. beim Suffolk-Schaf, kommt der VRQ-Haplotyp nur in sehr niedrigen Frequenzen vor (Drögemüller et al., 2001). Hunter et al. (1997) stellten in einer schottischen Suffolk-Herde fest, dass hier die meisten Scrapiefälle den ARQ/ARQ-Genotyp aufwiesen. In spanischen Schafrassen (Rasa Aragonesa, Rasa Navarra) kommt das VRQ-Allel ebenfalls nur in geringen Frequenzen vor (Acin et al., 2004). Auch hier hat der ARQ/ARQ-Genotyp ein hohes Risiko, an klassischer Scrapie zu erkranken (Acin et al., 2004).



**Abbildung 7:** Schätzung der Anzahl der in Großbritannien gemeldeten Scrapiefälle pro Jahr auf eine Millionen Schafe eines jeden Genotyps gerechnet (GSJM) in Großbritannien. Daten von Baylis & Goldmann (2004): Den Daten liegen die Genotypen von ca. 14 000 britischen Schafen und die Genotypen von allen bis zum Zeitpunkt der Entstehung der Publikation von Baylis und Goldmann (2004) gemeldeten Scrapiefällen zugrunde. Aus dieser Schätzung kann ein Eindruck über die relative Scrapieempfindlichkeit eines jeden Genotyps gewonnen werden (Baylis & Goldmann, 2004).

### 2.3.1.3 Allele mit hoher Scrapieresistenz

Das ARR-Allel verleiht insbesondere in homozygoter Ausprägung eine hohe Resistenz gegen die klassische Scrapie (Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7). Bis 2002 war bei hunderten scrapiepositiven Schafen nur ein einziges japanisches Suffolk-Schaf Träger des Genotyps ARR/ARR (Ikeda et al., 1995). Im Jahre 2007 wurde jedoch auch im Rahmen einer retrospektiven Genotypisierungsstudie aller 230 TSE-Fälle bei kleinen Wiederkäuern, die in Deutschland von 2000 bis 2006 aufgetreten waren, ein klassisch scrapiepositives Schaf mit dem Genotyp ARR/ARR identifiziert (Groschup et al., 2007). Ein weiteres klassisch scrapiepositives Schaf mit dem Genotyp ARR/ARR wurde bei der Untersuchung von über 1700 Gewebeproben von klinischen Verdachtsfällen, die in Frankreich im Zeitraum von 1993 bis 2001 aufgetreten waren, detektiert (Groschup et al., 2007).

Tiere, bei denen das VRQ-Allel zusammen mit dem ARR-Allel auftritt, sind um ein Vielfaches weniger empfänglich für klassische Scrapie als die unter 2.3.1.2 genannten heterozygoten Träger des VRQ-Allels (Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die für die vertikale aber auch horizontale Übertragung von

klassischer Scrapie bedeutsame Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in der Plazenta von empfänglichen Muttertieren (VRQ/VRQ) nicht stattfindet, wenn der Fetus den ARR-Haplotyp trägt (Andreoletti et al., 2002, Tuo et al., 2002, Lacroux et al., 2007). Bei infizierten Mutterschafen mit einem VRQ-Allel, das in Kombination mit einem ARR-Allel auftritt, findet keine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in der Plazenta statt, selbst wenn der Fetus den empfänglichen Genotyp VRQ/VRQ besitzt (Lacroux et al., 2007).

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass mit Scrapie infizierte ARR/VRQ-Schafe zwar PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im Gehirn zeigen, die sekundären lymphatischen Organe jedoch nicht beteiligt sind (van Keulen et al., 1996, Andreoletti et al., 2000).

#### **2.3.1.4 Sonstige Prionproteinallele**

Die Effekte der Allele ARH und AHQ auf die Scrapieempfindlichkeit sind tendenziell hintergründig und nicht eindeutig zu differenzieren. In Relation zum ARQ-Haplotyp gestellt, scheint das AHQ-Allel die Resistenz gegen die klassische Scrapie zu steigern (Elsen et al., 1999, O'Doherty et al., 2002, Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7): Elsen et al. (1999) beobachteten einen dem ARR-Allel ähnlichen protektiven Effekt des AHQ-Allels in der Rasse Romanov. O'Doherty et al. (2002) stellten bei Vorliegen des AHQ-Allels bei Kreuzungstieren der Rassen Suffolk, Texel, Cheviot und Belclare in Irland ein signifikant geringeres Risiko, an Scrapie zu erkranken, fest.

Das ARH-Allel erhöht die Empfänglichkeit seines Trägers für klassische Scrapie, insbesondere in Kombination mit dem VRQ-Allel (Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7). In anderen Genotypen scheint es aber die Resistenz zu steigern: So sind ARQ/ARH-Träger im Verhältnis weniger von klassischer Scrapie betroffen als für ARQ homozygote Tiere und AHQ/ARH-Träger weniger als Tiere, die homozygot für das AHQ-Allel sind (Baylis & Goldmann, 2004) (Abbildung 7).

#### **2.3.1.5 Situation in der deutschen Schafpopulation**

In der deutschen Schafpopulation war im Zeitraum von Januar 2002 bis Februar 2006 mit Ausnahme eines einzelnen Schafes (siehe 2.3.1.3) kein Träger des ARR-Allels von klassischer Scrapie betroffen (Lühken et al., 2007). Das ARQ-Allel vermittelte die höchste genetische Empfänglichkeit für klassische Scrapie, während das VRQ-Allel, das allerdings auch bei den nicht betroffenen Herdenmitgliedern der erkrankten Tiere nur zu ca. 5% vertreten war, ein geringeres Risiko für die Erkrankung aufwies (Lühken et al., 2007).

### 2.3.2 Atypische Scrapie

Die ersten Fälle von atypischer Scrapie, die 1998 in Norwegen beobachtet wurden, wiesen alle den bislang als mit geringer Scrapieempfindlichkeit assoziierten Haplotyp AHQ auf, entweder in homozygoter Form oder heterozygot in Kombination mit dem ARQ-Allel. Herdenmitglieder, die ein VRQ-Allel trugen, waren jedoch von der Erkrankung nicht betroffen (Benestad et al., 2003).

Im Rahmen der seit 2002 EU-weit durchgeführten TSE-Überwachungsprogramme wurden schließlich in Deutschland zwei Schafe als atypisch scrapiepositiv diagnostiziert, die den Genotyp ARR/ARR aufwiesen (Buschmann et al., 2004b). Auch in anderen EU-Mitgliedsstaaten wie Portugal (Orge et al., 2004), Frankreich (Madec et al., 2004), Belgien (De Bosschere et al., 2005) oder auch Großbritannien (Saunders et al., 2006) wurden weitere Fälle bei ARR-homozygoten Tieren detektiert. Dieses stellt den absoluten Erfolg der im Rahmen der Scrapiebekämpfung durchgeführten züchterischen Selektion auf das ARR-Allel in Frage (Buschmann et al., 2004b).

Ein schon zuvor entdeckter und bislang als bedeutungslos angenommener Aminosäureaustausch von Leucin (L) zu Phenylalanin (F) an Codon 141 des ovinen Prionproteingens (Bossers et al., 1996), konnte von Moum et al. (2005) mit atypischer Scrapie in Verbindung gebracht werden. Das F<sub>141</sub>-Allel, welches ausschließlich in Verbindung mit dem ARQ-Haplotyp vorkommt (Bossers et al., 1996, Hunter et al., 1996), sowie das AHQ-Allel zeigten eine höchst signifikante Assoziation mit den Nor98-Fällen (Moum et al., 2005). Moum et al. (2005) stellten fest, dass der AF<sub>141</sub>RQ-Haplotyp seinen Trägern dabei ein noch höheres Risiko, bei Exposition an atypischer Scrapie zu erkranken, verleiht als der AHQ-Haplotyp, wobei sich die Effekte beider Allele additiv auswirken. Das im Hinblick auf die klassische Scrapie als empfänglich beschriebene VRQ-Allel wurde im Rahmen dieser Studie jedoch bei keinem der von Scrapie betroffenen Tiere gefunden, obwohl es in den betroffenen Herden eine Frequenz von 22% ausmachte. Die Autoren vermuteten daher, dass das VRQ-Allel seinen Trägern eine vollständige oder zumindest partielle Resistenz gegen atypische Scrapie verleiht.

In Deutschland konnte die hohe Empfänglichkeit des AF<sub>141</sub>RQ- (Lühken et al., 2007) und des AHQ-Haplotypen (Lühken et al., 2004, Lühken et al., 2007) für atypische Scrapie bestätigt werden. Genotypen, die das AF<sub>141</sub>RQ-Allel beinhalteten, hatten ein besonders hohes Risiko zu erkranken, insbesondere in Kombination mit dem AHQ-Allel (Lühken et al., 2007). Der Genotyp AL<sub>141</sub>RQ/ AL<sub>141</sub>RQ ist zwar nicht sehr empfänglich für atypische Scrapie, vermittelt jedoch auch keine absolute Resistenz. Immer noch fast die Hälfte der betroffenen Tiere in

Deutschland trugen den AL<sub>141</sub>RQ- oder den ARR-Haplotyp und immerhin 6,8% der von atypischer Scrapie betroffenen Tiere wiesen den ARR/ARR-Genotyp auf (Lühken et al., 2007).

## **2.4 BSE**

### **2.4.1 Potentielle Bedeutung der Scrapie des Schafes für die BSE des Rindes**

Während bislang noch kein epidemiologischer oder experimenteller Hinweis dafür vorliegt, dass eine Verbindung zwischen der klassischen Form der Scrapie und irgendeiner beim Menschen auftretenden TSE-Erkrankung besteht (Doherr, 2007), wird bei der BSE davon ausgegangen, dass der ursächliche Prionenstamm mit dem Auslöser der vCJD identisch ist (Bruce et al., 1997, Hill et al., 1997).

Die ersten Fälle von BSE traten Mitte der 1980er Jahre in Großbritannien bei einheimischen Rindern auf. Dies war der Beginn einer Epidemie, die 1992 mit über 35 000 BSE-Fällen ihren Höhepunkt erreichte (Pattison, 1998). Allgemein wird angenommen, dass Fleisch- und Knochenmehl als Vehikel für die Verbreitung des infektiösen Agens diene (European Commission, 2001). Der Ursprung der BSE wird jedoch kontrovers diskutiert (Doherr, 2007): Das auslösende Agens der Scrapie beim Schaf kann als Ursache nicht ausgeschlossen werden (European Commission, 2001). Die in diesem Zusammenhang bei Horn et al. (2001) beschriebenen Faktoren scheinen aus Sicht des Scientific Steering Committee (SSC) (European Commission, 2001), das die zur Entstehung der BSE aufgestellten Hypothesen diskutierte, eine vernünftige Erklärung dafür zu sein, dass die BSE in solch einem Ausmaß in Großbritannien vorkam und nicht an anderer Stelle: So hatte Großbritannien in der Zeit von 1970 – 1985 innerhalb der EU die größte Schafpopulation und das Verhältnis von Schaf zu Rind war eines der höchsten. Schätzungen nach gab es mehrere tausend Scrapiefälle pro Jahr. Demnach wäre in Fleisch- und Knochenmehl eine vergleichsweise hohe Infektiosität zu finden, die den Ursprung der BSE des Rindes begründet haben könnte. In der Zeit von 1970 bis 1988 wurde Fleisch- und Knochenmehl verstärkt in Milchaustauschern für Kälber eingesetzt. Außerdem wurden die Prozessparameter in den Tierkörperbeseitigungsanstalten verändert: Auch nur eine Differenz um den Faktor 10 bei der Inaktivierung des infektiösen Agens könnte signifikant zu der Entstehung der BSE-Epidemie beigetragen haben (Horn et al., 2001). Durch ein Verbot im Juli 1988, Wiederkäuerprotein an Wiederkäuer zu verfüttern, sank die Inzidenz von Neuinfektionen und damit 5 Jahre später (= durchschnittliche

Inkubationszeit) im Jahre 1993 auch das Auftreten von klinischen BSE-Fällen im Vereinigten Königreich (Pattison, 1998).

#### **2.4.2 BSE beim Schaf**

Aufgrund der Verbindung zwischen BSE und vCJD besteht die Sorge, dass auch Schafe durch die Fütterung kontaminierter Futtermittel mit BSE infiziert worden sein könnten (Fryer et al., 2007). Im Tierversuch wurde nachgewiesen, dass Schafe oral mit BSE infiziert werden können (Foster et al., 2001b). Zwar wurde bislang noch kein BSE-Fall bei einem Schaf festgestellt (Doherr, 2007), aber im Jahre 2002 wurde im Rahmen der TSE-Überwachung auf einem Schlachthof eine BSE-positive Ziege identifiziert (Eloit et al., 2005).

Bellworthy et al. (2005a) beschrieben die Übertragung von BSE auf natürlichem Weg in einer britischen Versuchsherde: Zwei Lämmer steckten sich prä- oder peripartal bei ihren experimentell infizierten Muttertieren an und starben an BSE. Die Autoren ziehen die Möglichkeit in Betracht, dass der BSE-Erreger sich bei ausreichend hohem Infektionsdruck und dem Vorhandensein von empfänglichen Tieren in der Schafpopulation verbreitet haben könnte, wenn diese zu Beginn der BSE-Epidemie von BSE betroffen gewesen wäre.

Bei experimentell mit BSE infizierten Schafen ist das klinische Erscheinungsbild wie auch bei der Scrapie sehr variabel: Obwohl bei mit einem klassischen Scrapieisolat infizierten Schafen zumeist Pruritus als erstes klinisches Anzeichen für die Erkrankung festgestellt wird, während bei von BSE betroffenen Tieren tendenziell Ataxie zuerst auftritt, ist die klinische Symptomatik der beiden Erkrankungen generell nicht voneinander zu unterscheiden (Houston & Gravenor, 2003).

Die Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> in ZNS, lymphatischem System und autonomem Nervensystem ist dem bei der Scrapie beobachteten Profil sehr ähnlich (Foster et al., 2001b, Jeffrey et al., 2001). Die bei BSE-infizierten Schafen festgestellte Ausbreitung und Intensität von PrP<sup>Sc</sup> in lymphatischem Gewebe und peripherem Nervensystem wird bei BSE-infizierten Rindern so nicht beschrieben. Hier werden kaum detektierbare Mengen von PrP<sup>Sc</sup> in peripheren Geweben gefunden (Foster et al., 2001b, Wells, 2003).

Die Anreicherung von infektiösem Agens in den lymphatischen Organen BSE-infizierter Schafe erhöht potentiell die Möglichkeit dessen Ausbreitung in der Population (Ersdal et al., 2003). Seine Verteilung im lymphoretikulären System stellt auch für den Konsumenten eine potentielle Gefahr dar, da die peripheren Lymphknoten nur schwierig entfernt werden können, ohne den Schlachtkörper abzuwerten (Bellworthy et al., 2005b). Lezmi et al. (2006) berichteten auch über das Vorhandensein von PrP<sup>Sc</sup> in motorischen Nervenfasern sowie der Skelettmuskulatur von experimentell mit BSE infizierten Schafen. Die Autoren geben zu

bedenken, dass auch dies das mögliche Infektionsrisiko für den Menschen im Hinblick auf die Konsumierung von Schaf- und Lammfleisch erhöht (Lezmi et al., 2006).

### **2.4.3 Einfluss des ovinen PrP-Genotyps auf die BSE-Empfänglichkeit**

Während die Aminosäurevarianten an Position 154 des ovinen Prionproteins keine nachgewiesenen Auswirkungen auf die Inkubations- oder Überlebenszeit nach einer BSE-Infektion haben, beeinflusst der Aminosäurepolymorphismus an Codon 136 die Dauer der Inkubationszeit zu einem geringen Grad. Tritt Valin an dieser Position heterozygot auf, verlängert es die Inkubationszeit seiner Träger im Vergleich zu für Alanin homozygoten Tieren (Goldmann et al., 1994). Der Austausch von Glutamin gegen Arginin an Position 171 des ovinen Prionproteins hat hingegen signifikante Auswirkungen auf die Empfänglichkeit für experimentelle BSE: Glutamin steigert die Empfänglichkeit seiner Träger für BSE, während Arginin deren Resistenz gegen die Erkrankung erhöht (Goldmann et al., 1994, Foster et al., 2001a).

Houston et al. (2003) wiesen nach, dass Schafe des Genotyps ARR/ARR sich intrazerebral mit BSE infizieren lassen. Es konnte jedoch kein PrP<sup>Sc</sup> im lymphatischen Gewebe detektiert werden. Die Autoren halten es daher für unwahrscheinlich, dass Tiere dieses Genotyps das infektiöse Agens ausscheiden und so ihre Umwelt kontaminieren. Gegen orale und intraperitoneale Infektion zeigten sich ARR/ARR-Schafe außerdem resistent, was das Risiko einer natürlichen Infektion dieses Genotyps minimiert (Jeffrey et al., 2001, Lezmi et al., 2006).

Eine bei dem Haplotyp ARQ auftretende Substitution von Prolin gegen Leucin in Codon 168 des ovinen Prionproteins ist mit erhöhter Resistenz gegen experimentelle BSE-Infektion assoziiert (Goldmann et al., 2006). Der von Moum et al. (2005) mit atypischer Scrapie in Zusammenhang gebrachte Aminosäureaustausch von Phenylalanin gegen Leucin an Position 141 spielt für die BSE-Empfänglichkeit keine Rolle (Goldmann et al., 2006). Vaccari et al. (2007) stellten für einen Austausch von Threonin gegen Methionin an Position 137 und einen Austausch von Lysin gegen Asparagin an Position 176 des ovinen Prionproteins zumindest eine partielle Resistenz gegen BSE fest.

## **2.5 Rechtsgrundlagen zur Scrapiebekämpfung beim Schaf**

Die gesetzlichen Grundlagen zur TSE-Überwachung und -Verhütung werden derzeit durch die Verordnung (EG) 999/2001 festgelegt. Diese ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem EG-Mitgliedsstaat.

### **2.5.1 TSE-Überwachungssysteme**

Die Verordnung (EG) 999/2001 schreibt vor, dass die Mitgliedstaaten der Europäischen Gemeinschaft jährlich TSE-Überwachungsprogramme durchführen. Eine bestimmte Mindestanzahl von für den menschlichen Verzehr geschlachteten Schafen aber auch von gefallenen und getöteten Tieren, die sich nach der Stärke der Schafpopulation des jeweiligen Mitgliedsstaates richtet, wird mithilfe von festgelegten Schnelltestverfahren auf das Vorliegen einer TSE untersucht. Die getesteten Tiere müssen mindestens 18 Monate alt sein oder es müssen mehr als zwei bleibende Schneidezähne das Zahnfleisch durchbrochen haben. Bei positivem oder nicht eindeutigem Ergebnis wird das Gehirn entfernt und zur weiteren Untersuchung an das nationale Referenzlabor, im Falle von Deutschland an das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems gesandt. Dort werden Tests zur Bestätigung des positiven Ergebnisses, wie immunhistochemische Nachweisverfahren, Western Blot oder der Nachweis charakteristischer Fibrillen im Elektronenmikroskop durchgeführt. Fällt einer der Bestätigungstests positiv aus, gilt das Tier als scrapiepositiv (Verordnung (EG) 999/2001).

### **2.5.2 Verfütterungsverbot**

Um der Ausbreitung des infektiösen Agens vorzubeugen, ist das Verfüttern tierischer Proteine mit einigen Ausnahmen, wie z.B. Milch und Milcherzeugnisse, an Wiederkäuer nicht gestattet (Verordnung (EG) 999/2001).

### **2.5.3 Spezifizierte Risikomaterialien**

Im Zuge der Schlachtung werden bei allen Schafen und Ziegen über 12 Monate, sowie Tieren, bei denen ein bleibender Schneidezahn das Zahnfleisch durchbrochen hat, der Schädel, einschließlich Gehirn, Augen, Tonsillen und das Rückenmark als spezifizierte Risikomaterialien unmittelbar nach Entfernung aus dem Tierkörper gekennzeichnet und nach den Vorgaben der Verordnung (EG) 1774/2002 beseitigt (Verordnung (EG) 999/2001).

### **2.5.4 Zuchtprogramme**

Jeder EG-Mitgliedsstaat hat eine repräsentative Stichprobe seiner gesamten Schafpopulation im Hinblick auf die Codons 136, 141, 154 und 171 zu genotypisieren. Weiterhin können die Mitgliedsstaaten Zuchtprogramme einführen, um auf TSE-Resistenz zu selektieren (Verordnung (EG) 999/2001).

In Deutschland legte bislang die aufgrund der EG-Entscheidung 2003/100/EG erlassene TSE-Resistenzzuchtverordnung die Mindestanforderungen an die Züchtung auf Scrapieresistenz

bei Schafen fest. Mit der Verordnung (EG) 727/2007 vom 26. Juni 2007 wurde die EG-Entscheidung 2003/100/EG außer Kraft gesetzt und folgende Mindestanforderungen an Zuchtprogramme für Schafe auf TSE-Resistenz in der Verordnung (EG) 999/2001 zugrunde gelegt:

Die Zuchtprogramme konzentrieren sich ausschließlich auf Herden mit hohem genetischem Wert. Es sind jedoch stets die Seltenheit der betreffenden Rasse und die Frequenz des ARR-Haplotypen in der Population zu berücksichtigen. Inzucht oder genetische Drift ist zu vermeiden (Verordnung (EG) 999/2001).

Das Zuchtziel besteht darin, die Häufigkeit des ARR-Allels zu erhöhen und die für Scrapie empfänglichen Allele aus der Population zu eliminieren. Dafür müssen die Tiere einzeln identifizierbar sein. Alle Böcke aus der betreffenden Herde müssen genotypisiert und Träger des VRQ-Haplotypen innerhalb von 6 Monaten geschlachtet oder kastriert werden. Männliche und weibliche Tiere mit VRQ-Allel dürfen den Betrieb nur zur Schlachtung verlassen. Zum Schutz von Rasse- und Produktionsmerkmalen können Ausnahmen von diesen Bestimmungen beschlossen werden (Verordnung (EG) 999/2001).

Die TSE-Resistenz wird anerkannt, wenn sich in dem betreffenden Betrieb nur ARR-homozygote Schafe befinden (Stufe I) oder wenn die gesamte Nachkommenschaft des Betriebes von Böcken abstammt, die Träger des Genotyps ARR/ARR sind (Stufe II). Aus den als TSE-resistent anerkannten Herden werden regelmäßig nach dem Zufallsprinzip Proben zwecks Genotypisierung entnommen. Zusätzlich werden über 18 Monate alte Tiere stichprobenartig auf das Vorliegen einer TSE untersucht (Verordnung (EG) 999/2001).

### **2.5.5 Maßnahmen im Seuchenfall**

Bei Auftreten eines TSE-Falles muss von jedem positiven Schaf der Prionproteingenotyp (Codons 136, 154, 171) bestimmt werden. Jeder Fall bei ARR/ARR homozygoten Tieren muss unverzüglich der Europäischen Kommission gemeldet werden. Liegt ein Fall von atypischer Scrapie vor, so ist zusätzlich der Genotyp an Codon 141 des ovinen Prionproteins zu bestimmen (Verordnung (EG) 999/2001).

Mit den Herdenmitgliedern bzw. allen übrigen Tieren des Haltungsbetriebes, aus dem das TSE-positive Tier stammt, wird wie folgt verfahren:

Kann ein BSE-Fall bei dem positiven Tier nicht ausgeschlossen werden, so ist die gesamte Herde zu töten und unschädlich zu beseitigen (Verordnung (EG) 999/2001).

Liegt ein Fall von klassischer Scrapie vor, können Zuchtböcke, die homozygot für das ARR-Allel sind, und weibliche Zuchttiere mit mindestens einem ARR-Allel aber keinem VRQ-Allel in der Herde verbleiben. Auch Schlachtschafe, die mindestens ein ARR-Allel tragen

oder unter 3 Monate alt sind, müssen nicht getötet und unschädlich beseitigt werden. Von der Tötung aller übrigen Tiere kann unter anderem jedoch abgesehen werden, wenn das ARR-Allel selten in der Zucht oder der Herde selbst vorkommt oder die fraglichen Tiere zur Vermeidung von Inzucht benötigt werden. In die betroffenen Betriebe dürfen für einen definierten Zeitraum nur Schafböcke mit dem Genotyp ARR/ARR und weibliche Schafe mit mindestens einem ARR-Allel aber keinem VRQ-Allel verbracht werden (Verordnung (EG) 999/2001).

Bei Auftreten eines atypischen Scrapiefalles kann der betreffende Betrieb anstelle einer Keulung der gesamten Herde auch zwei Jahre unter verstärkte TSE-Überwachung gestellt werden. Alle Schafe und Ziegen müssen identifiziert werden und alle über 18 Monate alte Tiere, die zum menschlichen Verzehr geschlachtet werden, im Betrieb verenden oder getötet werden, müssen auf das Vorliegen einer TSE getestet werden (Verordnung (EG) 999/2001).

Den Mitgliedsstaaten steht es frei, alle Tiere, die beim Auftreten eines Scrapiefalles (klassisch und atypisch) zur Tötung und unschädlichen Beseitigung bestimmt sind, stattdessen der Schlachtung zuzuführen, sofern über 18 Monate alte Tiere und Tiere, bei denen zwei bleibende Schneidezähne das Zahnfleisch durchbrochen haben auf das Vorliegen einer TSE getestet werden (Verordnung (EG) 999/2001).

Beim Auftreten von Scrapie oder BSE ist der Prionproteingentyp von mindestens 50 Schafen, die beseitigt, getötet oder geschlachtet werden, zu bestimmen (Verordnung (EG) 999/2001).

## **2.6 Einflussnahme anderer Genorte auf die TSE-Resistenz**

Schon lange ist bekannt, dass Polymorphismen im Prionproteingen die Resistenz gegenüber TSE beeinflussen (Prusiner, 1991b). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich auch andere Genorte bei Prionenerkrankungen auf die Länge der Inkubationszeit auswirken (Bruce & Dickinson, 1985, Carlson et al., 1988). So wurden in verschiedenen Studien bei experimentell infizierten Mäusen *Quantitative Trait Loci* (QTL) gefunden, die die Länge der Inkubationszeit beeinflussen (Tabelle 3). Des Weiteren wurde in einigen Studien ein Einfluss des Geschlechts auf die Inkubationszeit festgestellt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: QTL-Analysen für TSE-Empfänglichkeit bei der Maus. Der jeweiligen Studie sind das zur Inokulation verwendete TSE-Isolat und die chromosomale Lokalisation der detektierten QTL zugeordnet. Weiterhin werden beschriebene Geschlechtseffekte (♂/♀-Effekt) aufgeführt.**

| Studie                   | TSE-Isolat                 | ♂/♀-Effekt | QTL auf Chromosomen  |
|--------------------------|----------------------------|------------|----------------------|
| Stephenson et al. (2000) | Chandler-Scrapieisolat     | -          | 7, 9, 10, 11, 18, 19 |
| Lloyd et al. (2001)      | Chandler/RML-Scrapieisolat | -          | 2, 6, 7, 11, 12      |
| Manolakou et al. (2001)  | BSE-Isolat                 | +          | 2, 4, 8, 15          |
| Lloyd et al. (2002)      | BSE-Isolat                 | -          | 2, 11                |
| Moreno et al. (2002)     | C506M3-Scrapieisolat       | +          | 4, 5, 6, 7, 8, 17    |
| Moreno et al. (2003)     | ME7-Scrapieisolat          | +          | 4, 5, 6, 7, 8, 17    |

In zahlreichen Studien wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen scrapieinfizierten Mäusen und Kontrolltieren sowie auch zwischen mit unterschiedlichen Scrapieisolaten infizierten Mäusen festgestellt (Tabelle 4). Auch dieses spricht dafür, dass weitere Gene die Pathogenese der Scrapie beeinflussen.

### 2.6.1 QTL für TSE-Resistenz auf Mauschromosomen 9 und 2

Die Ergebnisse folgender Studien machen das ovine Chromosom 15 für Assoziationsstudien im Hinblick auf Scrapieresistenz interessant: Stephenson et al. (2000) detektierten einen QTL für Scrapieresistenz bei der Maus auf Chromosom 9, dessen LOD-Score seinen Peak im Intervall zwischen den Markern *D9Mit91* und *D9Mit25* hatte. In diesem Chromosomenabschnitt liegen bei der Maus die Gene *Zink Finger and BTB Domain containing 16* (*Zbtb16*), *Heat Shock Protein 8* (*Hspa8*) und *Burkitt lymphoma receptor 1* (*Blr1*) (Mouse Genome Database, 01/2008). Diese drei Gene sind beim Rind auf Chromosom 15 lokalisiert (GenBank Nrn.: 534401, 281831 und 497021).

**Tabelle 4: Überblick über einige Expressionsstudien, die die Genexpression in Gehirnen von scrapieinfizierten Mäusen untersuchten. Die Anzahl (n) der detektierten Gene, die sich deutlich in ihrer Expression zwischen scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren oder zwischen den mit unterschiedlichen Scrapieisolaten infizierten Tieren unterschieden, ist wie auch die zur Infektion der Versuchstiere verwendeten Scrapieisolate aufgeführt.**

| Studie                    | Scrapieisolat          | Vergleich von                                            | Gene (n)                                  |
|---------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Dandoy-Dron et al. (1998) | C506M3                 | scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren             | 8 <sup>a</sup>                            |
| Booth et al. (2004a)      | ME7, 79A, 22A          | mit unterschiedlichen Scrapieisolaten infizierten Tieren | 114 <sup>b</sup>                          |
| Booth et al. (2004b)      | ME7, 79A               | scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren             | 158 <sup>K,a</sup><br>41 <sup>P,a</sup>   |
| Rierner et al. (2004)     | 139A                   | scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren             | 114 <sup>a</sup>                          |
| Skinner et al. (2006)     | ME7, 22L, Chandler/RML | scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren             | > 400 <sup>K,a</sup><br>22 <sup>P,a</sup> |
| Xiang et al. (2004)       | ME7, RML               | scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren             | 121 <sup>a</sup>                          |

<sup>P</sup> Expression wurde in der präklinischen Phase der Scrapie analysiert, <sup>K</sup> Expression wurde in der klinischen Phase der Scrapie analysiert, <sup>a</sup> Gene unterschieden sich deutlich in ihrer Expression zwischen scrapieinfizierten Tieren und Kontrolltieren, <sup>b</sup> Gene unterschieden sich deutlich in ihrer Expression zwischen den mit unterschiedlichen Scrapieisolaten infizierten Tieren

Weiterhin identifizierten Lloyd et al. (2002) durch Composite Intervall Mapping drei QTL für BSE-Resistenz im Abstand von höchstens 10 cM zueinander auf Mauschromosom 2. Einer davon liegt in der Nähe des Markers *D2Mit304*. Im Intervall Mapping wiesen sowohl der Marker *D2Mit304* als auch der benachbarte Marker *D2Mit274* signifikante LOD-Scores auf. Zwischen diesen beiden Markern liegen bei der Maus die Gene *Catalase (CAT)*, *Follicle Stimulating Hormone, beta (FSHB)* und *Potassium Voltage-gated Channel, Shaker-related Subfamily, Member 4 (KCNA4)* (Mouse Genome Database, 01/2008). Auch diese Gene sind beim Rind auf Chromosom 15 lokalisiert (GenBank Nrn.: 531682, 281171 und 281880).

Rinderchromosom 15 ist homolog zu Schafchromosom 15 (Vergleich SheepMap 4.7 BP SA, Cattle 3 – Ihara et al. (2004) (Sheep Comparative Maps, 01/2008)).

## 2.6.2 QTL für TSE-Resistenz auf Mauschromosom 7

Die Ergebnisse von Moreno et al. (2003) machen den distalen Teil des ovinen Chromosoms 14 für Assoziationsstudien im Hinblick auf Scrapieresistenz interessant: Die Autoren detektierten bei der Maus einen QTL für Scrapieresistenz auf dem proximalen Teil von Chromosom 7, in dem die beiden Marker *D7Mit76* und *D7Mit246* lokalisiert sind. Dieser

Bereich auf Mauschromosom 7 (Mouse Genome Database, 01/2008) ist homolog zu dem distalen Teil des bovinen Chromosoms 18 (Goldammer et al., 2002). Der distale Teil von Rinderchromosom 18 wiederum ist homolog zum distalen Teil von Schafchromosom 14 (Vergleich SheepMap 4.7 BP SA, Cattle 3 – Ihara et al. (2004) (Sheep Comparative Maps, 01/2008)).

### **2.6.3 Mikrosatelliten**

Mikrosatelliten sind Wiederholungen von 1 – 6 bp langen Nukleotidmotiven und werden auch als simple sequence repeats (SSR) bezeichnet. 48 – 67% aller SSRs in vielen Spezies sind Dinukleotidrepeats. Bei Primaten herrschen jedoch poly-A/T-Sequenzen vor. Im Gegensatz zu Di- und Tetranukleotidrepeats kommen Triplet-SSRs häufiger in kodierenden als in nicht kodierenden Regionen des Genoms vor. Ihre Mutationsrate ist mit  $10^{-2}$  –  $10^{-6}$  Ereignissen pro Genlokus pro Generation im Vergleich zur Rate der Punktmutationen in kodierenden Genbereichen sehr hoch. DNA-Slippage während der DNA-Replikation und Rekombination zwischen DNA-Strängen (ungleiches Crossing over, Genkonversion) stellen zentrale Mechanismen in der Entstehung solcher Mutationen dar. Obwohl der Mutationsprozess deutlich von verschiedenen Faktoren wie Spezies, Repeat-Typ, Alter und Geschlecht beeinflusst wird, manifestiert sich die SSR-Instabilität vorwiegend in einer veränderten Anzahl der Repeats (Li et al., 2002, Li et al., 2004).

Mikrosatelliten haben Effekte auf die Chromatinorganisation, die Regulation des DNA-Metabolismus (Rekombination, DNA-Replikation, Zell-Zyklus, Mismatch repair system) und die Regulierung von Genaktivierung (Transskription, Translation, Binding protein) und sind deswegen nicht als evolutionsbiologisch neutral einzustufen. Die genomische Verteilung von Mikrosatelliten erstreckt sich nicht zufällig über Protein kodierende Sequenzen, UTRs und Introns. SSR-Mutationen in diesen Regionen können einen Frameshift, Schwankungen in der Genexpression, eine Inaktivierung eines Gens oder sogar Funktionsänderungen eines Gens hervorrufen (Li et al., 2002, Li et al., 2004).

SSRs sind wegen ihres hohen Polymorphiegrades hochgradig informativ und können meistens in einer Polymerase-Kettenreaktion nach einem Standardprogramm amplifiziert werden (Schlötterer, 2004). Durch Multiplex-PCR oder Multiloading kann so eine Vielzahl von Genorten effektiv und kostengünstig typisiert werden (Peter, 2005).

Die Verwendung von Mikrosatelliten in indirekten Gentests für Erbkrankheiten, bei denen das ursächliche Gen noch nicht identifiziert worden ist, ist gängig. Beispiele hierfür sind Erbkrankheiten wie die Bovine Progressive Degenerative Myeloenzephalopathie („Weaver“-Syndrom) oder die Spinale Dysmyelinisierung, die bei Brown-Swiss-Rindern und deren

Kreuzungstieren auftreten (Gentile & Testoni, 2006). Auch für die bei dieser Rasse auftretende Spinale Muskelatrophie, für die das ursächliche Gen kürzlich identifiziert wurde (Krebs et al., 2007), war zuvor ein markergestützter Test entwickelt worden (Gentile & Testoni, 2006).

## **2.7 Kandidatengene für Scrapieresistenz**

### **2.7.1 Cathepsine B und D**

Sowohl *in vivo* (Safar et al., 2005) als auch *in vitro* (Enari et al., 2001, Peretz et al., 2001) wird PrP<sup>Sc</sup> nicht nur gebildet, sondern wie auch PrP<sup>C</sup> wieder abgebaut. Der genaue Mechanismus der Beseitigung von PrP<sup>Sc</sup> aus dem Gehirn ist unbekannt. Caughey et al. (1991) und Taraboulos (1992) vermuteten, dass PrP<sup>Sc</sup> in Lysosomen überführt und durch lysosomale Proteasen am N-Terminus geschnitten wird. Für einen möglichen Einfluss des endosomalen / lysosomalen Systems auf die Pathogenese von TSE sprechen die Beobachtungen von Supattapone et al. (1999, 2001), die feststellten, dass PrP<sup>Sc</sup> durch verzweigte Polyamine aus scrapieinfizierten Neuroblastomzellen eliminiert werden konnte. Diese benötigten nämlich *in vitro* einen sauren pH-Wert, um die Proteaseresistenz von PrP<sup>Sc</sup> herabzusetzen und akkumulierten außerdem in den Lysosomen lebender Zellen. Die Autoren leiteten daraus die Möglichkeit ab, dass lysosomale Proteasen normalerweise PrP<sup>Sc</sup> in prioneninfizierten Zellen mit einem geringen Durchsatz abbauen und dass dieser Vorgang durch verzweigte Polyamine beschleunigt werden kann. Die beiden Proteasen Cathepsin B und Cathepsin D, die neben einer Vielzahl von hydrolysierenden Enzymen in Lysosomen enthalten sind (Ishidoh & Kominami, 2002), könnten in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

#### **2.7.1.1 Cathepsin B**

Erste Hinweise auf eine Beteiligung der Cysteinprotease Cathepsin B (CTSB) in der Pathogenese von TSE geben die von Arnold et al. (1995) durchgeführten Untersuchungen an Gehirnen von scrapieinfizierten Mäusen: Die Autoren stellten fest, dass PrP<sup>Sc</sup> in späten Endosomen, den Vorläufern von Lysosomen, akkumuliert, und dort gleichzeitig eine Aktivität von CTSB zu detektieren war.

Diese These wurde bekräftigt durch Luhr et al. (2004b), die berichteten, dass der Abbau von PrP<sup>Sc</sup> in mit Scrapie infizierten Nervenzellen vornehmlich durch Cysteinproteasen bei einem sauren pH-Wert stattfindet, woraus die Autoren ebenfalls auf eine Degradierung von PrP<sup>Sc</sup> in endosomalen / lysosomalen Kompartimenten schlossen. Eine mögliche Involvierung von CTSB in den PrP<sup>Sc</sup>-Abbau wurde in einer anderen Studie der Autoren bestätigt, in der der

Einsatz eines selektiven Cathepsin B-Hemmers den PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt von scrapieinfizierten Nervenzellen deutlich erhöhte (Luhr et al., 2004a).

Es gibt Hinweise darauf, dass im Verlauf einer Scrapieinfektion vermehrt CTSB nachgefragt wird: So konnten mehrere Arbeitsgruppen eine erhöhte Expression von CTSB in mit Scrapie infizierten Mäusegehirnen feststellen (Booth et al., 2004b, Xiang et al., 2004, Skinner et al., 2006). Zusätzlich wurde in neuronalen Zellen nach der Infektion mit Scrapieprionen ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität von CTSB detektiert (Zhang et al., 2003).

Zusätzlich scheint CTSB im Zusammenhang mit Apoptose und der Aktivierung von Mikroglia, welches charakteristische Merkmale der Pathologie von TSE sind (Giese et al., 1995, Betmouni et al., 1996), von Bedeutung zu sein: In einer neuronalen Zellkultur konnte Apoptose durch aus aktivierten Mikroglia gewonnenes Medium induziert werden, was auf die Wirkung von CTSB zurückzuführen war. Noch schneller ließ sich dieser Effekt durch CTSB in Reinform erzielen (Kingham & Pocock, 2001). Somit ist *CTSB* auch von seiner proapoptotischen Wirkungsweise her gesehen als Kandidatengen für Scrapieresistenz zu begreifen.

Im Bezug auf andere neurodegenerative Erkrankungen, wie die Alzheimersche Erkrankung (AD), liegen widersprüchliche Ergebnisse über die Wirkung von CTSB vor: Gan et al. (2004) konnten zeigen, dass durch Amyloid  $\beta$ , welchem im Rahmen der AD eine ähnliche Funktion zukommt wie PrP<sup>Sc</sup> im Rahmen von TSE, aktivierte Makrophagen CTSB absondern, was in der Folge zu neurotoxischen Effekten auf primäre Neuronen führt. Müller-Steiner et al. (2006) stellten hingegen einen neuroprotektiven und antiamyloidogenen Effekt des CTSB im Rahmen der AD fest. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, dass eine verminderte CTSB-Aktivität sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirkt, während eine Aktivitätssteigerung der Neuropathologie jedoch entgegenwirken könnte. Die AD ist wie auch Prionenerkrankungen durch die Ablagerung unlöslicher Proteinkomplexe und Neurodegeneration gekennzeichnet (DeArmond, 1993). Aufgrund dessen stärken die Ergebnisse aus den eben genannten Studien die Rolle von *CTSB* als Kandidatengen für Scrapieempfindlichkeit beim Schaf.

### **2.7.1.2 Cathepsin D**

Bei sCJD-Patienten konnte die Involvierung des ELS auch in Zusammenhang mit der lysosomalen Aspartatproteinase CTSD beobachtet werden: In den Gehirnen von Erkrankten war CTSD vorwiegend in den Lysosomen lokalisiert und zeigte eine herdförmige Kollokalisierung mit intra- und perineuralen PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen. In Pyramidenzellen der Großhirnrinde und Purkinjezellen der Kleinhirnrinde von sCJD-Fällen, die ein hohes Maß von

Gewebezerstörung aufwiesen, war der Volumenanteil von CTSD signifikant höher als dieses bei sCJD-Fällen mit einem geringen Maß an zerstörtem Gewebe der Fall war. Der Verlust an Neuronen sowie die Dichte der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen waren positiv mit dem Volumenanteil von CTSD korreliert (Kovacs et al., 2007). Dies deutet auf eine Rolle des CTSD im PrP<sup>Sc</sup>-Stoffwechsel hin. Das Enzym CTSD ist in der Lage, ein kurzes Stück am C-Terminus des Prionproteins zu entfernen, an dem der GPI-Anker angeheftet ist (Lewis et al., 2006). Weitere Hinweise für eine Beteiligung des CTSD an der Pathogenese der Scrapie geben zahlreiche Expressionsstudien: Xiang et al. (2004) konnten in mit unterschiedlichen Scrapiestämmen infizierten Mäusegehirnen eine vermehrte Expression von CTSD beobachten. Die erhöhte Expression stand dabei in zeitlichem Zusammenhang mit dem Beginn der PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation und der Aktivierung der Mikroglia. Brown et al. (2004) identifizierten im Scrapiemausmodell eine gesteigerte Expression von CTSD in einem Zeitraum vor Einsetzen der klinischen Symptomatik, für den bekannt ist, dass 50% der Neuronen der CA1-Region des Hippocampus zugrunde gehen. Diedrich et al. (1991a, 1991b) konnten einen Monat nach Einsetzen der Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in Astrozyten von scrapieinfizierten Mäusen auch dort eine vermehrte Expression von CTSD detektieren. Riemer et al. (2004) stellten eine Steigerung der CTSD-Expression zu einem relativ späten Zeitpunkt bei Mäusen im Verlauf einer Scrapieinfektion fest. Die Autoren halten es für wahrscheinlich, dass dieses die weitere Aktivierung und Differenzierung von Gliazellen widerspiegelt.

Auch im Zusammenhang mit dem bei Scrapie auftretenden neuronalen Zellverlust (Bulgin & Melson, 2007) ist CTSD interessant: In einer Studie von Kim et al. (2007) kam CTSD in der Zellkultur eine zentrale Rolle als Mediator des neurotoxischen Effektes von aktivierten Mikroglia zu. Die Neurotoxizität schien unabhängig von der proteolytischen Aktivität des CTSD zu sein. Weiterhin stellten McLaughlin et al. (2006) fest, dass die toxische Wirkung von stimulierten Mikroglia, die aus der Mauslinie C57BL/6 isoliert worden waren, auf neuronale Zellen zweimal größer war als die von stimulierten Mikroglia, die aus Gehirnen von SWR/J-Mäusen stammten und in denen die Menge an CTSD über 50% geringer war als in den Mikroglia der Mauslinie C57BL/6. Dies deutet ebenfalls auf die neurotoxische Wirkung von mikroglialem CTSD hin. Zusätzlich zu seinen funktionellen Attributen spricht auch die Lage von *CTSD* in einem QTL für Scrapieresistenz bei der Maus auf Chromosom 7 (Moreno et al., 2003) für die Auswahl als Kandidatengen für Scrapieempfindlichkeit beim Schaf.

### 2.7.2 Calpain 2

Calpaine sind nichtlysosomale intrazelluläre Cysteinproteasen. Zu ihrer Gruppe gehören die beiden ubiquitären Enzyme Calpain 1 ( $\mu$ -Calpain) und Calpain 2 (m-Calpain). Das Calpain 2 ist ein Heterodimer, das sich aus einer 80 kDa schweren katalytischen Untereinheit, die von dem Gen *Calpain, Large Polypeptide L2 (CAPN2)* kodiert wird, und einer kleineren 28 kDa schweren regulatorischen Untereinheit, die es mit dem Calpain 1 gemein hat, zusammensetzt (Goll et al., 2003). Die katalytische Untereinheit wiederum besteht aus vier Domänen (I – IV) mit unterschiedlichen Funktionen. Domäne II umfasst zwei Subdomänen (IIa und IIb), die für die katalytische Aktivität zuständig sind (Wu et al., 2007).

Calpaine spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Umformung des Zytoskeletts, bei der Zelldifferenzierung, Apoptose, Nekrose, in der Embryonalentwicklung und bei der Langzeit-Potenzierung an Synapsen von Nervenzellen (Wu et al., 2007). In der Pathogenese von Morbus Alzheimer gibt es Hinweise darauf, dass Calpain 2 in die Neurodegeneration involviert ist (Grynspan et al., 1997, Tsuji et al., 1998). Auch mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Down Syndrom, kortikobasale Degeneration, progressive supranukleäre Lähmung und Lewy-Body-Demenz ist aktiviertes Calpain 2 in Verbindung gebracht worden (Adamec et al., 2002). Wie die oben erwähnten Krankheiten gehen auch Prionenerkrankungen mit einer pathologischen Ablagerung von Proteinmaterial im ZNS einher (Prusiner, 1998).

Untersuchungen von Yadavalli et al. (2004) weisen darauf hin, dass die endoproteolytische Spaltung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  von Calpainen abhängt und einen wichtigen Schritt bei der  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Formation und -Vermehrung darstellt: Im gesunden Gehirn des Menschen ist ein 17 kDa schweres C-terminales Fragment des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zu finden, das durch Spaltung an AS-Position 110/111 entsteht und als C1 bezeichnet wird (Chen et al., 1995). In Gehirnen von Creutzfeldt-Jakob Erkrankten hingegen wird ein Proteinase K-resistentes Fragment des Prionproteins produziert, anscheinend das Resultat einer Spaltung an der Position, an der  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  auch durch Proteinase K geschnitten wird. Dieses 21 kDa schwere Fragment wird als C2 bezeichnet und hat offenbar dieselbe molekulare Masse wie unglykosyliertes  $\text{PrP}$ -(27 – 30), der proteaseresistente Kern des  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Chen et al., 1995, Yadavalli et al., 2004). Yadavalli et al. (2004) leiteten aus der Behandlung von prioneninfizierten Zellen mit zellulären Proteaseinhibitoren ab, dass die Produktion von C2 durch Calpaine vermittelt wird: In scrapieinfizierten Mäusegehirnzellen (SMB-Zellen) wurde die Produktion von C2 durch verschiedene Calpaininhibitoren gehemmt. Die Wirkung des Calpain Inhibitors IV war am effektivsten und resultierte in einer scheinbar kompletten Eliminierung von C2. Der C1-Gehalt erhöhte sich auf ein für gesunde Zellen charakteristisches Maß. Die Autoren

interpretierten dieses Phänomen als eine konformationsabhängige Verschiebung von PrP<sup>Sc</sup>- zu vorherrschend PrP<sup>C</sup>-Bildung. Der Inhibitor Calpain IV führt zu einer irreversiblen Hemmung von Calpain 2 und Cathepsin L (Angliker et al., 1992), die somit ursächlich für die Produktion von C2 infrage kommen. Eine Involvierung von Cathepsin L wurde von Yadavalli et al. (2004) in ihrer Studie jedoch ausgeschlossen. Weiterhin hatte die Behandlung der infizierten Zellen mit den Calpaininhibitoren MDL28170 und Calpeptin ebenfalls eine signifikante Reduktion von C2 bei niedrigeren C1-Gehalten zur Folge (Yadavalli et al., 2004).

Während Calpain Inhibitoren in der Studie von Yadavalli et al. (2004) die Produktion von C2 hemmten, hatten Ionophoren, welche den intrazellulären Calciumgehalt der SMB-Zellen erhöhten und gleichzeitig die Calpainaktivität steigerten, den gegensätzlichen Effekt: Die Behandlung von SMB-Zellen mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin stimulierte die durch Calpain vermittelte Spaltung von PrP bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 2 mM, was in einem dosisabhängigen Anstieg von C2 und einer damit einhergehenden Reduktion des Gehaltes an ungeschnittenem PrP resultierte (Yadavalli et al., 2004). Auch dieses deutet auf eine Beteiligung des Calpain 2 hin, da dieses *in vitro* die Hälfte seiner maximalen Enzymaktivität bei einer Calciumkonzentration von 0,4 – 0,8 mM erreicht, wovon sich auch die Bezeichnung m-Calpain ableitet (Goll et al., 2003). Funktionell erklärt sich das so, dass in Abwesenheit von Calcium die beiden Subdomänen IIa und IIb der katalytischen Untereinheit durch eine tiefe Kluft geteilt sind, was das aktive Zentrum des Enzyms in eine strukturelle Konformation versetzt, die eine Substrathydrolyse nicht zulässt. Bindet Calcium jedoch an die katalytische Untereinheit, findet eine Konformationsänderung statt, was in einem funktionstüchtigen aktiven Zentrum der Cysteinprotease resultiert (Wu et al., 2007).

Veränderungen in der Calciumhomöostase spielen im Hinblick auf transmissible spongiforme Enzephalopathien unter anderem auch im Zusammenhang mit neuronalem Zelltod eine Rolle (Kristensson et al., 1993, Ferreira et al., 2006): In einem Modellversuch wurde gezeigt, dass PrP-(106 – 126), ein synthetisches Peptidhomolog zu PrP<sup>Sc</sup>, in kortikalen Neuronen zu einer Deregulierung der Calciumhomöostase führte. Schon 24 h nach Inkubation mit dem PrP<sup>Sc</sup>-Homolog erhöhte sich der intrazelluläre Calciumgehalt, was über die Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung von Caspasen den apoptotischen Zelltod nach sich zog (Ferreiro et al., 2006). Diese Veränderungen im Calciumhaushalt könnten also durch eine Aktivierung von CAPN2 den Prionproteinstoffwechsel beeinträchtigen. CAPN2 kann in diesem Zusammenhang aber auch für den nach dem intrazellulären Calciumanstieg eintreffenden Zelltod mitverantwortlich sein: O'Donovan et al. (2001) postulierten, dass PrP-(106 – 126) den apoptotischen Zelltod von Neuronen nach einer initialen Calciumfreisetzung

aus den Mitochondrien zum einen durch die Aktivierung von Caspasen zum anderen durch die Aktivierung von Calpainen auslöste. Weiterhin stellten Lopes et al. (2007) in Neuronen, die mit PrP-(106 – 126) behandelt worden waren, eine signifikant höhere Calpainaktivität fest als in Kontrollzellen. Sie konnten zeigen, dass der Calpaininhibitor MDL28170 die durch das Peptidhomolog hervorgerufene Calpainaktivität deutlich hemmte und den neuronalen Zelltod signifikant reduzierte. *CAPN2* ist also zum einen wegen seines möglichen Einflusses auf die PrP<sup>Sc</sup>-Formation und -Vermehrung zum anderen wegen seines potentiellen Mitwirkens am neuronalen Zelltod im Verlauf einer Scrapieerkrankung ein Kandidatengen für Scrapieempfindlichkeit beim Schaf.

### 2.7.3 Kallikrein 1

Im Rahmen der unter 2.6.2 erwähnten Studie vermuteten Moreno et al. (2003) bei der Maus einen weiteren QTL für Scrapieresistenz auf Chromosom 7, in welchem sich die beiden *Kallikreine* *KLK1b3* und *K1b4* (bzw. *Nerve Growth Factor α* und *Nerve Growth Factor γ*) befinden. Sie sind zwei von 24 Paralogen des humanen *Kallikrein 1* (*KLK1*), das auch als *Glandular Kallikrein 1* oder *Tissue Kallikrein* bezeichnet wird (Olsson & Lundwall, 2002).

Kallikrein 1 ist eine Serinprotease, die Kinin (Bradykinin) aus Kininogen freisetzt. Auf diesem Weg wirkt es auf das kardiovaskuläre System, die renale Natriumexkretion, Zellproliferation und Schmerzproduktion ein (Bhoola et al., 1992). Es ist aber auch im Gehirn weit verbreitet und wurde in Neuronen von Rattengehirnen nachgewiesen: Bei Feten war es in den Zellkernen zu finden, nach der Geburt aber auch im Zytoplasma. Mit zunehmendem Alter verschob sich die Lokalisation immer mehr in Richtung Zellkörper. Bei adulten Ratten wurde Kallikrein 1 schließlich auch in den Fortsätzen der Nervenzellen detektiert (Iwadata et al., 2000).

Ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen Scrapie und der Serinprotease Kallikrein 1 ergibt sich folgendermaßen: In scrapieinfizierten Neuroblastomzellen wurde gegenüber nicht infizierten Kontrollen eine viermal höhere Expression des Insulin-Like Growth Factor-1 Rezeptors (IGF1R) festgestellt (Östlund et al., 2001). Der an diesen Rezeptor bindende Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF1) wirkt unter anderem als neuroprotektiver Überlebensfaktor bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen (u.a. Alzheimersche Krankheit) (Doré et al., 1997). Seine Affinität zum IGF1R war in der Studie von Östlund et al. (2001) jedoch vermindert und es wurde eine um 80% geringere Anzahl an Bindungsstellen für IGF1 am Rezeptor detektiert. Die Autoren nahmen daher an, dass eine Scrapieinfektion die proliferative Zellantwort auf IGF1 inhibiert, indem die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor verhindert wird.

In diesem Zusammenhang könnten Insulin-Like Growth Factor Binding Proteine (IGFBP-1-6) eine Rolle spielen, da diese die Bioaktivität von IGFs verändern, indem sie deren Zugang zu den entsprechenden Rezeptoren kontrollieren: Das Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5 (IGFBP-5) hemmt die wachstumsstimulierende Wirkung von IGF1 (Hou et al., 2005). Hou et al. (2005) wiesen jedoch nach, dass nach Zugabe einer Serinprotease, die zur Spaltung von IGFBP-5 führt, IGF1 freigesetzt wurde, welches nun an seinen Rezeptor binden konnte und die Mitogenese aktivierte. Weiterhin deuten die Ergebnisse von Iwadata et al. (2003) darauf hin, dass die Serinprotease KLK1 über die Prozessierung von IGFBP-5 bei der Regulierung von IGF1 mitwirkt: Die Autoren untersuchten immunhistochemisch die Verbreitung von KLK1 und IGFBP-5 in Rattengehirnen und stellten eine Kolo-kalisation beider Proteine in Neuronen fest. Sie beobachteten ebenfalls, dass KLK1 IGFBP-5 in vitro hydrolysierte. Deshalb postulieren die Autoren, dass KLK1 eine potentielle Rolle bei der Regulation der Vorgänge von IGFBP-5 und IGF im Gehirn der Ratte spielt. Im Zusammenhang mit der Studie von Östlund et al. (2001) gesehen, könnte KLK1 somit über die Regulierung von IGFBP-5 und IGF auch die Schwere des Verlaufs einer Scrapieerkrankung beeinflussen.

Dies wird von den Beobachtungen von Kizuki et al. (2006, 2007) unterstützt, die über einen hervorstechenden wachstumsstimulierenden Effekt von Kallikrein 1 auf neurale Stammzellen aus pränatalen Rattengehirnen berichteten: Dieser wachstumsfördernde Effekt konnte durch die Zugabe von Antiserum gegen KLK1 gehemmt werden, nicht aber durch die Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors, weshalb die Autoren annehmen, dass die durch KLK1 vermittelte Freisetzung von Kinin nicht in diesen Vorgang involviert ist. KLK1 besitzt allerdings auch einen durch die Aktivierung des B<sub>2</sub>-Rezeptors vermittelten protektiven Effekt gegen durch ischämische Infarzierung hervorgerufene Schäden im Zusammenhang mit Schlaganfällen, indem es die Apoptose und Entzündung hemmt und die Angio- und Neurogenese fördert (Chao & Chao, 2006, Xia et al., 2006). Auch aus diesem Grund stellt Kallikrein 1 ein Kandidatengen für Scrapieempfindlichkeit beim Schaf dar.

#### **2.7.4 Transforming Growth Factor, $\beta$ 1**

Transforming Growth Factor,  $\beta$ 1 (TGFB1) ist der Prototyp einer Superfamilie von Wachstums-, Differenzierungs- und Morphogenesefaktoren (Massague, 1990). TGFB1 ist ein sehr vielseitiges Protein, zu dessen Aufgaben die Modulation von Zellwachstum (Massague, 1990) und Immunabwehr (Letterio & Roberts, 1998) gehören. In Gehirnen scrapieinfizierter Mäuse war TGFB1 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gegenüber den gesunden

Kontrollen deutlich erhöht (Cunningham et al., 2002). Auch in experimentellen Tiermodellen für CJD konnte eine erhöhte Expression von TGFB1 beobachtet werden (Baker et al., 1999). Weiterhin ist die Scrapieinfektion bei Mäusen entgegen dem im Zusammenhang mit Prionenerkrankungen beschriebenen Fehlen von Entzündungsanzeichen (Prusiner, 1995) durch die Aktivierung von Mikroglia und die Rekrutierung von T-Lymphozyten charakterisiert (Betmouni et al., 1996, Walsh et al., 2001). Die Aktivierung von Mikroglia durch einen neurodegenerativen Stimulus erhöht die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 und -6 (IL-1 & IL-6) sowie Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Zusätzlich setzen die aktivierten Zellen freie Radikale, wie Superoxid und Stickstoffmonoxid (NO), Produkte von NADPH Oxidase bzw. induzierbarer NO-Synthase (iNOS), frei (Dheen et al., 2007). In mit Scrapie infizierten Gehirnen konnte jedoch wider Erwarten keine Erhöhung von IL-1, IL-6 oder TNF- $\alpha$  festgestellt werden (Walsh et al., 2001, Cunningham et al., 2002). Eine Expressionssteigerung der iNOS wurde ebenfalls nicht detektiert (Walsh et al., 2001). Dieser Mangel an proinflammatorischen Zytokinen lässt sich durch die gesteigerte Expression von TGFB1, die in verschiedenen Modellen für experimentelle Prionenerkrankungen beobachtet wurde (Baker et al., 1999, Walsh et al., 2001), erklären (Cunningham et al., 2002): TGFB1 unterdrückt zum einen die Aktivierung von Mikroglia und hemmt zum anderen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Kim et al., 2004). Die Translation von TNF- $\alpha$  wird direkt von TGFB1 inhibiert (Bogdan et al., 1992). In diesem Zusammenhang ist ebenfalls interessant, dass TGFB1 die Bildung von Stickstoffmonoxid einschränkt (Lodge & Sriram, 1996, Minghetti et al., 1998). TGFB1 erhöht außerdem die PGE<sub>2</sub>-Produktion, indem es die Expression von COX-2 steigert (Minghetti & Levi, 1998). Im TSE-Modell enthielten aktivierte Mikroglia bei Mäusen einen erhöhten Gehalt des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2), welcher mit der Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) assoziiert war (Walsh et al., 2000). Auch im *Liquor cerebrospinalis* von Creutzfeldt-Jakob-Erkrankten konnte PGE<sub>2</sub> in erhöhtem Maße nachgewiesen werden (Minghetti et al., 2000). Dieses deutet auf eine Rolle von TGFB1 in der Pathogenese von TSE hin.

Überdies resultiert eine astrogliale Überexpression von TGFB1 bei Mäusen in einer starken Aufregulierung der extrazellulären Matrixproteine Laminin und Fibronectin, besonders in der Nachbarschaft perivaskulärer TGFB1-exprimierender Astrozyten (Wyss-Coray et al., 1995). Im Mausmodell für TSE war die extrazelluläre Matrixdeposition um die Blutgefäße des Gehirns erhöht. Hier konnten ebenfalls die Proteine Laminin und Fibronectin sowie Collagen Type IV identifiziert werden, die alle durch TGFB1 prozessiert werden (Cunningham et al.,

2002), so dass TGFB1 möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der im Rahmen einer Scrapieerkrankung auftretenden perivaskulären Ablagerungen zukommen könnte.

Der Einfluss von TGFB1 auf die Pathogenese der Scrapie konnte in der Studie von Giese et al. (1998) gezeigt werden: Mikrogliale Aktivierung kann bei scrapieinfizierten Mäusen schon früh in der Inkubationszeit beobachtet werden und ist in Verteilungsmuster und Zeitverlauf mit der PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation vergleichbar. Die Aktivierung der Mikroglia geht dem neuronalen Zelltod deutlich voran und ist *in vitro* für die Ausbildung der Toxizität von PrP-(27 – 30), dem proteaseresistenten Teil von PrP<sup>Sc</sup>, essentiell (Giese et al., 1998). Boche et al. (2006) hemmten die Bioverfügbarkeit von TGFB1 bei scrapieinfizierten Mäusen. Dieses führte zu einer starken Zunahme der iNOS-Expression und verschärften lokalen Entzündungsanzeichen, die sich in einem starken Anstieg der Mikroglia und T-Zellen im Hippocampus äußerten. Neuronaler Zelltod war mit der übertriebenen Entzündungsreaktion assoziiert. Die Autoren gehen von einer protektiven Funktion des TGFB1 im Verlauf von Prionenerkrankungen aus, deren Ausbleiben schädliche Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben könnte.

*TGFB1* liegt bei der Maus in einem QTL für Scrapieresistenz auf Chromosom 7 (Moreno et al., 2003) und ist somit nicht nur ein funktionelles, sondern auch ein positionelles Kandidatengen für Scrapieempfindlichkeit beim Schaf.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 *Material*

#### 3.1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial stammt von Schafen aus Deutschland, die in den Jahren 2002 – 2005 als scrapiepositiv identifiziert wurden (Lühken et al., 2007) (siehe Tabelle 5). Die Tiere wurden zuerst im Rahmen der TSE-Überwachung durch den Bio-Rad TeSeE Schnelltest (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA, ehemals Bio-Rad Platelia-Test) identifiziert und die endgültige Diagnose wurde am Friedrich-Löffler-Institut durch Western Blot, den Nachweis charakteristischer Fibrillen und / oder immunhistochemische Nachweisverfahren nach vorgeschriebenen Standards (OIE, 2004) bestätigt. Dort wurden in der Folge auch alle TSE-Fälle dem von Gretzschel et al. (2005) beschriebenen FLI-Test unterzogen, um eine BSE-Infektion dieser Tiere auszuschließen.

Als Kontrolltiere für die vorliegende Studie wurden scrapienegative oder -unverdächtige Herdenmitglieder (siehe Tabelle 5), unabhängig von ihrem Prionproteingenotyp, ausgewählt. Wenn möglich wurde auf besonders alte Tiere (>4 Jahre) bzw. Tiere aus der Altersklasse des scrapiepositiven Schafes zurückgegriffen. Die Rasse wurde nach dem Phänotyp bestimmt. Eine genaue Rassezuordnung konnte oftmals nicht getroffen werden, da sich die meisten Herden aus unterschiedlichen Rassen und deren Kreuzungen zusammensetzten. Bei elf von atypischer Scrapie betroffenen Herden handelte es sich um reine Merinolandschafherden. Des Weiteren traten vereinzelt Herden der Rassen Coburger Fuchsschaf, Graue Gehörnte Heidschnucke, Texel, Shropshire, Merinowollschaf, Moorschnucke, Ostfriesisches Milchschaaf und Weißes Bergschaf auf (Tabelle 5). In Übereinstimmung mit der Verordnung (EG) 999/2001 war ein Teil der Tiere abhängig vom PrP-Genotyp und der ARR-Allelfrequenz in der betroffenen Herde getötet und durch einen zugelassenen Schnelltest (Verordnung (EG) 36/2005) als scrapienegativ identifiziert worden. Die übrigen Kontrolltiere waren am Leben gelassen worden und blieben (bis zur Entstehung dieser Arbeit im August 2008) frei von klinischer Symptomatik. Von Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik oder den verantwortlichen Veterinärbehörden wurden Blut- oder Gewebeproben (Zunge, Ohr) entnommen.

Bei Zusammenstellung der Kontrollgruppen wurden einem klassisch scrapiepositiven Tier fünf scrapienegative oder -unverdächtige Tiere aus derselben Herde zugeordnet. Existierten zwei bis fünf Scrapiefälle in einer Herde wurden aus dieser Herde ebenfalls fünf Kontrolltiere

ausgesucht. War eine größere Anzahl von Scrapiefällen in einer Herde aufgetreten, wurde eine äquivalente Menge an Kontrolltieren ausgewählt. Aus einer besonders großen von klassischer Scrapie betroffenen Herde (Herde KS) standen 51 scrapiepositive Tiere zur Verfügung, denen 50 scrapienegative oder -unverdächtige Herdenmitglieder gegenübergestellt wurden. In den von atypischer Scrapie betroffenen Herden waren zumeist nur ein, selten zwei oder drei TSE-Fälle zu verzeichnen. Hier wurden zumeist fünf (ein bis acht) Kontrolltiere ausgewählt.

**Tabelle 5: Anzahl (n) der von klassischer und atypischer Scrapie betroffenen Herden sowie der scrapiepositiven Tiere (Fall) und Kontrolltiere (Kontroll) mit Rassenzuordnung.**

| Rasse                       | atypische Scrapie |                 |                  | klassische Scrapie |                  |                  |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
|                             | Herden<br>(n)     | Fall<br>(n)     | Kontroll<br>(n)  | Herden<br>(n)      | Fall<br>(n)      | Kontroll<br>(n)  |
| Kreuzungen                  | 40 <sup>1</sup>   | 45 <sup>2</sup> | 196 <sup>2</sup> | 13 <sup>3</sup>    | 101 <sup>4</sup> | 129 <sup>4</sup> |
| Merinolandschaf             | 11                | 16              | 55               | 0                  | 0                | 0                |
| Coburger Fuchsschaf         | 3                 | 3               | 15               | 0                  | 0                | 0                |
| Graue Gehörnte Heidschnucke | 2                 | 2               | 10               | 0                  | 0                | 0                |
| Texel                       | 1                 | 1               | 5                | 1                  | 2                | 5                |
| Shropshire                  | 1                 | 1               | 4                | 1                  | 1                | 5                |
| Merinowollschaf             | 1                 | 1               | 5                | 0                  | 0                | 0                |
| Moorschnucke                | 1                 | 1               | 5                | 0                  | 0                | 0                |
| Ostfriesisches Milchscharf  | 1                 | 1               | 5                | 0                  | 0                | 0                |
| Weißes Bergschaf            | 1                 | 1               | 4                | 0                  | 0                | 0                |
| Gesamt                      | 62 <sup>1</sup>   | 72 <sup>2</sup> | 304 <sup>2</sup> | 15 <sup>3</sup>    | 104 <sup>4</sup> | 139 <sup>4</sup> |

<sup>1</sup> Zur Durchführung der Mikrosatellitenanalyse stand eine weitere Herde mit einem atypisch scrapiepositiven Tier und fünf Kontrolltieren zur Verfügung. <sup>2</sup> Zur Durchführung der Mikrosatellitenanalyse standen aus organisatorischen Gründen der Probenverfügbarkeit insgesamt ein atypisch scrapiepositives Tier weniger und drei Kontrolltiere mehr zur Verfügung. <sup>3</sup> Zur Durchführung der Mikrosatellitenanalyse stand eine Herde mit einem klassisch scrapiepositiven Tier und 5 Kontrolltieren weniger zur Verfügung. <sup>4</sup> Zur Durchführung der Mikrosatellitenanalyse standen aus organisatorischen Gründen der Probenverfügbarkeit insgesamt zwei klassisch scrapiepositive Tiere und fünf Kontrolltiere weniger zur Verfügung.

### 3.1.2 DNA zur Standardisierung der Fragmentanalyse

GI2003: Herkunft: Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof, Rasse: Merinolandschaf, Identifizierung: 1719 HS

### 3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abdeckmatte für 96well Platte Perkin Elmer (*Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt*)

ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems, Darmstadt*)

Analysewaage AC211S (*Satorius AG, Göttingen*)

Bidestanlage Bi-Dest 2302 (*Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel*)  
Biofuge 13R (*Heraeus Instruments GmbH, Hanau*)  
Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips 100 µl (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
Blockthermostat BT 1301 (*MAGV, Rabenau-Londorf*)  
Borosilikat-Glasplatten (12 cm und 36 cm Länge) (*Applied Biosystems, Darmstadt*)  
Centrifuge 5804 mit Rotor A-2-DWP (*Eppendorf AG, Hamburg*)  
Centrifuge 5810R mit Rotor A-4-62 (*Eppendorf AG, Hamburg*)  
Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL 2400 (*Peqlab, Erlangen*)  
Combitips<sup>®</sup> plus (*Eppendorf AG, Hamburg*)  
Digital Graphic Printer UP-D895 (Vertrieb in Deutschland über Biometra, Göttingen) (*Sony, Tokyo, Japan*)  
Distriman, Distritips Micro, Mini, Maxi (*Gilson International B.V., Bad Camberg*)  
Eismaschine Scotsman AF10 (*Kälte Mack, Maintal*)  
Elektrophoresekammer Modell HRH (*International Biotechnologies Inc., New Haven, Conneticut, USA*)  
Faltenfilter, 595 ½, Ø 240 mm (*Whatman GmbH, Dassel*)  
Filter Tips 10 µl, 1000 µl (*nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe*)  
Filter Tips 20 µl, 200 µl (*Peqlab, Erlangen*)  
Gelkämme und Gelschlitten diverser Größen (*Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen*)  
Haifischzahnkamm, 36-well/48-well (mylar, 0,2 mm stark) (*Applied Biosystems, Darmstadt*)  
Horizontalelektrophoresekammern, ungekühlt, mini und midi (*Von Keutz Labortechnik GmbH, Reiskirchen*)  
iCycler 96well Thermocycler (*Bio-Rad, München*)  
K-EDTA Monovetten 9 ml (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
Kimwipes<sup>®</sup> (*Kimberly-Clark, Roswell, USA*)  
Latexhandschuhe (*G. Kisker GbR, Steinfurt*)  
Magnetrührer MR2002 (*Heidolph, Kelkheim*)  
ME25 Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) (*Whatman GmbH, Dassel*)  
Mikrowelle (*Clatronic, Kempten*)  
Minichiller (*Peter Huber Kältemaschinenbau, Offenburg*)  
Multipette (*Eppendorf AG, Hamburg*)  
Multiply<sup>®</sup> Deckelkette 8er Kette (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
Multiply<sup>®</sup>-µ Strips 0,2 ml 8er Kette (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
Netzgerät Consort E425 *MAGV (Rabenau-Londorf)*  
Netzgeräte Power Pac 1000 und 3000 (*Bio-Rad, München*)  
Nitrilhandschuhe latexfrei *MAGV (Rabenau-Londorf)*  
PCR-Cups Soft Tubes<sup>®</sup> mit Deckel Soft Strips<sup>®</sup> (*Biozym, Hess. Oldendorf*)

---

PCR-Gefäße in Streifen 0,2 ml mit Kappenstreifen (*VWR International GmbH, Darmstadt*)  
 PCR-Platte PP 96well mit Kappenstreifen (*nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe*)  
 Photopapier Type V UPP-110HG (Vertrieb in Deutschland über MS Laborgeräte Schröder, Wiesloch) (*Sony, Tokyo, Japan*)  
 Pipette Research pro 0,5 – 10 µl und 50 – 1200 µl (*Eppendorf AG, Hamburg*)  
 Pipetten Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000 (*Gilson International B.V., Bad Camberg*)  
 Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
 Quali PCR-Platten 96well mit Kappenstreifen (*G. Kisker GbR, Steinfurt*)  
 Reagiergefäße 1,5 ml (*Sarstedt, Nümbrecht*)  
 Rotor-Gene 3000, Pipettier-Roboter CAS-1200™ (*Corbett Life Science, Sydney, Australia*)  
 Spacer, mylar (0,2 mm stark) (*Applied Biosystems, Darmstadt*)  
 Submarine/Horizontal Gel Unit (*CBS Scientific Company, Inc., Del Mar, Kalifornien, USA*)  
 Thermocycler PE 9600 Perkin Elmer (*Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt*)  
 ThermoFast® 96, Low Profile (*ABgene Germany, Hamburg*)  
 Transferpette® -8 von 2,5 bis 25 ml (*Brand GmbH + Co KG, Wertheim*)  
 Transilluminator Biometra Ti5 (*Biometra, Göttingen*)  
 Vortex Reax 2000 (*Heidolph, Kelkheim*)  
 Wasserbad GFL (*MAGV, Rabenau-Londorf*)  
 Wasserbad Julabo 22A (*Julabo Labortechnik, Saalbach*)  
 Wasserbad (*Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen*)

### 3.1.4 Chemikalien und Reaktionskits

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad p.a. (zur Analyse) auf.  
 Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%ig w/v) (*Bio-Rad, München*)  
 Agarose NEEO Ultra-Qualität (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)  
 Ammoniumpersulfat (APS) (*Amresco, Ohio, USA*)  
 BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems, Darmstadt*)  
 Borsäure (*AppliChem, Darmstadt*)  
 Bromphenolblau (*United States Biomedical Corp., Ohio, USA*)  
 10x Buffer R (1x Buffer R: 10 mM Tris-Hydrochlorid (pH 8.5 at 37°C), 10 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 0.1 mg/ml BSA) (*Fermentas, St. Leon-Rot*)  
 10x Buffer Tango™ (1x Buffer Tango™: 33 mM Tris-Azetat (pH 7.9 bei 37°C), 10 mM Magnesiumazetat, 66 mM Kaliumazetat, 0.1 mg/ml BSA) (*Fermentas, St. Leon-Rot*)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO) (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)  
 EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (*AppliChem, Darmstadt*)  
 Ethanol (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)  
 Ethidiumbromid (*Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg*)

---

Formamid (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)

Glycerol (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)

Harnstoff (*AppliChem, Darmstadt*)

Invisorb<sup>®</sup> Blood Mini HTS 96 Kit/C-Sheep (*Invitex, Berlin*)

Magnesium Solution (25 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) (*Eppendorf AG, Hamburg*)

MSB<sup>®</sup> HTS PCRApace/ C-Kit (*Invitex, Berlin*)

Natriumazetat (*Merck KGaA, Darmstadt*)

10x NEBuffer 3 (1x NEBuffer 3: 100 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris-Hydrochlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dithiothreitol) (*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

10x NEBuffer 4 (1x NEBuffer 4: 50 mM Kaliumazetat, 20 mM Tris-Azetat, 10 mM Magnesiumazetat, 1 mM Dithiothreitol) (*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

NuSieve<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> Agarose (*Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, Maine, USA*)

QIAGEN Multiplex PCR Kit (*Qiagen, Hilden*)

Rotiphorese<sup>®</sup> 10x TBE Puffer (1 M Tris-Borat (pH 8,3), 20 mM EDTA, destilliertes deionisiertes Wasser) (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)

10x Taq Buffer advanced (selbstregulierend, maximale Mg<sup>2+</sup>-Konzentration: 2 mM Mg<sup>2+</sup>) (*Eppendorf AG, Hamburg*)

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (*Amresco, Ohio, USA*)

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (*AppliChem, Darmstadt*)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (*MP Biomedicals, LLC, Eschwege*)

Wasser für die Molekularbiologie (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)

Wasser für HPLC (*KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin*)

Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega GmbH, Mannheim*)

Xylencyanol FF (*United States Biomedical Corp., Ohio, USA*)

### 3.1.5 Größenstandards

FastRuler<sup>™</sup> DNA Ladder, Low Range, ready-to-use (*Fermentas, St. Leon-Rot*)

GeneRuler<sup>™</sup> 100bp DNA Ladder Plus (*Fermentas, St. Leon-Rot*)

Gene Scan<sup>™</sup> 500 Rox<sup>™</sup> Größenstandard (*Applied Biosystems, Darmstadt*)

pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23 (*Fermentas, St. Leon-Rot*)

### 3.1.6 Enzyme

Proteinase K (*Invitex, Berlin*)

Restriktionsenzyme BseYI (*Bacillus species 2521*), BsmFI (*Bacillus stearothermophilus* F) (*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Restriktionsenzyme LweI (*Listeria welshimeri*), BseGI (*Bacillus stearothermophilus* G), MvaI (*Micrococcus varians* RFL19) (*Fermentas, St. Leon-Rot*)

Taq (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase (*Eppendorf AG, Hamburg*)

### 3.1.7 Oligonukleotide

6-FAM markierte Oligonukleotide (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*)

unmarkierte Oligonukleotide (*biomers.net GmbH, Ulm*)

VIC bzw. NED markierte Oligonukleotide (*Applied Biosystems, Darmstadt*)

### 3.1.8 Computerprogramme

TFSEARCH (*Akiyama, 1995, Heinemeyer et al., 1998*)

Genotyper<sup>®</sup> V 3.7 NT (*Applied Biosystems, Darmstadt*)

MatInspector (*Cartharius et al., 2005*)

EMBOSS (*Labarga et al., 2007*)

NEBcutter V2.0 (*New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA*)

Primer3 (*Rozen & Skaletsky, 2000*)

SAS<sup>®</sup> 8.01 (*SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*)

ESEfinder 3.0 (*Smith et al., 2006*)

Sequence Manipulation Suite: CpG Islands (*Stothard, 2000*)

ChromasPro Version 1.32 (*Technelysium Pty Ltd*)

Alternative Splicing Database Project (ASD) (*Thanaraj et al., 2004, Stamm et al., 2006*)

## 3.2 Methoden zur Probenverarbeitung

### 3.2.1 Isolierung genomischer DNA

Die DNA der Kontrolltiere wurde aus peripheren Blutleukozyten, Zungen- oder Ohrgewebe mit Hilfe der für Schafsblut optimierten Version des Invisorb<sup>®</sup> Blood Mini HTS Kits isoliert, wie detailliert von Lipsky (2006) beschrieben.

Die DNA der scrapiepositiven Schafe wurde vom Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger (INNT), Arbeitsgruppe Groschup (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems) zur Verfügung gestellt.

### 3.2.2 Quantifizierung der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde mithilfe des Rotor Gene 3000 quantifiziert und unter Verwendung des Pipettier-Roboters CAS-1200<sup>™</sup> auf 10 ng/µl verdünnt. Dabei wurde jeweils nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen.

### 3.3 Methoden zur Mikrosatellitenanalyse

#### 3.3.1 Amplifikation der Mikrosatelliten durch PCR

Die Primerinformationen für die Mikrosatellitenanalyse wurden der Australian Sheep Gene Mapping Web Site (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>) entnommen und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Rückwärtsprimer wurden an ihren 5'-Enden mit den Fluoreszenzfarbstoffen NED, VIC oder 6-FAM markiert (Tabelle 6). Mikrosatelliten, die gemeinsam amplifiziert wurden, deren Allele sich aber in der Größe soweit unterschieden, dass Verwechslungen zuverlässig ausgeschlossen werden konnten, wurden mit demselben Farbstoff markiert.

**Tabelle 6: Primersequenzen der Mikrosatelliten, deren chromosomale Lokalisation im Schafgenom (Oar) sowie die zur Markierung der Primer verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.**

| Name                        | Oar | Primersequenz (5' → 3')<br>f = forward, r = reverse            | Fluoreszenz-<br>farbstoff <sup>(Lieferant)</sup> |
|-----------------------------|-----|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>BM6507</i> <sup>1</sup>  | 14  | ACTTAGCACAATGCCCTCTAGG (f)<br>ATGTTATTCCATCAGGAGGAGC (r)       | VIC <sup>10</sup>                                |
| <i>BMS2812</i> <sup>2</sup> | 15  | TCCAGGTTAGCTGACATAATCC (f)<br>ATTGTTCCATTGCATGTTCC (r)         | 6-FAM <sup>11</sup>                              |
| <i>CSAP26E</i> <sup>3</sup> | 14  | TCACTAAATTGTATTTGGCAATTCC (f)<br>TGACTGACAAAATTCTCTACCATCC (r) | 6-FAM <sup>11</sup>                              |
| <i>CSR63</i> <sup>4</sup>   | 14  | AAGGACCTACTATTTAGCACAGGG (f)<br>AGTGATACTTCACACATGCCTATG (r)   | NED <sup>10</sup>                                |
| <i>MCM159</i> <sup>5</sup>  | 15  | GATGGTCTTGTTTCTGAATCATTGA (f)<br>TCAGACAGGACTAAAGCGACTTACA (r) | NED <sup>10</sup>                                |
| <i>MCMA16</i> <sup>6</sup>  | 15  | CTGCAAGGTATTCTGTTGTG (f)<br>AGGAAAATGGCCAAATAGAG (r)           | 6-FAM <sup>11</sup>                              |
| <i>MCMA53</i> <sup>7</sup>  | 15  | CAACATGGATGGACCTATCTATGG (f)<br>TCACAGAGTGGGACATGAATGA (r)     | 6-FAM <sup>11</sup>                              |
| <i>RM004</i> <sup>8</sup>   | 15  | CAGCAAAATATCAGCAAACCT (f)<br>CCACCTGGGAAGGCCTTA (r)            | VIC <sup>10</sup>                                |
| <i>UWCA5</i> <sup>9</sup>   | 14  | CTTCCCTGTGTTAGGCTATGT (f)<br>CAAGAGAAGACAAGACTACAGA (r)        | 6-FAM <sup>11</sup>                              |

<sup>1</sup> (GenBank Nr.: G18441), <sup>2</sup> (Stone unveröffentlicht), <sup>3</sup> (DeSilva et al., 2003), <sup>4</sup> (Davies et al., 1996), <sup>5</sup> (Davies et al., 1995), <sup>6</sup> (Beh et al., 2000), <sup>7</sup> (Beh et Maddox, unveröffentlicht), <sup>8</sup> (Kossarek et al., 1993), <sup>9</sup> (Sun et al., 1994), <sup>10</sup> (Applied Biosystems, Darmstadt), <sup>11</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Unter Verwendung des Qiagen Multiplex PCR Kits wurden drei Multiplex-PCRs etabliert. Die Reaktionen enthielten bei einem Gesamtvolumen von 12 µl 12 ng DNA, 1x Qiagen Multiplex PCR Master Mix und Primerpaare (je Primer) in den folgenden Konzentrationen:

0,07  $\mu$ M *MCM159*, 0,08  $\mu$ M *MCMA53* (Multiplex-PCR Nr. 1), 0,05  $\mu$ M *UWCA5*, 0,15  $\mu$ M *CSAP26E*, 0,07  $\mu$ M *CSRD63*, 0,05  $\mu$ M *BM6507* (Multiplex-PCR Nr. 2), 0,04  $\mu$ M *MCMA16*, 0,11  $\mu$ M *BMS2812* und 0,09  $\mu$ M *RM004* (Multiplex-PCR Nr. 3).

Für alle Multiplex-PCRs wurde ein Standard-PCR-Protokoll mit einer initialen Denaturierung bei 95°C für 15 s gewählt. Es folgten weitere 35 Zyklen, die sich aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 90 s Annealing bei 58°C und 60 s Elongation bei 72°C zusammensetzten. Abschließend wurde eine terminale Elongationsphase für 10 min bei 72°C durchgeführt.

### 3.3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Bedingungen wurde die Agarosegelelektrophorese herangezogen. Die Konzentration der Agarosegele richtete sich nach der Größe der nachzuweisenden Fragmente sowie den Größenunterschieden zwischen ihnen (Mühlhardt, 2003). Als Größenmarker diente der FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, ready-to-use bzw. der GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. Die Proben wurden vor dem Laden mit 16,7% (v/v) Probenpuffer I versetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente je nach verlangter Qualität 0,5x bzw. 1x TBE. Innerhalb von 45 - 180 min erfolgte die Auftrennung der Fragmente durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 5 – 10 V/cm (Elektrodenabstand). Die Laufstrecke wurde mittels der Bandenposition der beiden Pufferfarbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol abgeschätzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 20 min in einem Ethidiumbromidbad (0,1% (v/v) Ethidiumbromid in 1x TBE) angefärbt und die DNA-Fragmente durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden schließlich durch eine Videokamera mit angeschlossenem Thermodrucker (Polaroid-Digital-Video-Store-System) dokumentiert (Prinzenberg, 1998).

*Probenpuffer I:*

*50% Glycerol, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol FF*

### 3.3.3 Typisierung der Mikrosatelliten mittels Fragmentanalyse

Die Typisierung der Mikrosatelliten wurde mittels Fragmentanalyse durchgeführt. Die einzelnen Mikrosatellitenloci werden hierzu mithilfe von fluoreszenzmarkierten, die DNA-Sequenz der Marker flankierenden Primerpaaren amplifiziert und am Sequenziergerät durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Fragmentlängen werden die unterschiedlichen Allele der einzelnen Loci nachgewiesen (Toh et al., 1996, Leeb, 2005).

### 3.3.3.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Für die Fragmentanalyse am ABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequenzer wurde ein 12 cm langes, 0,2 mm dünnes, 6,75%iges (w/v) 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid-Gel mit 6 M Harnstoff in 1,2x TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde der Gelmix aus Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%ig w/v), Harnstoff, 10x TBE-Puffer und HPLC-Wasser in einer Saugflasche mit Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) durch eine Wasserstrahlpumpe entgast. Als Katalysatoren für die Polymerisation wurden 0,9% (v/v) Ammoniumpersulfat (APS) (10%) und 0,06% (v/v) TEMED hinzugegeben. Anschließend wurde die Gellösung blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Als Platzhalter für den später verwendeten Haifischzahnkamm mit 48 Slots wurde ein Vorkamm gesetzt, der nach dreißigminütiger Polymerisationszeit gezogen wurde. Als Gel und Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Zu 42,86% (v/v) der zu testenden PCR-Produkte wurde 57,14% (v/v) Probenpuffer II in eine Thermowellplatte gegeben. Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 90°C wurden die Proben bis zum Laden auf das Gel auf Eis gelagert (Peter, 2005).

*TBE-Puffer 10-fach:*

*0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 22 µM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, Wasser für HPLC, filtriert durch 595 ½ Faltenfilter Ø 240 mm*

*Probenpuffer II:*

*62,5% (v/v) Formamid, 12,5% (v/v) Gene Scan<sup>™</sup> 500 Rox<sup>™</sup> Größenstandard + 25% (v/v) zugehöriger Ladepuffer*

### 3.3.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Im halbautomatischen Sequenzierer wurde das Gel zunächst auf Fremdfluoreszenzen überprüft und auf eine für die Durchführung der Elektrophorese optimale Temperatur von 51°C aufgeheizt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 51°C bei 3000 V, 60 mA und 200 W über eine Zeitdauer von 2 h durchgeführt. Die Ergebnisse der Fragmentanalyse wurden am PC mit dem Programm Genotyper<sup>®</sup> V 3.7 NT ausgewertet.

*TBE-Puffer 10-fach:*

*siehe 3.3.3.1*

### 3.3.3.3 Standardisierung der Ergebnisse

Bei jedem Lauf wurde eine Standardprobe (Gi2003) geladen, um die Ergebnisse untereinander abzugleichen, zu vereinheitlichen und durch abweichende Laufeigenschaften auftretende Typisierungsfehler auszuschließen.

### 3.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms SAS<sup>®</sup> 8.01 durchgeführt. Die Allelfrequenzen wurden für jeden Mikrosatelliten nach Scrapietyp getrennt ermittelt und anschließend zwischen scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren verglichen. Seltene Allele mit einer Frequenz von unter 5% in der Gesamtpopulation wurden zu einer Gruppe (xxx) zusammengefasst. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem Chi-Quadrat-Test gerechnet und durch Fisher's exact Test abgesichert. Bei Auftreten einer Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde jedes der Allele des betreffenden Mikrosatelliten einzeln gegen alle anderen gerechnet.

Aus den von atypischer Scrapie betroffenen Herden wurden in einem erneuten Rechenansatz die Merinolandschafherden ausgewählt, um die Allelfrequenzen auch hier für atypisch scrapiepositive Tiere und Kontrolltiere getrennt zu bestimmen und untereinander zu vergleichen.

Für die 51 scrapiepositiven Tiere und deren scrapienegative oder -unverdächtige Herdenmitglieder aus der von klassischer Scrapie betroffenen Herde KS wurde die Berechnung und Auswertung der Allelfrequenzen ebenfalls noch einmal gesondert durchgeführt.

Weiterhin wurde für die Gesamtheit der Population die Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft (Hardy, 1908).

## 3.4 Methoden zur Kandidatengenanalyse

### 3.4.1 PCR-Amplifikation spezifischer Genregionen

#### 3.4.1.1 Primerauswahl

Die Primerpaare zur Amplifikation der ausgewählten Genregionen wurden mithilfe des Programms Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) aufgrund von Schaf- oder Rindergenbanksequenzen ausgewählt (Tabelle 7).

#### 3.4.1.2 PCR-Reaktionsansatz

Ein Standardreaktionsansatz von 50 µl enthielt 40 – 50 pmol je Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 30 – 90 ng genomische DNA und 1 – 1,75 U *Taq*-DNA-Polymerase in 1x *Taq* Buffer advanced. Die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) lagen insgesamt in einer Konzentration von 640 – 800 µM vor. Der PCR-Ansatz zur Amplifikation von *Kallikrein 1* enthielt überdies 25 nmol Magnesium Solution ( $\text{MgO}(\text{Ac})_2$ ). Bei den Genen *Calpain*, *Large*

*Polypeptide L2* und *Cathepsin D* wurden zusätzlich 10% (v/v) DMSO, bei dem Gen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  zusätzlich 5% (v/v) DMSO in den Reaktionsansatz gegeben.

**Tabelle 7: Primersequenzen der Kandidatengene und Genbankressourcen (Bta = *Bos taurus*, Oar = *Ovis aries*), auf denen sie basieren.**

| Gen                                                     | Primersequenz (5' → 3')<br>f = forward, r = reverse       | GenBank Nr.<br>(Spezies) |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Cathepsin B</i>                                      | GGAACACTGATTGGGGTGAC (f)<br>ATTCCACAGTGGTCCTGTCC (r)      | NM_174031 (Bta)          |
| <i>Cathepsin D</i>                                      | CTGTGAGGCTATCGTGGACA (f)<br>CTCAGGCACACGGTCGTC (r)        | AF164143 (Oar)           |
| <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i>                    | AGTGGGAAACCGGCTAAAGT (f)<br>TGCTGGAGTAAGGTCCCAAC (r)      | XM_864105 (Bta)          |
| <i>Kallikrein 1</i>                                     | CCTGTTTGAGGACGAAGACAC (f)<br>GGTGTAGACGGAGGGCTTATT (r)    | AY290705 (Bta)           |
| <i>Transforming Growth Factor, <math>\beta 1</math></i> | AGAACTGCTGTGTTCGTCAGCTC (f)<br>GTTGGACAACTGCTCCACCTTG (r) | NM_001009400<br>(Oar)    |

### 3.4.1.3 Thermocyclerprotokoll

Mit Ausnahme des Gens *Cathepsin D* wurde für alle Gene die PCR mit einer initialen zweiminütigen Denaturierung bei 95°C begonnen. Danach folgten 35 – 40 Zyklen, die eine Denaturierung bei 95°C für 30 s, ein Annealing bei individuellen Temperaturen im Bereich von 57 – 65 °C für 30 s und eine in der Dauer der Größe des erwarteten Produkts angepasste Elongation bei 72 °C beinhalteten (Tabelle 8). Abschließend wurde eine finale Elongation bei 72°C für 10 min durchgeführt.

**Tabelle 8: Für die Amplifikation der einzelnen Gene verwendete Annealingtemperaturen und Elongationszeiten.**

| Gen                                                     | Annealingtemperatur (°C) | Elongationszeit (s) |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| <i>Cathepsin B</i>                                      | 58                       | 45                  |
| <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i>                    | 57                       | 35                  |
| <i>Kallikrein 1</i>                                     | 65                       | 80                  |
| <i>Transforming Growth Factor, <math>\beta 1</math></i> | 64                       | 60                  |

Für die Amplifikation von *Cathepsin D* wurde ein für den Einsatz von DMSO empfohlenes Cyclerprogramm verwendet (Müller, 2001): An eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min schlossen sich 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 50 °C und einer einminütigen Elongation bei 72 °C an. Das Programm wurde mit einer zehnminütigen Elongationsphase bei 72 °C beendet.

### 3.4.2 Reinigung und Mengenbestimmung von PCR-Produkten

#### 3.4.2.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit dem MSB<sup>®</sup> HTS PCRAPace/ C-Kit, im Falle von *Cathepsin B* mit dem Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Dabei wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren.

#### 3.4.2.2 Mengenschätzung mittels Agarosegelelektrophorese

Ein Aliquot (5 µl) der aufgereinigten Amplifikate wurde mit 16,7% (v/v) Probenpuffer I (siehe 3.3.2) vermischt und zur Mengeschätzung auf ein 1% (w/v) Agarosegel geladen. Als Mengenstandard dienten 0,5 µg des GeneRuler<sup>™</sup> 100bp DNA Ladder Plus. Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erfolgten wie unter 3.3.2 beschrieben. Die Menge an PCR-Produkt wurde mittels Fluoreszenzvergleich abgeschätzt. Durch Umrechnung auf das eingesetzte Volumen wurde die Konzentration (ng/µl) der Amplifikate bestimmt.

### 3.4.3 Sequenzierung

Die auf der di-Desoxyterminationsmethode von Sanger et al. (1977) beruhende automatische DNA-Sequenzierung wurde mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequenzer durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass an die eingesetzten ddNTPs, die zum Kettenabbruch führen, entsprechend ihrer verschiedenen Basen vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Wandern diese dann mit der ihrer Größe entsprechenden Geschwindigkeit zur Anode, werden sie nach der Anregung mit Laserlicht vom halbautomatischen Sequenzierer detektiert.

#### 3.4.3.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion erfolgte als lineare DNA-Amplifikation durch die Cycle-Sequencing-Methode unter Einsatz des BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits. Auf einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 4 µl des Ready Reaction Mix in 1x Sequencing Buffer gegeben. Je nach Länge des Amplifikates wurden 23 – 60 ng aufgereinigtes PCR-Produkt mit 5 pmol des Sequenzierprimers eingesetzt. Als Sequenzierprimer diente einer der beiden für die Amplifikation des jeweiligen PCR-Produktes verwendeten Primer (Tabelle 9).

Das Thermocyclerprogramm bestand aus einer initialen einminütigen Denaturierung bei 96°C sowie 25 Zyklen, die eine Denaturierung bei 96°C für 10 s, ein Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen für 5 s und eine Elongation bei 60°C für 4 min beinhalteten (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Zur Sequenzierung der einzelnen Gene eingesetzte Sequenzierprimer und verwendete Annealingtemperaturen (Annealingt.).**

| Gen                                                     | Primersequenz (5'→3')<br>f = forward, r = reverse | Annealingt.<br>(°C) |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|
| <i>Cathepsin B</i>                                      | ATTCCACAGTGGTCCTGTCC (r)                          | 55                  |
| <i>Cathepsin D</i>                                      | CTGTGAGGCTATCGTGGACA (f)                          | 55                  |
| <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i>                    | AGTGGGAAACCGGCTAAAGT (f)                          | 57                  |
| <i>Kallikrein 1</i>                                     | GGTGTAGACGGAGGGCTTATT (r)                         | 55                  |
| <i>Transforming Growth Factor, <math>\beta 1</math></i> | GTTGGACAACCTGCTCCACCTTG (r)                       | 60                  |

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion durch die Zugabe von 6  $\mu$ mol Natriumazetat (pH 4,6 – 5,2) und 69,4% (v/v) absolutem unvergälltem Ethanol gefällt. Das erhaltene Pellet wurde noch zweimal mit 150  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen und dann bis zum Laden auf den halbautomatischen Sequenzierer bei – 20°C tiefgefroren.

### 3.4.3.2 Sequenzierung am halbautomatischen Sequenziergerät

Die Sequenzierung am ABI PRISM® 377 DNA Sequenzer erfolgte analog der in 3.3.3 beschriebenen Fragmentanalyse mit folgenden Unterschieden: Es wurde ein 36 cm langes, 0,2 mm dünnes 5%iges (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Gel mit 7 M Harnstoff, 0,5% (v/v) Ammoniumpersulfat und 0,04% (v/v) TEMED verwendet. Die Probenpellets wurden in 4  $\mu$ l Probenpuffer III resuspendiert. Zur Erstellung der Geltaschen wurde ein 36er Haifischkamm benutzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 51°C bei 2500 V, 50 mA und 48 W über 8 h durchgeführt. Anschließend wurden die Sequenzen am PC mithilfe des Programms Chromas Pro 1.3.2 ausgewertet.

*Probenpuffer III:*

*50 mg Blue Dextran 2000 in 1 ml EDTA (25 mM) durch Ultraschall gelöst, anschließend 5:1 mit Dimethylformamid verdünnt*

### 3.4.4 Nachweis von Mutationen

#### 3.4.4.1 PCR-RFLP

Die identifizierten SNPs wurden durch PCR-RFLP (Saiki et al., 1985) nachgewiesen. Dazu wurde zuerst mithilfe des Programms NEBcutter V2.0 ein Enzym, dessen Erkennungssequenz im fraglichen Bereich liegt, ausgewählt. Das unter 3.4.1 für Cathepsin B beschriebene Protokoll konnte unverändert für die RFLP-Analyse verwendet werden. Für die Gene *Cathepsin D* und *Kallikrein 1* wurden neue Primer ausgewählt, um die möglichen Fragmentlängen in ein für die Auftrennung im Agarosegel günstiges Größenverhältnis

zueinander zu bringen. Bei den RFLP-Analysen der Gene *Cathepsin B* und *Kallikrein 1* war es möglich, eine zusätzliche Erkennungssequenz für das jeweilige Enzym (siehe Tabelle 11) in den Amplifikaten als Positivkontrolle für einen erfolgreichen Verdau zu nutzen.

In einen 15 µl Reaktionsansatz wurden 9 – 10 ng DNA eingesetzt. Ansonsten entsprach die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Gene *Kallikrein 1* und *Cathepsin D* der unter 3.4.1.2 beschriebenen. Die Thermocyclerprotokolle stimmten ebenfalls mit den unter 3.4.1.3 aufgeführten Protokollen überein, bis auf dass die Annealingtemperatur für die Amplifikation von *Cathepsin D* bei 55°C lag und die Elongationszeit im Thermocyclerprotokoll zur Amplifikation von *Kallikrein 1* auf 45 s verkürzt worden war. In beiden Protokollen war die Zyklenanzahl um fünf Zyklen erhöht worden.

**Tabelle 10: Primer für die PCR-RFLP-Analyse der Gene *Cathepsin D* und *Kallikrein 1*.**

| Gen                 | Primersequenz (5' → 3')<br>f = forward, r = reverse    |
|---------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>Cathepsin D</i>  | GGAGGACTACACGCTCAAGG (f)<br>CTCAGGCACACGGTCGTC (r)     |
| <i>Kallikrein 1</i> | CCACACACATCAGAGTTCACG (f)<br>GGTGTAGACGGAGGGCTTATT (r) |

Die PCR-Produkte wurden mit den jeweiligen Enzymen (Tabelle 11) in 1x Reaktionspuffer über Nacht bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen verdaut. Die genaue Zusammensetzung der Verdauansätze ist Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Verdauansätze zur RFLP-Analyse der Gene *Cathepsin B*, *Cathepsin D* und *Kallikrein 1*.**

| Verdauansatz              | <i>Cathepsin B</i> | <i>Cathepsin D</i> | <i>Kallikrein 1</i> |
|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Ansatzvolumen (µl)        | 10                 | 10                 | 12                  |
| Enzym / Enzymmenge (U)    | <i>LweI</i> / 5    | <i>BseYI</i> / 0,5 | <i>BsmFI</i> / 1    |
| 1x Reaktionspuffer        | Buffer-Tango™      | NEBuffer 3         | NEBuffer 4          |
| Menge an PCR-Produkt (µl) | 8                  | 8                  | 10                  |
| 1x BSA                    | nein               | nein               | ja                  |

BSA = Bovines Serumalbumin

Die verdauten PCR-Produkte wurden je nach Größe und Größenverhältnis der erwarteten Fragmente (Mühlhardt, 2003) auf 2,5 – 4%ige (w/v) Agarosegele geladen. Diese bestanden anteilig zu 83% (w/w) aus Standardagarose und zu 17% (w/w) aus NuSieve® GTG® Agarose. Als Standard diente jeweils ein zuvor durch Sequenzierung als heterozygot identifiziertes Tier. Zusätzlich wurden der Größenstandard pUC19 DNA/MspI (*HpaII*) Marker, 23 und bei

Existiert keine natürliche Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease, stellt die ACRS-PCR (Amplification Created Restriction Site - Polymerase Chain Reaction) eine elegante Lösung dar: Durch Modifikation des der Mutation benachbarten Primers nahe des 3'-Endes wird dabei eine künstliche Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym geschaffen (Haliassos et al., 1989). Im Optimalfall liegt das 3'-Ende des Primers direkt vor der Mutation und die Basenfehlpaarung zwei oder drei Basen vor dem 3'-Primerende. Ist die Basenfehlpaarung direkt am 3'-Ende des Primers lokalisiert, kann sie zu Problemen bei der Amplifikation des gewünschten Produktes führen (Eiken et al., 1991). Die Stabilität der Oligonukleotidbindung an die DNA wird neben der Position auch von der Art der jeweiligen Fehlpaarung beeinflusst und nimmt in folgende Richtung ab: CC > CT > GG ≥ AA = AC > GT (Eiken et al., 1991, Müller, 2001).

Für die Amplifikation des gewünschten Bereiches aus dem Gen *Transforming Growth Factor β1* wurde ein modifizierter Vorwärtsprimer, der mit dem Wildtypallel (G) die Erkennungssequenz für das Enzym *Bse*GI bildet, und ein dazu passender Rückwärtsprimer ausgewählt (Abbildung 8).

**Abbildung 8: Primer für die ACRS-PCR des Gens *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  sowie im PCR-Produkt resultierende Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *BseGI*.**

58

insgesamt in einer Konzentration von 800 µM vor. Das Thermocyclerprotokoll entsprach dem für *Transforming Growth Factor, β1* unter 3.4.1.3 beschriebenen Protokoll, bis auf dass die Annealingtemperatur bei 63 °C lag, die Elongationszeit nur noch 30 s betrug und die Zyklenanzahl auf 45 erhöht worden war.

In den Verdauansatz mit einem Gesamtvolumen von 14 µl wurden 12 µl PCR-Produkt in 1x Buffer Tango™ mit 1 U *Bse*GI eingesetzt und bei 55°C über Nacht verdaut. Anschließend wurden die Ansätze analog zu 3.4.4.1 mithilfe von 4% (w/v) Agarosegelen ausgewertet.

### 3.4.4.3 ASPCR

Eine andere Methode zum Nachweis bekannter Punktmutationen ist die allelspezifische PCR (ASPCR), zuvor als amplification refractory mutation system (ARMS) beschrieben (Newton et al., 1989). Hierbei werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, von denen jede für eine Variante des untersuchten Gens spezifisch ist. Für das *Calpain, Large Polypeptide L2* wurden zwei Vorwärtsprimer entworfen, die sich am 3'-Ende um die fragliche Base unterscheiden. Die Gegenprimer wurden aufgrund ähnlicher Schmelztemperaturen ausgewählt. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 12 aufgeführt. Zur Erhöhung der Spezifität der Vorwärtsprimer wurde an drittletzter Stelle vor dem 3'-Ende eine zusätzliche Fehlpaarung eingefügt (Müller, 2001). Die dadurch bedingte Destabilisierung verhinderte dann zuverlässig die Amplifikation des jeweils nicht komplementären Allels (Abbildung 9). Um durch PCR-Ausfälle verursachte falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurde als Positivkontrolle ein innerhalb der ASPCR-Oligonukleotide liegender zweiter Vorwärtsprimer eingesetzt, der mit dem Rückwärtsprimer der ASPCR ein Kontrollfragment amplifizierte (Müller, 2001) (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Primer für die allelspezifische PCR (ASPCR) zur Amplifikation von Allelen des Wildtyps (-G) bzw. mit Mutation (-T) des Gens *Calpain, Large Polypeptide L2* (*CAPN2*) inklusive zusätzlichem Vorwärtsprimer zur Amplifikation des Kontrollfragmentes (-Kontrollfr.).**

| Primerbezeichnung                                                                        | Primersequenz (5'→3')                |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                                                          | f = forward, r = reverse             |
| <i>CAPN2</i> ASPCR-T (f)                                                                 | CCGCTTTTCCACCGGGATGC <b>T</b> CT (f) |
| <i>CAPN2</i> ASPCR-T (r)                                                                 | GGTTGAGGTACTTGACCGCCCTCTCG (r)       |
| <i>CAPN2</i> ASPCR-G (f)                                                                 | GCTTTTCCACCGGGATGC <b>T</b> CG (f)   |
| <i>CAPN2</i> ASPCR-G (r)                                                                 | GGGAAGGAGGGGTCCTGGAACAG (r)          |
| <i>CAPN2</i> ASPCR-Kontrollfr. (f)                                                       | CCGCGGGACCCGGTGAATCAT (f)            |
| Fettgedruckte Basen: Allelspezifische Basen; Eingerahmte Basen: eingefügte Fehlpaarungen |                                      |

Beide PCR-Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 12 µl je 24 pmol der allelspezifischen Primer (*CAPN2* ASPCR-T (f), *CAPN2* ASPCR-T (r) bzw. *CAPN2* ASPCR-G (f), *CAPN2* ASPCR-G (r) (Tabelle 12)) und 12 pmol des innenliegenden Primers zur Amplifikation des Kontrollfragmentes (*CAPN2* ASPCR-Kontrollfr. (Tabelle 12)). Weiterhin wurden 10% (v/v) DMSO, 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase und 8 ng DNA in die Reaktion eingesetzt. Die dNTPs lagen insgesamt in einer Konzentration von 800 µM vor.

|                 |                                                          |          |                                     |
|-----------------|----------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| ASPCR-Primer    | CCG CTT TTC CAC CGG GAT GC                               | <b>T</b> | CT → → <b>Produktamplifikation</b>  |
| Allel (Mutante) | ...GGC GAA AAG GTG GCC CTA CGG GAC CCA CGA GCG TCG GC... |          |                                     |
| ASPCR-Primer    | CCG CTT TTC CAC CGG GAT GC                               | <b>T</b> | <b>C</b> keine Produktamplifikation |
| Allel (Wildtyp) | ...GGC GAA AAG GTG GCC CTA CGG GCC CCA CGA GCG TCG GC... |          |                                     |

Fettgedruckte Basen: Position der Mutation; Eingerahmte Basen: Fehlpaarungen

**Abbildung 9: Funktionsprinzip der allelspezifischen PCR (ASPCR). Bei Basenfehlpaarung am 3'-Ende erfolgt keine Amplifikation des PCR-Produkts, sondern nur bei Komplementarität an dieser Position. Die zusätzliche Fehlpaarung an drittletzter Stelle des Primers erhöht die Spezifität der Bindung.**

Die Thermocyclerprotokolle für die beiden allelspezifischen PCRs glichen dem unter 3.4.1.3 beschriebenen Protokoll zur Amplifikation von *Cathepsin D* mit dem Unterschied, dass die allelspezifische PCR zur Amplifikation des Wildtypallels (G) eine Annealingtemperatur von 66 °C bei 50 Zyklen und die allelspezifische PCR zur Amplifikation des mutierten Allels (T) eine Annealingtemperatur von 72 °C bei 45 Zyklen aufwies.

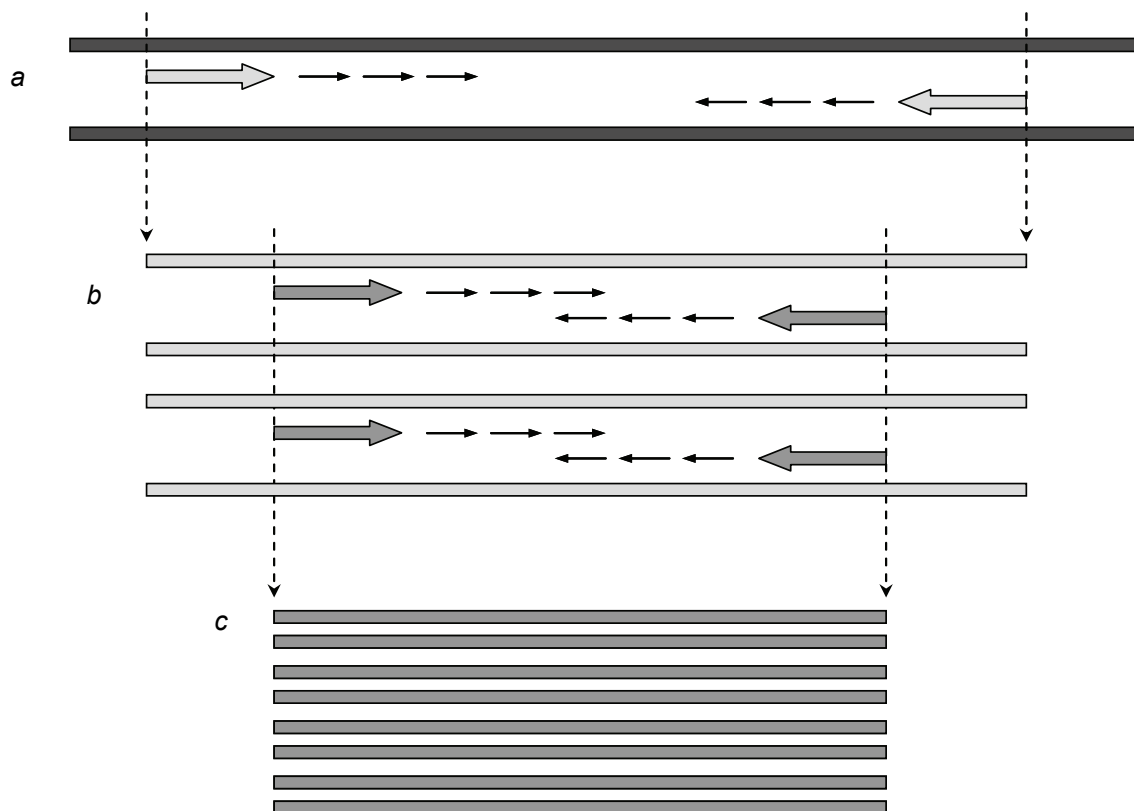
Im Anschluss wurden die PCR-Ansätze auf 2% (w/v) Agarosegele geladen, wie unter 3.3.2 beschrieben gefärbt und die Ergebnisse dokumentiert.

#### 3.4.4.4 Nested PCR mit anschließendem RFLP

Da die zur Typisierung des *Calpain, Large Polypeptide L2* angewandte ASPCR bei einigen wenigen heterozygoten Tieren das G-Allel nicht detektierte, wurden alle Proben, die als homozygot für T typisiert worden waren, zur Absicherung des Ergebnisses mittels PCR-RFLP typisiert. Weiterhin wurden einige Proben, die durch PCR-Ausfälle ohne eindeutiges Typisierungsergebnis geblieben waren, überprüft.

Die für den PCR-RFLP ausgewählte Zielregion des Gens weist einen sehr hohen GC-Gehalt auf, was zur Beschränkung der Amplifikation durch die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen führt (Moreau et al., 1997). Weiterhin produzierten die ausgewählten Oligonukleotide (siehe unten), sofern genomische DNA in den PCR-Ansatz eingesetzt wurde, zahlreiche Nebenbanden, die sich durch unspezifische Primerpaarungen erklären lassen

(Moreau et al., 1997). Aus diesen Erwäggründen heraus wurde eine nested PCR durchgeführt, deren Spezifität und Sensitivität im Vergleich zu einer herkömmlichen PCR deutlich erhöht ist (Albert & Fenyo, 1990). Diese setzt sich aus zwei aufeinander folgenden Amplifikationen zusammen: In der ersten werden Primer verwendet, die außerhalb des gewünschten PCR-Fragments lokalisiert sind. So wird ein größeres Amplikon produziert, das als Matrize in die zweite PCR-Reaktion eingesetzt wird, in der weiter innen liegende Primer schließlich das gewünschte PCR-Fragment amplifizieren (Müller, 2001) (Abbildung 10). Genomische DNA ist selbst bei effektiver Reinigung noch mit Histonen assoziiert und superspiralisierte DNA-Matrizen lassen sich teilweise nicht zu 100% denaturieren. Der Vorteil der nested PCR ist neben der Beseitigung unspezifischer Bindungsstellen auch darin begründet, dass lineare und proteinfreie DNA-Fragmente als Matrize in die zweite PCR eingesetzt werden können (Müller, 2001).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der nested PCR nach Müller (2001).** In der ersten PCR-Reaktion (a) liegen die Primer ( $\Rightarrow$ ) außerhalb des letztendlich gewünschten PCR-Fragments ( $\equiv$ ). Aus genomischer DNA ( $\blacksquare$ ) wird ein Produkt ( $\equiv$ ) amplifiziert, das als Matrize in die zweite PCR-Reaktion (b) eingesetzt wird. Spezifische interne Oligonukleotide ( $\Rightarrow$ ) vervielfältigen nun das gewünschte Amplifikat (c).

In die erste PCR wurden auf einen Gesamtansatz von 10  $\mu$ l 7 ng DNA in 1x *Taq* Buffer advanced eingesetzt. Es wurde das schon unter 3.4.1.1 beschriebene Primerpaar für die Amplifikation von *Calpain, Large Polypeptide L2* verwendet und 10 pmol je Primer

zugegeben. Die dNTPs lagen insgesamt in einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  vor. Des Weiteren wurden 10% (v/v) DMSO und 0,35 U *Taq*-DNA-Polymerase beigelegt. Das Thermocyclerprotokoll glich dem für *Calpain, Large Polypeptide L2* unter 3.4.1.3 aufgeführten Protokoll mit dem Unterschied, dass die Annealingtemperatur bei 55,5 °C lag und die Elongationszeit 40 s betrug. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt.

Das PCR-Produkt aus der ersten PCR diente als Matrize für die zweite Amplifikation: Durch das bloße Eintauchen einer Pipettenspitze (der Größe 10  $\mu\text{l}$ ) in den ersten PCR-Ansatz wurde eine geringe Menge des Amplifikates in den Reaktionsansatz der zweiten PCR verbracht. Dieser enthielt weiterhin bei einem Gesamtvolumen von 16  $\mu\text{l}$  16 pmol je innenliegendem Primer (Tabelle 13) und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase in 1x *Taq* Buffer advanced. Weiterhin wurden 10% (v/v) DMSO zugegeben. Die dNTPs lagen in ihrer Gesamtheit in einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  vor. Die PCR wurde mit einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94°C eingeleitet. Daran schlossen sich 45 Zyklen mit je einer Denaturierung bei 95 °C für 30 s, einem Annealing bei 60,5 °C für 30 s und einer Elongation bei 72 °C für 35 s an. Abschließend wurde eine finale zehnminütige Elongation bei 72 °C durchgeführt.

**Tabelle 13: Innenliegende Primer für die Amplifikation von *Calpain, Large Polypeptide L2* in einer nested PCR.**

| Gen                                  | Primersequenz (5' → 3')                             |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                      | f = forward, r = reverse                            |
| <i>Calpain, Large Polypeptide L2</i> | GGATTTGAGTCCCCGCTTTTC (f)<br>GGCAGCGGGACTGTGAGC (r) |

In einem Verdauansatz von 12  $\mu\text{l}$  wurden 10  $\mu\text{l}$  des Amplifikates mit 5 U *Mva*I in 1x Buffer R<sup>TM</sup> bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Auswertung wurde analog zu 3.4.4.1 unter Nutzung von 3% (w/v) Agarosegelen durchgeführt.

### 3.4.5 Statistische Auswertung

Die Allel- und Genotypfrequenzen eines jeden Gens wurden mit dem Computerprogramm SAS<sup>®</sup> 8.01 nach Scapietyp getrennt ermittelt und dann mithilfe des Chi-Quadrat-Tests zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren verglichen. Die Ergebnisse wurden durch Fisher's Exakt-Test abgesichert. Des Weiteren wurde in der Gesamtheit der Population die Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft (Hardy, 1908).

## 4 Ergebnisse

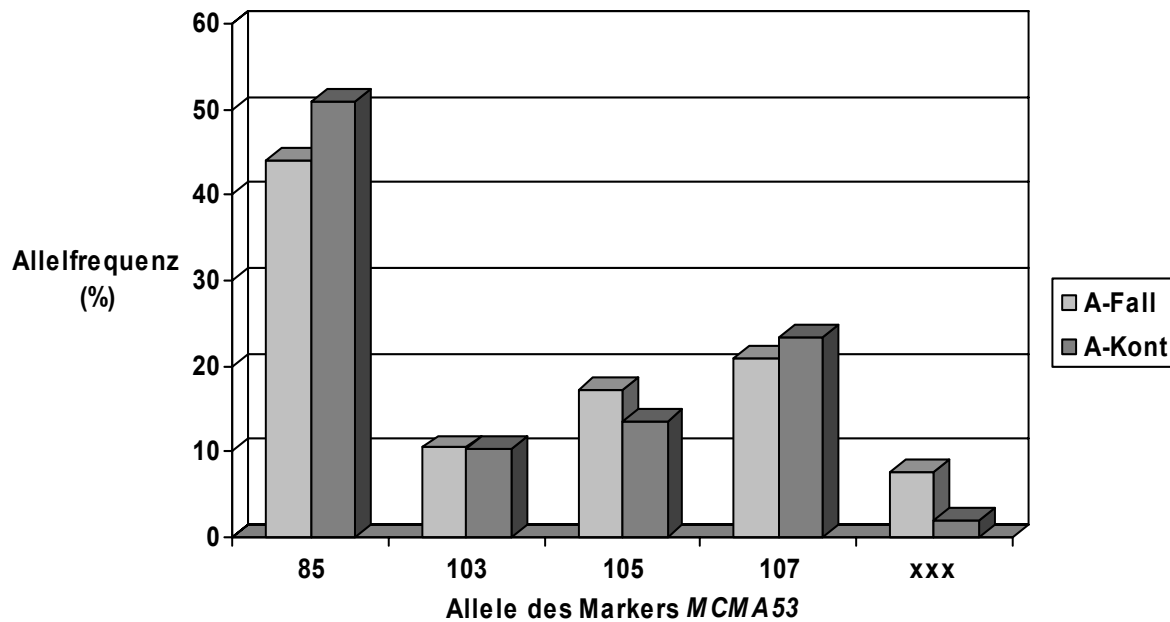
### 4.1 Mikrosatellitenanalyse

Alle typisierten Mikrosatelliten erwiesen sich mit 2 – 10 Allelen als polymorph. Außer den drei Allelen 98, 99 und 100 des Markers *BMS2812* wiesen alle Allele für Dinukleotidrepeats charakteristische Abstände zueinander auf.

In den von klassischer Scrapie betroffenen Herden wurden bei den Mikrosatelliten *BM6507*, *BMS2812*, *MCMA53*, *MCM159* und *RM004* 1 – 2 Allele weniger gefunden als in den von atypischer Scrapie betroffenen Herden. Anders verhielt es sich mit den Markern *CSRD63* und *CSAP26E*. Hier wiesen die von klassischer Scrapie betroffenen Herden ein Allel mehr auf als die von atypischer Scrapie betroffenen Herden. Die Mikrosatelliten *MCMA16* und *UWCA5* zeigten in den Herden beider Scrapietypen die gleichen Allele. Die Gesamtpopulation befand sich im Hinblick auf die Mikrosatelliten *BMS2812*, *CSAP26E*, *CSRD63*, *MCMA16*, *RM004* und *UWCA5* im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Im Bezug auf die Mikrosatelliten *BM6507*, *MCM159* und *MCMA53* zeigte sie Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die aber für alle drei Mikrosatelliten jeweils nur durch einen einzelnen Genotypen hervorgerufen wurden, dessen Erwartungswert weit unter einem Tier lag, von dem tatsächlich aber 1 – 4 Tiere gefunden worden waren.

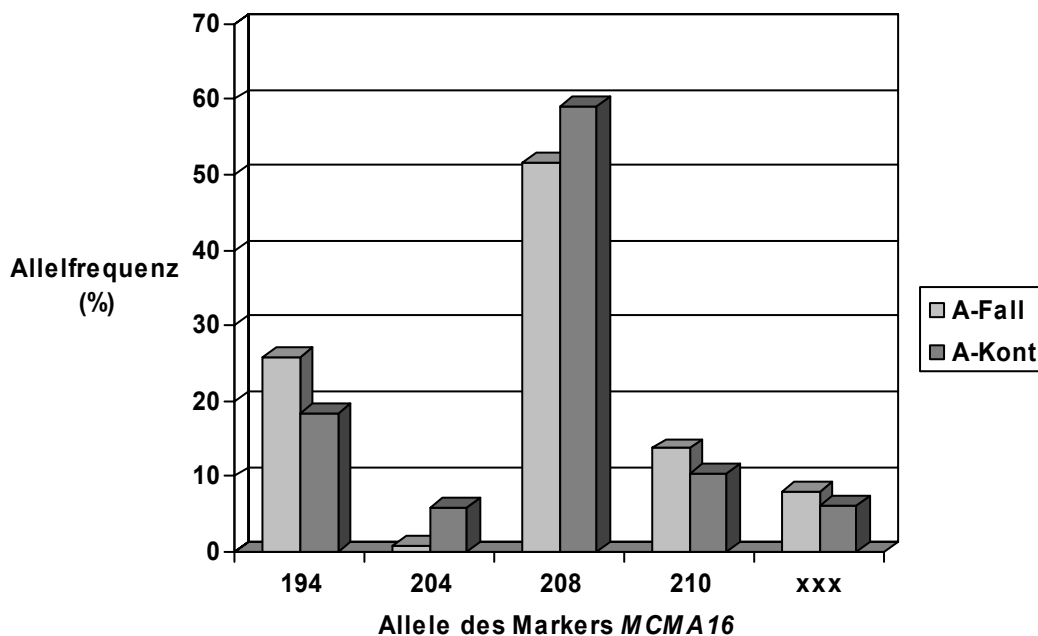
#### 4.1.1 Allelfrequenzen in von atypischer Scrapie betroffenen Herden

Im Vergleich der Allelfrequenzen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren wurde bei dem Mikrosatelliten *MCMA53* ein hoch signifikanter Unterschied detektiert ( $\chi^2 = 13,49$ ,  $P \leq 0,01$ ) (Abbildung 11) (Tabelle 14). Besonders die Gruppe xxx mit den Allelen 101, 109 und 113 wies höchst signifikante Unterschiede zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren auf ( $\chi^2 = 11,56$ ,  $P \leq 0,001$ ).



**Abbildung 11:** Allelfrequenzen des Markers *MCMA53* der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 101, 109 und 113

Für den Marker *MCMA16* wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren festgestellt ( $\chi^2 = 10,77$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Abbildung 12) (Tabelle 14). Hier wies das Allel 204 einen signifikanten Frequenzunterschied zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren auf ( $\chi^2 = 5,56$ ,  $P \leq 0,05$ ). Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests für Allel 194 verfehlte knapp die Signifikanzgrenze von 5% ( $\chi^2 = 3,51$ ,  $P = 0,061$ ).



**Abbildung 12:** Allelfrequenzen des Markers *MCMA16* der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 192, 206 und 212

Die Allelfrequenzen der übrigen Mikrosatelliten (*BM6507*, *BMS2812*, *CSRD63*, *CSAP26E*, *MCMA159*, *RM004*, *UWCA5*) zeigten keine signifikanten Abweichungen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren (Tabelle 14).

Bei den Merinolandschafherden unterschieden sich weder der Mikrosatellit *MCMA53* ( $\chi^2 = 2,52$ ,  $P = 0,47$ ) noch der Mikrosatellit *MCMA16* ( $\chi^2 = 1,08$ ,  $P = 0,78$ ) signifikant in den Allelfrequenzen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren. Die übrigen Marker waren ebenfalls in den Allelfrequenzunterschieden zwischen diesen nicht signifikant (Tabelle 15).

**Tabelle 14: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont) sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl**

|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>BM6507</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|--------|-----|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|------|
|        | n   | 141 <sup>1</sup>                                               | 143 <sup>1</sup> | 145              | 147 <sup>1</sup> | 149 <sup>1</sup> | 151              | 153              | 155              |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 64  | 0,8                                                            | 0,0              | 57,0             | 0,0              | 1,6              | 25,8             | 6,2              | 8,6              | 0,50             | 0,97             |          |      |
| A-Kont | 302 | 1,0                                                            | 0,3              | 56,6             | 0,3              | 0,5              | 25,3             | 5,5              | 10,5             |                  |                  |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>BMS2812</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|        | n   | 88 <sup>1</sup>                                                | 90 <sup>1</sup>  | 94               | 96 <sup>1</sup>  | 98               | 99               | 100              | 102              | 114 <sup>1</sup> | 118 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall | 63  | 0,0                                                            | 0,0              | 11,9             | 0,0              | 36,5             | 19,8             | 24,6             | 7,2              | 0,0              | 0,0              | 5,89     | 0,32 |
| A-Kont | 306 | 1,0                                                            | 0,2              | 14,7             | 1,3              | 34,3             | 16,7             | 22,0             | 9,3              | 0,2              | 0,3              |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>CSRD63</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|        | n   | 131 <sup>1</sup>                                               | 135              | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147              |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 67  | 0,0                                                            | 12,7             | 1,5              | 12,7             | 64,2             | 8,9              |                  |                  |                  | 1,47             | 0,83     |      |
| A-Kont | 302 | 1,1                                                            | 9,6              | 1,2              | 12,6             | 65,9             | 9,6              |                  |                  |                  |                  |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>CSAP26E</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|        | n   | 235                                                            | 237 <sup>1</sup> | 239              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 60  | 10,0                                                           | 0,8              | 89,2             |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 1,29             | 0,53     |      |
| A-Kont | 305 | 13,4                                                           | 1,3              | 85,3             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA16</i> (%) *                |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P                |          |      |
|        | n   | 192 <sup>1</sup>                                               | 194              | 204              | 206 <sup>1</sup> | 208              | 210              | 212 <sup>1</sup> |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 62  | 6,5                                                            | 25,8             | 0,8              | 1,6              | 51,6             | 13,7             | 0,0              |                  |                  | 10,77            | 0,03     |      |
| A-Kont | 306 | 3,8                                                            | 18,5             | 5,9              | 2,3              | 59,1             | 10,3             | 0,1              |                  |                  |                  |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA53</i> (%) **               |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P                |          |      |
|        | n   | 85                                                             | 101 <sup>1</sup> | 103              | 105              | 107              | 109 <sup>1</sup> | 113 <sup>1</sup> |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 67  | 44,0                                                           | 3,0              | 10,4             | 17,2             | 20,9             | 4,5              | 0,0              |                  |                  | 13,49            | 0,009    |      |
| A-Kont | 305 | 50,8                                                           | 0,0              | 10,3             | 13,6             | 23,3             | 1,7              | 0,3              |                  |                  |                  |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCM159</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|        | n   | 122                                                            | 134              | 136              | 138              | 140              | 142 <sup>1</sup> | 146 <sup>1</sup> | 150 <sup>1</sup> | 152              | 154 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall | 67  | 7,5                                                            | 5,2              | 38,1             | 17,2             | 6,7              | 2,2              | 0,0              | 1,5              | 21,6             | 0,0              | 7,93     | 0,24 |
| A-Kont | 306 | 7,7                                                            | 7,0              | 34,1             | 16,8             | 11,9             | 2,0              | 1,0              | 1,5              | 15,5             | 2,5              |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>RM004</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|        | n   | 137 <sup>1</sup>                                               | 139              | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147              | 149              | 151 <sup>1</sup> | 153 <sup>1</sup> | 155 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall | 62  | 0,0                                                            | 8,9              | 4,0              | 18,5             | 55,7             | 4,0              | 8,1              | 0,0              | 0,0              | 0,8              | 8,51     | 0,13 |
| A-Kont | 306 | 0,3                                                            | 12,4             | 5,1              | 14,7             | 45,7             | 5,9              | 12,6             | 0,2              | 0,6              | 2,5              |          |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>UWCA5</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|        | n   | 120                                                            | 124              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall | 67  | 53,0                                                           | 47,0             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 0,75     | 0,39 |
| A-Kont | 304 | 48,8                                                           | 51,2             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |

<sup>1</sup> Seltene Allele mit Frequenzen unter 5% zusammengefasst zur Gruppe xxx, \* signifikant (P ≤ 0,05),

\*\* hoch signifikant (P ≤ 0,01), <sup>n.s.</sup> nicht signifikant

**Tabelle 15: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der atypisch scrapiepositiven Tiere (A-Fall<sup>ML</sup>) und ihrer Kontrolltiere (A-Kont<sup>ML</sup>) aus Merinolandschafherden sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl**

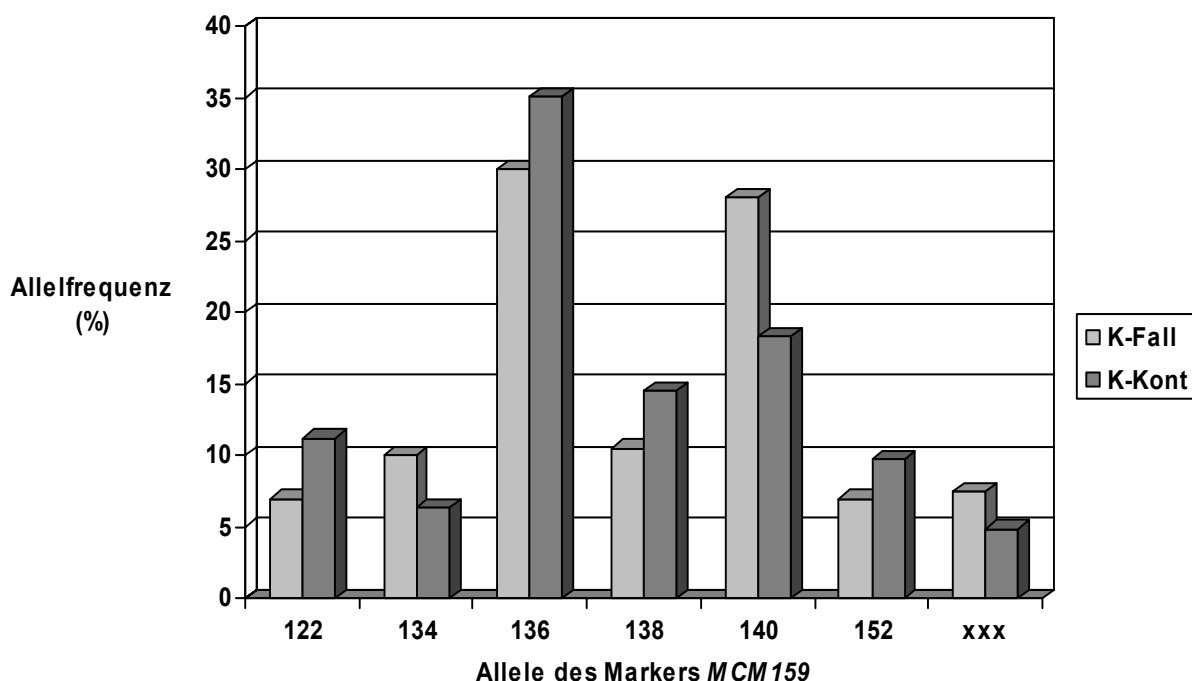
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>BM6507</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|----------------------|----|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------|------|
|                      | n  | 141 <sup>1</sup>                                               | 143 <sup>1</sup> | 145              | 147 <sup>1</sup> | 149 <sup>1</sup> | 151              | 153              | 155              |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 0,0                                                            | 0,0              | 66,7             | 0,0              | 0,0              | 26,7             | 6,6              | 0,0              | 3,32             | 0,50             |          |      |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 54 | 0,9                                                            | 0,0              | 63,9             | 0,9              | 0,0              | 17,6             | 14,8             | 1,9              |                  |                  |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>BMS2812</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|                      | n  | 88 <sup>1</sup>                                                | 90 <sup>1</sup>  | 94               | 96 <sup>1</sup>  | 98               | 99               | 100              | 102              | 114 <sup>1</sup> | 118 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 0,0                                                            | 0,0              | 6,7              | 0,0              | 30,0             | 33,3             | 30,0             | 0,0              | 0,0              | 0,0              | 2,03     | 0,73 |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 56 | 0,0                                                            | 0,0              | 13,4             | 0,0              | 34,8             | 25,9             | 25,0             | 0,9              | 0,0              | 0,0              |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>CSRD63</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|                      | n  | 131 <sup>1</sup>                                               | 135              | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147              |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 0,0                                                            | 13,3             | 0,0              | 10,0             | 60,0             | 16,7             |                  |                  |                  | 0,97             | 0,91     |      |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 54 | 1,9                                                            | 15,7             | 0,0              | 12,0             | 52,8             | 17,6             |                  |                  |                  |                  |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>CSAP26E</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P        |      |
|                      | n  | 235                                                            | 237 <sup>1</sup> | 239              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 13,3                                                           | 0,0              | 86,7             |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 0,53             | 0,47     |      |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 55 | 19,1                                                           | 0,0              | 80,9             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA16</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P                |          |      |
|                      | n  | 192 <sup>1</sup>                                               | 194              | 204              | 206 <sup>1</sup> | 208              | 210              | 212 <sup>1</sup> |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 10,0                                                           | 16,7             | 0,0              | 0,0              | 53,3             | 20,0             | 0,0              |                  |                  | 1,08             | 0,78     |      |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 56 | 7,1                                                            | 17,0             | 0,0              | 0,9              | 61,6             | 13,4             | 0,0              |                  |                  |                  |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA53</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$         | P                |          |      |
|                      | n  | 85                                                             | 101 <sup>1</sup> | 103              | 105              | 107              | 109 <sup>1</sup> | 113 <sup>1</sup> |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 43,3                                                           | 0,0              | 13,3             | 16,7             | 26,7             | 0,0              | 0,0              |                  |                  | 2,52             | 0,47     |      |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 55 | 53,6                                                           | 0,0              | 17,3             | 13,6             | 15,5             | 0,0              | 0,0              |                  |                  |                  |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCM159</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|                      | n  | 122                                                            | 134              | 136              | 138              | 140              | 142 <sup>1</sup> | 146 <sup>1</sup> | 150 <sup>1</sup> | 152              | 154 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 0,0                                                            | 6,7              | 33,3             | 23,3             | 13,3             | 3,4              | 0,0              | 0,0              | 20,0             | 0,0              | 1,32     | 0,97 |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 56 | 0,9                                                            | 3,6              | 36,6             | 18,7             | 12,5             | 4,5              | 0,0              | 0,0              | 23,2             | 0,0              |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>RM004</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|                      | n  | 137 <sup>1</sup>                                               | 139              | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147              | 149              | 151 <sup>1</sup> | 153 <sup>1</sup> | 155 <sup>1</sup> |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 0,0                                                            | 3,3              | 10,0             | 23,3             | 50,0             | 0,0              | 13,4             | 0,0              | 0,0              | 0,0              | 2,87     | 0,72 |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 56 | 0,0                                                            | 8,9              | 4,5              | 18,7             | 47,3             | 1,8              | 17,9             | 0,0              | 0,9              | 0,0              |          |      |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>UWCA5</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P    |
|                      | n  | 120                                                            | 124              |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |
| A-Fall <sup>ML</sup> | 15 | 40,0                                                           | 60,0             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 2,56     | 0,12 |
| A-Kont <sup>ML</sup> | 54 | 56,5                                                           | 43,5             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |          |      |

<sup>1</sup> Seltene Allele mit Frequenzen unter 5% zusammengefasst zur Gruppe xxx, <sup>n.s.</sup> nicht signifikant

#### 4.1.2 Allelfrequenzen in von klassischer Scrapie betroffenen Herden

Die Überprüfung der Allelfrequenzunterschiede zwischen klassisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren ergab für den Mikrosatelliten *MCMA159* einen signifikanten Unterschied ( $\chi^2 = 13,58$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Abbildung 13) (Tabelle 16). Die deutlichsten Frequenzunterschiede waren bei dem Allel 140 zu finden ( $\chi^2 = 6,21$ ,  $P \leq 0,05$ ).

Die Ergebnisse der Mikrosatelliten *MCMA16* und *MCMA53* lagen geringfügig über der Signifikanzgrenze ( $\chi^2 = 7,22$ ,  $P = 0,065$ ,  $\chi^2 = 9,13$ ,  $P = 0,058$ ). Auch keiner der anderen Mikrosatelliten (*BM6507*, *BMS2812*, *CSRD63*, *CSAP26E*, *RM004*, *UWCA5*) wies signifikante Allelfrequenzunterschiede zwischen klassisch scrapiepositiven und Kontrolltieren auf (Tabelle 16).



**Abbildung 13: Allelfrequenzen des Markers *MCMA159* der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont). xxx = Gruppe xxx mit den Allelen 142, 146, 150 und 154**

In der Herde KS, in der 51 Tiere von klassischer Scrapie betroffen waren, ergab die Berechnung der Allelfrequenzen für den Marker *MCMA159* erneut hoch signifikante Abweichungen zwischen positiven Tieren und Kontrolltieren ( $\chi^2 = 16,82$ ,  $P \leq 0,01$ ) (Tabelle 17). Die Allele 122 ( $\chi^2 = 3,90$ ,  $P \leq 0,05$ ), 134 ( $\chi^2 = 3,88$ ,  $P \leq 0,05$ ), 152 ( $\chi^2 = 4,18$ ,  $P \leq 0,05$ ) und die Gruppe xxx mit den Allelen 142, 146, 150 und 154 ( $\chi^2 = 4,74$ ,  $P \leq 0,05$ ) zeigten signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen den scrapiepositiven Tieren und der Kontrollgruppe.

Während der Mikrosatellit *MCMA16* nicht signifikant war ( $\chi^2 = 5,64$ ,  $P = 0,13$ ), wies der Marker *MCMA53* eine erhöhte Signifikanz in den Allelfrequenzunterschieden zwischen den klassisch scrapiepositiven und –negativen Tieren der Herde KS auf ( $\chi^2 = 14,87$ ,  $P \leq 0,01$ ) (Tabelle 17). Die Allele 105 und 107 zeigten hoch signifikante ( $\chi^2 = 8,50$ ,  $P \leq 0,01$ ) bzw. signifikante ( $\chi^2 = 6,39$ ,  $P \leq 0,05$ ) Abweichungen in den Allelfrequenzen zwischen positiven Tieren und Kontrolltieren.

Die Allelfrequenzunterschiede der übrigen Mikrosatelliten (*BM6507*, *BMS2812*, *CSRD63*, *CSAP26E*, *RM004*, *UWCA5*) waren nicht signifikant (Tabelle 17).

**Tabelle 16: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont) sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl**

|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>BM6507</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|--------|-----|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------|------------------|------------------|----------|------------------|------------------|------|
|        | n   | 141 <sup>1</sup>                                               | 145              | 151              | 153              | 155  | 157 <sup>1</sup> |                  |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 96  | 0,0                                                            | 45,3             | 27,6             | 6,3              | 20,3 | 0,5              | 7,43             | 0,11     |                  |                  |      |
| K-Kont | 134 | 0,4                                                            | 54,5             | 28,0             | 4,8              | 11,9 | 0,4              |                  |          |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>BMS2812</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 88 <sup>1</sup>                                                | 94               | 96 <sup>1</sup>  | 98               | 99   | 100              | 102              |          |                  | 118 <sup>1</sup> |      |
| K-Fall | 99  | 0,0                                                            | 21,2             | 0,0              | 33,3             | 20,7 | 16,7             | 7,6              | 0,5      | 3,80             | 0,58             |      |
| K-Kont | 133 | 0,8                                                            | 16,9             | 1,1              | 32,3             | 20,3 | 20,7             | 7,9              | 0,0      |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>CSRD63</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 131                                                            | 135 <sup>1</sup> | 139 <sup>1</sup> | 141 <sup>1</sup> | 143  | 145              | 147              |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 100 | 7,5                                                            | 4,5              | 0,5              | 2,0              | 21,5 | 49,0             | 15,0             | 2,11     | 0,72             |                  |      |
| K-Kont | 133 | 7,5                                                            | 3,8              | 0,0              | 1,5              | 17,7 | 54,5             | 15,0             |          |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>CSAP26E</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 235                                                            | 237 <sup>1</sup> | 239              | 241 <sup>1</sup> |      |                  |                  |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 90  | 6,7                                                            | 0,5              | 92,8             | 0,0              | 0,10 | 0,95             |                  |          |                  |                  |      |
| K-Kont | 133 | 7,1                                                            | 0,4              | 92,1             | 0,4              |      |                  |                  |          |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA16</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 192 <sup>1</sup>                                               | 194              | 204 <sup>1</sup> | 206              | 208  | 210 <sup>1</sup> | 212 <sup>1</sup> |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 97  | 0,5                                                            | 24,7             | 2,6              | 6,7              | 63,9 | 1,6              | 0,0              | 7,22     | 0,07             |                  |      |
| K-Kont | 133 | 0,7                                                            | 22,2             | 5,3              | 5,3              | 60,9 | 4,9              | 0,7              |          |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA53</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 85                                                             | 101 <sup>1</sup> | 103              | 105              | 107  | 109 <sup>1</sup> |                  |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 100 | 63,0                                                           | 0,5              | 4,5              | 3,5              | 27,0 | 1,5              | 9,13             | 0,06     |                  |                  |      |
| K-Kont | 134 | 63,1                                                           | 0,4              | 7,8              | 7,4              | 18,7 | 2,6              |                  |          |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>MCM159</i> (%) *                |                  |                  |                  |      |                  |                  |          |                  | $\chi^2$         | P    |
|        | n   | 122                                                            | 134              | 136              | 138              | 140  | 142 <sup>1</sup> | 150 <sup>1</sup> | 152      | 154 <sup>1</sup> |                  |      |
| K-Fall | 100 | 7,0                                                            | 10,0             | 30,0             | 10,5             | 28,0 | 2,0              | 5,5              | 7,0      | 0,0              | 13,58            | 0,04 |
| K-Kont | 134 | 11,2                                                           | 6,3              | 35,1             | 14,5             | 18,3 | 1,1              | 1,9              | 9,7      | 1,9              |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>RM004</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 139                                                            | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147  | 149              | 153 <sup>1</sup> |          |                  | 155 <sup>1</sup> |      |
| K-Fall | 97  | 9,8                                                            | 4,6              | 14,9             | 49,5             | 5,7  | 7,2              | 0,0              | 8,3      | 3,51             | 0,62             |      |
| K-Kont | 133 | 13,9                                                           | 5,3              | 15,0             | 50,7             | 3,8  | 6,8              | 0,4              | 4,1      |                  |                  |      |
|        |     | Allelfrequenzen des Markers <i>UWCA5</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |      |
|        | n   | 120                                                            | 124              |                  |                  |      |                  |                  |          |                  |                  |      |
| K-Fall | 98  | 50,5                                                           | 49,5             | 0,01             | 0,96             |      |                  |                  |          |                  |                  |      |
| K-Kont | 134 | 50,7                                                           | 49,3             |                  |                  |      |                  |                  |          |                  |                  |      |

<sup>1</sup> Seltene Allele mit Frequenzen unter 5% zusammengefasst zur Gruppe xxx, \* signifikant (P < 0,05), <sup>n.s.</sup> nicht signifikant

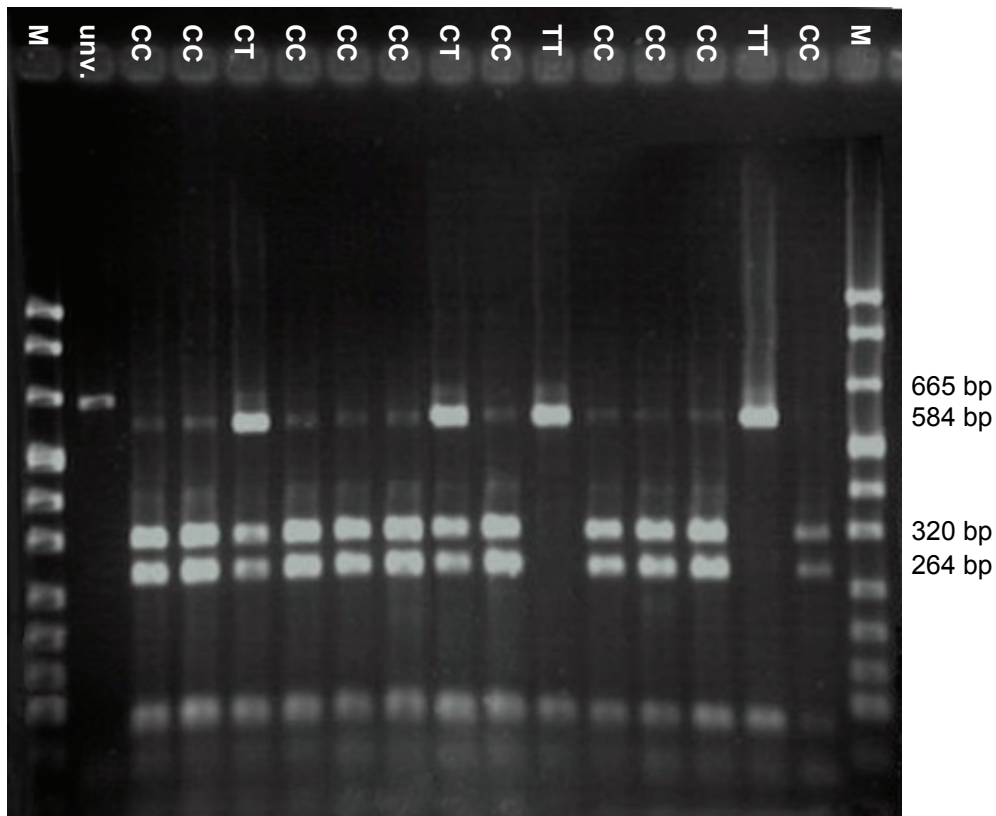
**Tabelle 17: Allelfrequenzen der Mikrosatelliten der klassisch scrapiepositiven Tiere (K-Fall<sup>KS</sup>) und ihrer Kontrolltiere (K-Kont<sup>KS</sup>) aus der Herde KS sowie die Ergebnisse der Assoziationsanalyse. n = Tierzahl**

|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>BM6507</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$         | P        |                  |                  |
|----------------------|----|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------|------------------|------------------|------------------|----------|------------------|------------------|
|                      | n  | 141 <sup>1</sup>                                               | 145              | 151              | 153              | 155  | 157 <sup>1</sup> |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 49 | 0,0                                                            | 51,0             | 15,3             | 9,2              | 24,5 | 0,0              | 6,85             | 0,14             |          |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 1,0                                                            | 66,0             | 13,0             | 7,0              | 13,0 | 0,0              |                  |                  |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>BMS2812</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |      |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |
|                      | n  | 88 <sup>1</sup>                                                | 94               | 96 <sup>1</sup>  | 98               | 99   | 100              | 102              | 118 <sup>1</sup> |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 51 | 0,0                                                            | 16,7             | 0,0              | 33,3             | 22,5 | 21,6             | 4,9              | 1,0              | 0,81     | 0,98             |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 49 | 1,0                                                            | 16,3             | 0,0              | 29,6             | 22,5 | 26,5             | 4,1              | 0,0              |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>CSRD63</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$         | P        |                  |                  |
|                      | n  | 131                                                            | 135 <sup>1</sup> | 139 <sup>1</sup> | 141 <sup>1</sup> | 143  | 145              | 147              |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 51 | 0,0                                                            | 4,9              | 0,0              | 3,9              | 23,5 | 46,1             | 21,6             | 4,23             | 0,38     |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 3,0                                                            | 3,0              | 0,0              | 2,0              | 24,0 | 48,0             | 20,0             |                  |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>CSAP26E</i> (%) <sup>n.s.</sup> |                  |                  |                  |      | $\chi^2$         | P                |                  |          |                  |                  |
|                      | n  | 235                                                            | 237 <sup>1</sup> | 239              | 241 <sup>1</sup> |      |                  |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 48 | 6,3                                                            | 0,0              | 93,7             | 0,0              | 0,04 | 0,83             |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 7,0                                                            | 0,0              | 93,0             | 0,0              |      |                  |                  |                  |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA16</i> (%) <sup>n.s.</sup>  |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$         | P        |                  |                  |
|                      | n  | 192 <sup>1</sup>                                               | 194              | 204 <sup>1</sup> | 206              | 208  | 210 <sup>1</sup> | 212 <sup>1</sup> |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 50 | 0,0                                                            | 30,0             | 1,0              | 6,0              | 64,0 | 1,0              | 0,0              | 5,64             | 0,13     |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 49 | 0,0                                                            | 21,4             | 1,0              | 1,0              | 71,4 | 3,1              | 2,1              |                  |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMA53</i> (%) <sup>**</sup>    |                  |                  |                  |      |                  | $\chi^2$         | P                |          |                  |                  |
|                      | n  | 85                                                             | 101 <sup>1</sup> | 103              | 105              | 107  | 109 <sup>1</sup> |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 51 | 61,8                                                           | 0,0              | 2,9              | 0,0              | 32,4 | 2,9              | 14,87            | 0,005            |          |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 69,0                                                           | 0,0              | 5,0              | 8,0              | 17,0 | 1,0              |                  |                  |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>MCMI59</i> (%) <sup>*</sup>     |                  |                  |                  |      |                  |                  |                  | $\chi^2$ | P                |                  |
|                      | n  | 122                                                            | 134              | 136              | 138              | 140  | 142 <sup>1</sup> | 150 <sup>1</sup> | 152              |          |                  | 154 <sup>1</sup> |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 51 | 7,8                                                            | 9,8              | 30,4             | 14,7             | 23,5 | 2,0              | 8,8              | 3,0              | 0,0      | 16,82            | 0,01             |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 17,0                                                           | 3,0              | 32,0             | 18,0             | 17,0 | 2,0              | 1,0              | 10,0             | 0,0      |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>RM004</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$         | P        |                  |                  |
|                      | n  | 139                                                            | 141 <sup>1</sup> | 143              | 145              | 147  | 149              | 153 <sup>1</sup> |                  |          | 155 <sup>1</sup> |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 50 | 10,0                                                           | 6,0              | 16,0             | 54,0             | 9,0  | 5,0              | 0,0              | 0,0              | 2,37     | 0,80             |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 49 | 11,2                                                           | 5,1              | 12,3             | 62,2             | 5,1  | 4,1              | 0,0              | 0,0              |          |                  |                  |
|                      |    | Allelfrequenzen des Markers <i>UWCA5</i> (%) <sup>n.s.</sup>   |                  |                  |                  |      |                  |                  | $\chi^2$         | P        |                  |                  |
|                      | n  | 120                                                            | 124              |                  |                  |      |                  |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Fall <sup>KS</sup> | 50 | 55,0                                                           | 45,0             | 0,08             | 0,78             |      |                  |                  |                  |          |                  |                  |
| K-Kont <sup>KS</sup> | 50 | 57,0                                                           | 43,0             |                  |                  |      |                  |                  |                  |          |                  |                  |

<sup>1</sup> Seltene Allele mit Frequenzen unter 5% zusammengefasst zur Gruppe xxx, \* signifikant (P < 0,05),

\*\* hoch signifikant (P < 0,01), <sup>n.s.</sup> nicht signifikant





**Abbildung 15: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des neunten Introns des ovinen *Cathepsin B*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten Fragmente in der Größe von 320 bp und 264 bp, Tiere des Genotyps TT wiesen stattdessen ein 584 bp großes Fragment auf. Heterozygote Tiere (CT) zeigten alle drei Fragmente im Gelbild. Ein Kontrollschnitt gewährleistete die Funktionsfähigkeit des Systems, indem die Größe des Amplifikates von 665 bp auf 584 bp reduziert wurde. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, unv. = unverdautes PCR-Produkt**

Für den Polymorphismus konnte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht detektiert werden. In den von atypischer Scrapie betroffenen Herden konnten weder in den Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 0,48$ ,  $P = 0,79$ ) noch in den Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 0,21$ ,  $P = 0,64$ ) signifikante Unterschiede zwischen positiven Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden (Tabelle 18, Tabelle 19).

**Tabelle 18: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des Intron 9 des ovinen *Cathepsin B* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl**

| Genotyp | atypische Scrapie                        |                                          | klassische Scrapie                       |                                          |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|         | Kontrolltiere<br>(n = 298 <sup>1</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 66 <sup>1</sup> ) | Kontrolltiere<br>(n = 138 <sup>2</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 97 <sup>3</sup> ) |
| CC      | 62,1                                     | 60,6                                     | 67,4                                     | 67,0                                     |
| CT      | 32,5                                     | 31,8                                     | 29,0                                     | 32,0                                     |
| TT      | 5,4                                      | 7,6                                      | 3,6                                      | 1,0                                      |

<sup>1</sup> 6 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>2</sup> 1 Tier war nicht typisierbar, <sup>3</sup> 7 Tiere waren nicht typisierbar

Klassisch scrapiepositive Tiere unterschieden sich ebenfalls weder in den Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 1,67$ ,  $P = 0,43$ ) noch in den Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 0,10$ ,  $P = 0,76$ ) von den zugehörigen Kontrolltieren (Tabelle 18, Tabelle 19).

**Tabelle 19: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des Intron 9 des ovinen *Cathepsin B* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.**

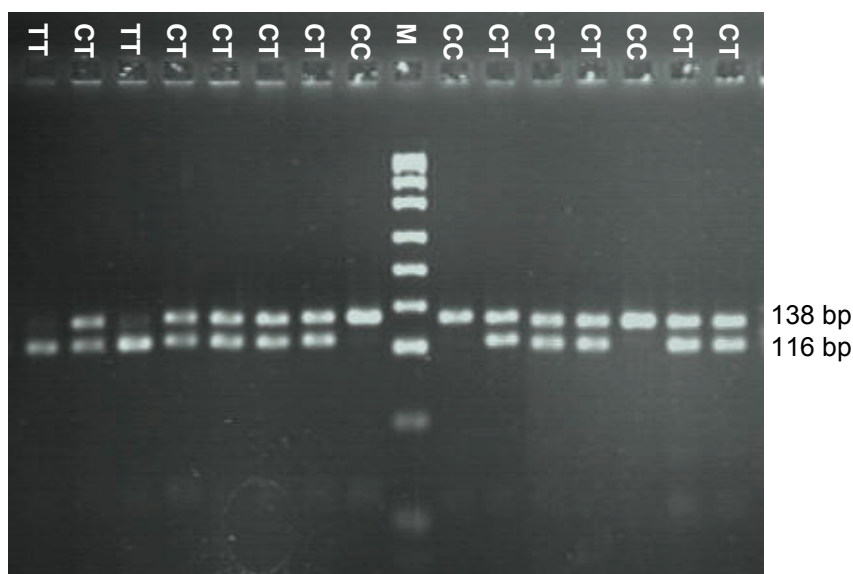
| Allel | atypische Scrapie |                | klassische Scrapie |                |
|-------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
|       | Kontrolltiere     | positive Tiere | Kontrolltiere      | positive Tiere |
| C     | 78,4              | 76,5           | 81,9               | 83,0           |
| T     | 21,6              | 23,5           | 18,1               | 17,0           |



(Abbildung 16). All diese Mutationen traten in der Population jedoch nur vereinzelt auf und wurden deshalb nicht als Marker für die Assoziationsstudie herangezogen.

Zum Nachweis des Polymorphismus an Position 12 des neunten Exons wurde ein Restriktionsverdau entwickelt: Bei Vorhandensein der Base T lag eine Schnittstelle für das Enzym *Bse*YI vor. Tiere des Genotyps CC wiesen ein 138 bp großes Fragment, Tiere des Genotyps TT ein 116 bp großes Fragment im Gelbild auf. (Der hierbei anfallende Abschnitt von 22 bp konnte im Gelbild aufgrund seiner geringen Größe nicht detektiert werden.) Heterozygote Tiere zeigten Fragmente beider Größen (138 bp und 116 bp) im Agarosegel (Abbildung 17).

Die Population befand sich im Hinblick auf den untersuchten Polymorphismus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Weder die Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 0,16$ ,  $P = 0,92$ ) noch die Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 0,17$ ,  $P = 0,68$ ) der atypisch scrapiepositiven Tiere unterschieden sich signifikant von denen der Kontrolltiere (Tabelle 20, Tabelle 21). Im Vergleich der Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 3,96$ ,  $P = 0,14$ ) und Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 1,58$ ,  $P = 0,21$ ) zwischen klassisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren wurden ebenfalls keine signifikanten Abweichungen festgestellt (Tabelle 20, Tabelle 21).



**Abbildung 17: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten ein 138 bp großes Fragment, der Genotyp TT wies ein 116 bp großes Fragment auf. Heterozygote Tiere (CT) zeigten beide Fragmente im Gelbild. M = pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) Marker, 23**

**Tabelle 20: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl**

| Genotyp | atypische Scrapie                        |                                          | klassische Scrapie                       |                                          |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|         | Kontrolltiere<br>(n = 296 <sup>1</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 67 <sup>2</sup> ) | Kontrolltiere<br>(n = 134 <sup>2</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 99 <sup>2</sup> ) |
| CC      | 33,5                                     | 31,3                                     | 31,3                                     | 20,2                                     |
| CT      | 45,9                                     | 46,3                                     | 44,0                                     | 54,5                                     |
| TT      | 20,6                                     | 22,4                                     | 24,6                                     | 25,3                                     |

<sup>1</sup> 8 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>2</sup> 5 Tiere waren nicht typisierbar

**Tabelle 21: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.**

| Allel | atypische Scrapie |                | klassische Scrapie |                |
|-------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
|       | Kontrolltiere     | positive Tiere | Kontrolltiere      | positive Tiere |
| C     | 56,4              | 54,5           | 53,4               | 47,5           |
| T     | 43,6              | 45,5           | 46,6               | 52,5           |

#### 4.2.3 Calpain, Large Polypeptide L2

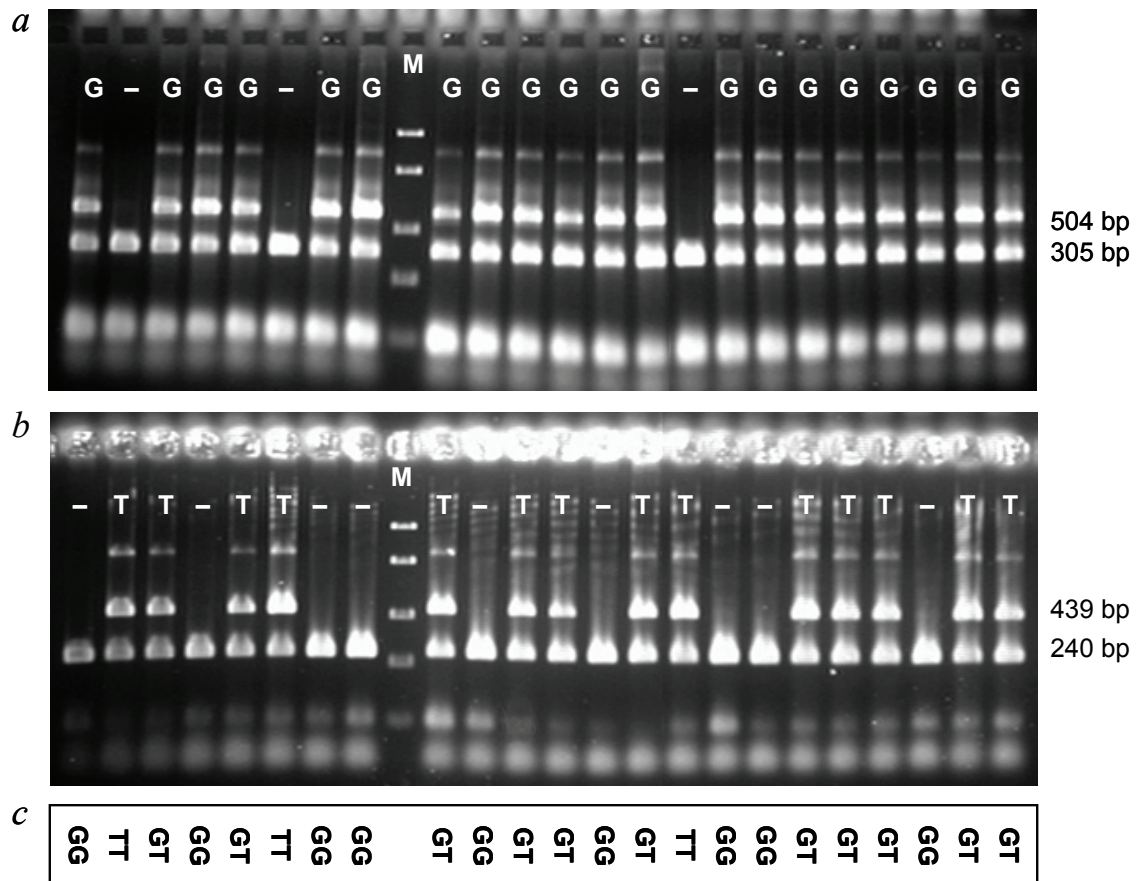
Die Sequenzierung des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* ergab eine 519 bp lange Sequenz, die im Promotorbereich beginnt und im Exon 1 endet. Durch ein Alignment mit der humanen Gensequenz (Hata et al., 1989) (GenBank Nr.: J04700) konnte der Beginn des ersten Exons und der kodierenden Sequenz festgelegt werden (Abbildung 18). Im Promotorbereich und Exon 1 des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* wurde unter Nutzung des Programms „Sequence Manipulation Suite: CpG Islands“ (Stothard, 2000) eine CpG-Insel detektiert, die sich über die gesamte untersuchte Sequenz erstreckt. Weiterhin wurden zwei G/C-Boxen in der Sequenz detektiert.

An der 191. Position vor Beginn des ersten Exons konnte eine Nukleotidsubstitution von G gegen T detektiert werden (Abbildung 18). Das Programm „MatInspector“ identifizierte bei Vorliegen des G-Allels eine potentielle Bindungsstelle für das Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (IA-1), die sich ab der 184. Base vor Beginn des ersten Exons über 13 Basenpaare erstreckte (tgcccggggtgct) (siehe Abbildung). Diese wurde bei Vorliegen des T-Allels nicht detektiert.

|     |                                                             |                                 |
|-----|-------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|     | Promotor                                                    | Nukleotidsubstitution: G>T<br>↓ |
| Hsa | cccaactctggaccgcgatttcgcgagcctccccggcgccgggc---cgt          |                                 |
| Oar | cccgcctttccaccgggatgccc <u>g</u> -gggtgctcgagccggcccgctcgg  | ↔                               |
| Hsa | gcatccccgggagctgtccgcagatggcagcaccggcc--cgtgtcgcg           |                                 |
| Oar | ccatccccgggcgccgtccgcaggtggcagcaccggcccccgcgggcccgcg        |                                 |
| Hsa | cgttc---ccggcgctcggcaggccgagatggc-----tggtccccgggcc         |                                 |
| Oar | ccgtccggctggcgctgtgcaggccgcg--ggccgcaggggtccccgggtg         |                                 |
| Hsa | gggagcccagcaggccgggagcggctgaggccacacccccgcggggccggg         |                                 |
| Oar | gggcgccgagcaggccgggagcggc-caggccacgccgcagggcggagg           |                                 |
|     | Exon 1                                                      |                                 |
| Hsa | ccgcttc--cctccggtgAATCATCGCTCGCAGCGGCGGGCGCCCGCAGTG         |                                 |
| Oar | gcgccgcgggacccggtgAATCATCGCCGGCGGGCGGC--CGCTCACAGT-         |                                 |
| Hsa | GCCGCAGCAGGCCGCCGGGCCCTGGCCGCGCCCCAGCCGAGCGCAGCGCG          |                                 |
| Oar | CCCGCTGCCGCGCGCCGGGCCCTGGCCGCGCCCCTGCCGAGCGCCGCTCA          |                                 |
| Hsa | GAGTCGC-----CCCGACCTTTCTCTGC-----GCAGTACGGCCGCC             |                                 |
| Oar | TCGCCGAGCCGAGACCCTCGCTCGCTCGCCGGCGGCAGCGCGGGCACC            |                                 |
|     | CDS                                                         |                                 |
| Hsa | GGGACCGCAGC <u>ATGG</u> CGGGCATCGCGGCCAAGCTGGCGAAGGACCGGGAG |                                 |
| Oar | GGG--CCAACC <u>ATGG</u> CGGGCATCGCGGCCAAGCTGGCCAAGGACCGGGAG |                                 |
| Hsa | GCGGCCGAGGGGCTGGGCTCCACGAGAGGGCCATCAAGTACCTCAACCA           |                                 |
| Oar | GCGGCCGAGGGGCTGGGCTCGCACGAGAGGGCGGTCAAGTACCTCAACCA          |                                 |
| Hsa | GGACTACGAGGCGCTGCGGAACGAGTGCCTCGAGGCCGGGACGCTCTTCC          |                                 |
| Oar | GGACTACGCGGCGCTGCGGGACGAGTGCCTGGAGGCCGGGGCGCTGTTCC          |                                 |
| Hsa | AGGACCCGTCCTTCCC GGCCATCCCCTC                               |                                 |
| Oar | AGGACCCCTCCTTCCC GGCCCTGCCTTC                               |                                 |

**Abbildung 18:** Partielle Sequenz des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* (Oar) im Alignment mit einem Teil der humanen Gensequenz (Hsa) (Hata et al., 1989, GenBank Nr.: J04700) beginnend im Promotor endend im Exon 1. Das Startcodon ist kursiv und unterstrichen dargestellt. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben geschrieben. An der 191. Position vor Beginn des ersten Exons wurde eine Nukleotidsubstitution detektiert. Bei Vorliegen des G-Allels wurde an dieser Position eine potentielle Bindungsstelle für das Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (↔) detektiert. CDS = kodierende Sequenz

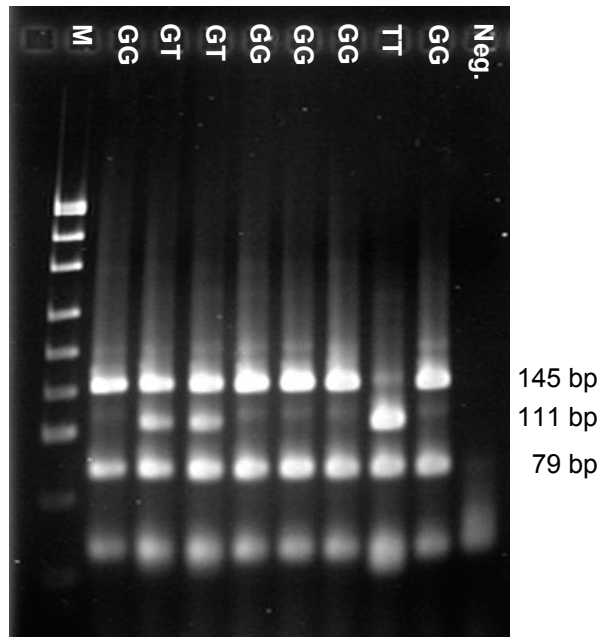
Der Polymorphismus G>T im ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* wurde durch ASPCR nachgewiesen. Es wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen entwickelt, die nur das G-Allel bzw. nur das T-Allel amplifizierten. Um falsch-negative Resultate durch eventuelle PCR-Ausfälle auszuschließen, wurde zusätzlich ein kleineres Kontrollfragment amplifiziert. Durch Kombination der Testergebnisse konnte der Genotyp der getesteten Tiere ermittelt werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Allelspezifische PCR zur Differenzierung der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons in der Promotorregion des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2*. Das G-Allel mit einer Größe von 504 bp (a) und das T-Allel mit einer Größe von 439 bp (b) wurden in zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen nachgewiesen. Kleinere Kontrollfragmente (305 bp und 240 bp) schlossen falsch-negative Resultate aus: Lag das getestete Allel also nicht vor, war nur das Kontrollfragment auf dem Gelbild zu sehen (-). Durch Kombination der Ergebnisse beider PCR-Amplifikationen konnte der Genotyp der Tiere bestimmt werden (c). M = FastRuler™ DNA Ladder, Low Range, ready-to-use**

Zur Absicherung des Testergebnisses wurde ein Teil der Proben (siehe 3.4.4.4) in einer nested PCR amplifiziert und das Produkt mit Hilfe eines RFLPs typisiert. Diese Methode wies eine überaus hohe Sensitivität auf, weswegen sie sich gut zur Bestätigung der Testergebnisse aus der ASPCR eignete. Als alleinige Testmethode wurde sie wegen des erhöhten Arbeits- und Kostenaufwandes, des Vorhandenseins überflüssiger Schnittstellen und der hohen

Anfälligkeit für Kontamination nicht verwendet. Tiere des Genotyps GG wiesen eine 145 bp große Bande im Agarosegel auf. Durch die Base T an der fraglichen Position entstand eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *MvaI*, so dass Tiere, die den Genotyp TT trugen, ein 111 bp großes Fragment im Gelbild zeigten. Bei heterozygoten Tieren (GT) waren beide Banden zu sehen. Eine Kontrollschnittstelle im PCR-Amplifikat gewährleistete die einwandfreie Funktion des Enzyms und führte zu einem 79 bp großen Fragment im Gelbild (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Restriktionsverdau zur Absicherung der Ergebnisse im Bezug auf den Nachweis der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen *Calpain*, *Large Polypeptide L2*. Tiere mit dem Genotyp GG wiesen ein 145 bp großes Fragment im Gelbild auf. TT-homozygote Tiere zeigten eine Bande in der Größe von 111 bp im Gelbild. Bei heterozygoten Tieren (GT) waren Fragmente beider Größen zu sehen. Ein Kontrollschnitt produzierte eine 79 bp große Bande im Gelbild. Die Negativkontrolle (Neg.) war wegen der hohen Sensitivität der nested PCR obligatorisch. M = pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker, 23**

Die Gesamtpopulation befand sich bezüglich der untersuchten Mutation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Weder im Hinblick auf klassische Scrapie ( $\chi^2 = 0,94$ ,  $P = 0,62$ ) noch auf atypische Scrapie ( $\chi^2 = 0,67$ ,  $P = 0,76$ ) konnten zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren signifikante Abweichungen der Genotypfrequenzen festgestellt werden (Tabelle 22). Auch in den Allelfrequenzen unterschieden sich klassisch ( $\chi^2 = 0,94$ ,  $P = 0,33$ ) und atypisch ( $\chi^2 = 0,69$ ,  $P = 0,41$ ) scrapiepositive Tiere nicht signifikant von den Kontrolltieren (Tabelle 23).

**Tabelle 22: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl**

| Genotyp | atypische Scrapie                        |                                          | klassische Scrapie         |                                          |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------|
|         | Kontrolltiere<br>(n = 302 <sup>1</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 68 <sup>2</sup> ) | Kontrolltiere<br>(n = 139) | positive Tiere<br>(n = 99 <sup>3</sup> ) |
| GG      | 51,3                                     | 55,9                                     | 55,4                       | 50,5                                     |
| GT      | 38,8                                     | 36,8                                     | 36,7                       | 38,4                                     |
| TT      | 9,9                                      | 7,3                                      | 7,9                        | 11,1                                     |

<sup>1</sup> 2 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>2</sup> 4 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>3</sup> 5 Tiere waren nicht typisierbar

**Tabelle 23: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im Promotorbereich des ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.**

| Allel | atypische Scrapie |                | klassische Scrapie |                |
|-------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
|       | Kontrolltiere     | positive Tiere | Kontrolltiere      | positive Tiere |
| G     | 70,7              | 74,3           | 73,7               | 69,7           |
| T     | 29,3              | 25,7           | 26,3               | 30,3           |

#### 4.2.4 Kallikrein 1

Die Sequenzierung des ovinen *Kallikrein 1* ergab eine 1136 bp lange Sequenz, die einen Teil des dritten Exons, das komplette Intron 3, Exon 4 und Intron 4 sowie den Anfang des fünften Exons beinhaltet. In Intron 4 wurde eine Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 detektiert (Abbildung 21).

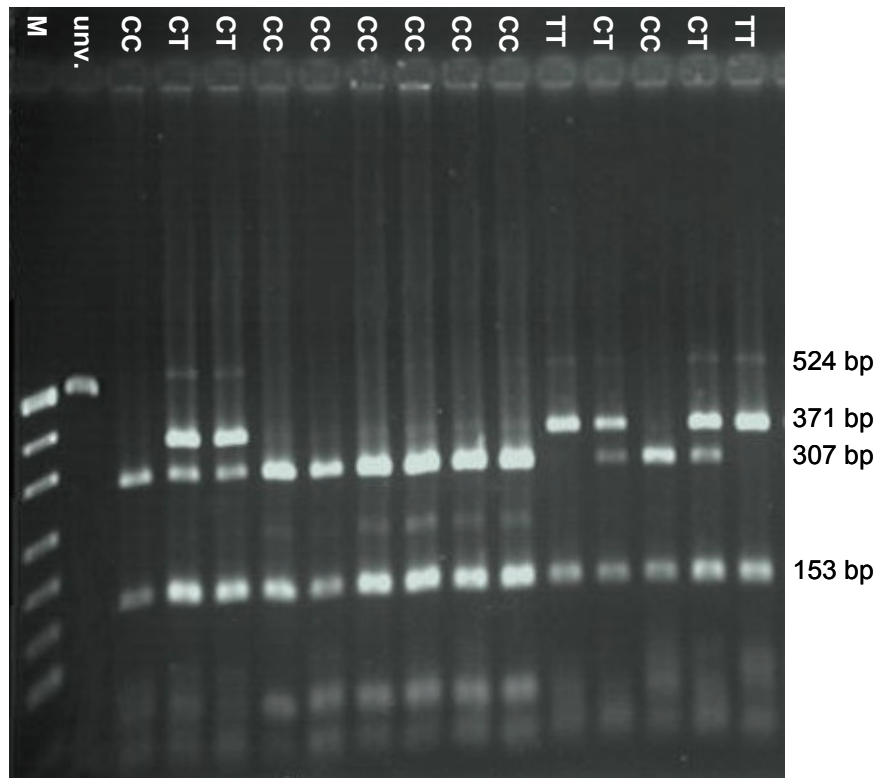
Der zur routinemäßigen Identifikation des Polymorphismus entwickelte Restriktionsverdau produzierte stets ein Kontrollfragment von 153 bp. Des Weiteren wurde bei Vorliegen eines T-Allels ein 371 bp großes Fragment im Agarosegel detektiert. Bei Vorhandensein der Base C an Position 392 des vierten Introns entstand eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *BsmFI*, so dass ein 307 bp großes Fragment identifiziert werden konnte. TT-homozygote Tiere konnten also durch eine 371 bp große Bande, CC-homozygote Tiere durch eine 307 bp große Bande identifiziert werden. Heterozygote Tiere wiesen beide Banden im Gelbild auf (Abbildung 22).

Die Gesamtpopulation befand sich an diesem Genort im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bei den von atypischer Scrapie betroffenen Herden ergaben sich weder in den Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 0,68$ ,  $P = 0,71$ ) noch in den Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 0,04$ ,  $P = 0,84$ ) signifikante Unterschiede zwischen positiven Tieren und Kontrolltieren (Tabelle 24, Tabelle 25). In den von klassischer Scrapie betroffenen Herden war der Unterschied in den Genotypfrequenzen

( $\chi^2 = 3,65$  P = 0,16) zwischen scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren nicht signifikant und lag auch bei den Allelfrequenzen knapp über der Signifikanzgrenze ( $\chi^2 = 3,37$ , P = 0,066) (Tabelle 24, Tabelle 25).

|                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Exon 3                                                                                     |
| ...GAGGACTTCCAAATCCGGGATTCAACCTGAGCCTCCTGGAAAACCACACCCGCCA                                 |
| GCCAGGAGAGGACTACAGCCACGACCTCATGCTGCTTCGTCTGCAGGAGCCCGTC                                    |
| CAGCTCACACAGGACGTGCAGGTCCTGGGTCTGCCCACCAAGGAACCCCAACTGG                                    |
| GGACGACCTGCTATGCCTCCGGCTGGGGCAGCGTCAAGCCAGATGAGTGTATGCT                                    |
| Intron 3                                                                                   |
| GGCGTCCAGAcggtgcaccgtggagccccgggcaccggggtgtgcgggaggagggggccaggacctaactcgagagt              |
| ctgaggaggaggggtgagggtgtggggcttgcccgagccgcgtctctccctggcccgcagTCTCTTACCCAGACGA               |
| TCTCCAGTGTGTGGACCTCACCTCCTACCCAATGAGAAGTGTGCCACAGCCCACC                                    |
| CCCAGGAGGTGACAGACTGCATGCTGTGTGCTGGACACCTGGAGGGCGGCAAGGA                                    |
| Intron 4                                                                                   |
| CACCTGCGTGgtgagccagcctgccccctctccagcctccaggcctgaagtgtgggggccccggggtcagattctgcgt            |
| ggggttcagagctaagcaggcaaccgtctccatcgcttcgcagctgtagcttctaccccccttctctctgtagccccaacctccacaca  |
| catcagagttcacgcgttctccctctgacacacatttcgggtccagtcagagaaagcctggggagaggtgagcttgagggtgggcggg   |
| tcctgtagggtcctgctctctccgcactgacctgcctgccgggaccatcttctctgaatcctgaatcctgccaccctgggcaggcac    |
| Nukleotidsubstitution: C>T                                                                 |
| ↓                                                                                          |
| tggacctgagactccctccccatcggcaggactcgagccactgtccctctctgcggaatccgcgctgatgttcttaaggagtgaggctct |
| ggagacaactatctcttctccagagatggggagttactgtctggatctgtgactcgcgtctaagtctagagctcaccaggcaaacct    |
| Exon 5                                                                                     |
| caagtctttgtaacctctctcacactctccccctccccctttgtgtgtagGGTGA                                    |
| CGAGGGTATGTTGCAAGGAATCACGTCATGGGGCC...                                                     |

**Abbildung 21: Partielle Sequenz des ovinen *Kallikrein 1*, beginnend im Exon 3, endend im Exon 5, mit Nukleotidsubstitution an Position 392 des vierten Introns. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt.**



**Abbildung 22: Restriktionsverdau zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen *Kallikrein 1*. Tiere mit dem Genotyp CC zeigten ein 307 bp großes Fragment, Tiere mit dem Genotyp TT wiesen ein 371 bp großes Fragment im Gelbild auf. Bei heterozygoten Tieren (CT) waren beide Fragmente zu sehen. Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Systems wurde ein 153 bp großes Kontrollfragment produziert. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, unv. = unverdautes PCR-Produkt**

**Tabelle 24: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen *Kallikrein 1* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl**

| Genotyp | atypische Scrapie                        |                                          | klassische Scrapie                       |                                          |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|         | Kontrolltiere<br>(n = 297 <sup>1</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 69 <sup>2</sup> ) | Kontrolltiere<br>(n = 134 <sup>3</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 99 <sup>3</sup> ) |
| CC      | 61,6                                     | 60,9                                     | 79,1                                     | 69,7                                     |
| CT      | 31,7                                     | 34,8                                     | 20,1                                     | 27,3                                     |
| TT      | 6,7                                      | 4,3                                      | 0,8                                      | 3,0                                      |

<sup>1</sup> 7 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>2</sup> 3 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>3</sup> 5 Tiere waren nicht typisierbar

**Tabelle 25: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 392 des vierten Introns des ovinen *Kallikrein 1* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.**

| Allel | atypische Scrapie |                | klassische Scrapie |                |
|-------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
|       | Kontrolltiere     | positive Tiere | Kontrolltiere      | positive Tiere |
| C     | 77,4              | 78,3           | 89,2               | 83,3           |
| T     | 22,6              | 21,7           | 10,8               | 16,7           |

#### 4.2.5 Transforming Growth Factor, $\beta 1$

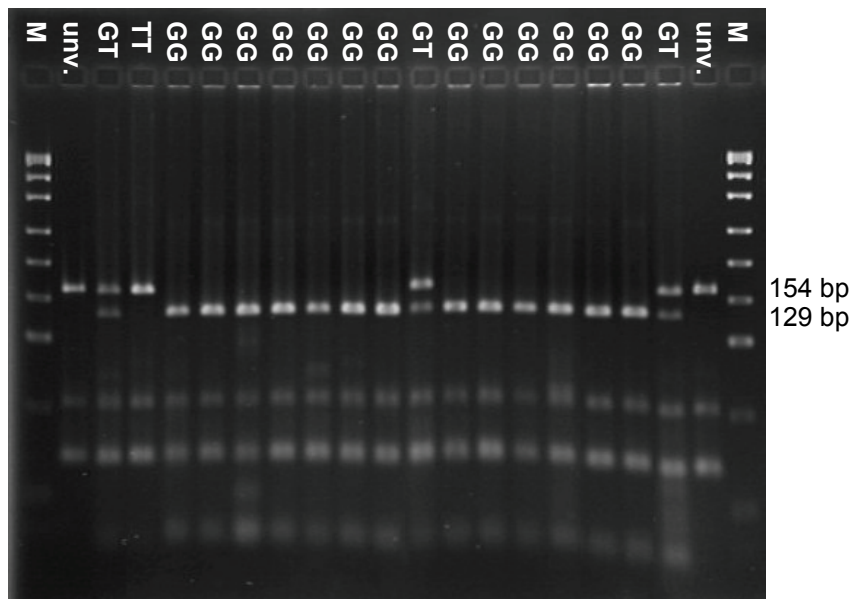
Die Sequenzierung des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  ergab eine 513 bp lange Sequenz, die im sechsten Intron beginnt und im siebten Exon endet. Im sechsten Intron wurde an der 206. Position vor Beginn des Exon 7 eine Nukleotidsubstitution G>T detektiert (Abbildung 23).

|                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Intron 6                                                                                  |
| ...agacgtgggttcaatccctgggtcgggaagatcccctggagaaggaaatggcgggtccaccccagattcttgctgggaaaccca   |
| tggacagaggagcctggcaggctacagtccatggggtcacagagtcggacacgactaatgtgacttagcctgtggagaccggttaactt |
|                                                                                           |
| Nukleotidsubstitution: G>T                                                                |
| ↓                                                                                         |
| gggcaagggaggaggtggggagatggaaggagaaagaaaaggagacagatgagagagcaagaggcaggaggtagagaattc         |
| ggaaaatggaaggagaaagacagtgagatacaagccaagagtggaacatggggagaggcagagaatcagaaagacacggaatga      |
| gataagacagggggagatggggagaggcgggcagggtggcggcatcctccccacgacccccaacctgaccccgcgacccgc         |
| Exon 7                                                                                    |
| cccgagGTCCTGGCCCTGTACAACCAGCACAACCCGGGCGCATCGGCGGCGCCGTG                                  |
| CTGCGTGCCTCAGGCGCTGGAACCCCTGCCCAT...                                                      |

**Abbildung 23: Partielle Sequenz des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$* , beginnend im Intron 6, endend im Exon 7, mit identifizierter Nukleotidsubstitution an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6. Basen der Exons sind in Großbuchstaben, Basen der Introns in Kleinbuchstaben dargestellt.**

Zum Nachweis der Mutation wurde ein ACRS etabliert. Dieser produzierte bei Vorhandensein des Wildtypallels (G) ein Fragment in der Größe von 129 bp. Lag an der fraglichen Stelle die Base T vor, so war ein der Größe des ungeschnittenen PCR-Produktes von 154 bp entsprechendes Fragment im Gelbild zu sehen. Neben den erwünschten Banden

waren ebenfalls Nebenbanden unterschiedlicher Größen festzustellen, die auf die hohe 3'-Stabilität des verwendeten Vorwärtsprimers zurückzuführen waren (Abbildung 24).



**Abbildung 24: ACRC zum Nachweis der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des Exon 7 im sechsten Intron des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta$ 1*. Der Genotyp TT stellte sich als 154 bp große Bande im Gelbild dar. Tiere, die den Genotyp GG trugen, zeigten ein 129 bp großes Fragment. Heterozygote Tiere (GT) wiesen beide Banden im Gelbild auf. Zur besseren Darstellung wurde stets ein unverdautes PCR-Produkt (unv.) zusätzlich mit auf das Gel geladen. M = pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23**

Die Population befand sich im Hinblick auf den untersuchten Genort im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Beim Vergleich der Genotypfrequenzen der atypisch scrapiepositiven Tiere mit denen ihrer Kontrolltiere wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ( $\chi^2 = 2,01$ ,  $P = 0,36$ ) (Tabelle 26). Auch in den Allelfrequenzen wurden keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Gruppen detektiert ( $\chi^2 = 1,21$ ,  $P = 0,27$ ) (Tabelle 27). Bei den von klassischer Scrapie betroffenen Tieren verhielt es sich gleichermaßen: Auch hier unterschieden sich weder die Genotypfrequenzen ( $\chi^2 = 0,58$ ,  $P = 0,45$ ) noch die Allelfrequenzen ( $\chi^2 = 0,56$ ,  $P = 0,45$ ) signifikant zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren (Tabelle 26, Tabelle 27).

**Tabelle 26: Genotypfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6 des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta$ 1* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere. n = Tierzahl**

| Genotyp | atypische Scrapie                        |                                          | klassische Scrapie                       |                                           |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
|         | Kontrolltiere<br>(n = 291 <sup>1</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 68 <sup>2</sup> ) | Kontrolltiere<br>(n = 134 <sup>3</sup> ) | positive Tiere<br>(n = 103 <sup>4</sup> ) |
| GG      | 81,8                                     | 88,2                                     | 96,3                                     | 94,2                                      |
| GT      | 17,2                                     | 10,3                                     | 3,7                                      | 5,8                                       |
| TT      | 1,0                                      | 1,5                                      | 0,0                                      | 0,0                                       |

<sup>1</sup> 13 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>2</sup> 4 Tiere waren nicht typisierbar, <sup>3</sup> 5 Tiere waren nicht typisierbar,

<sup>4</sup> 1 Tier war nicht typisierbar

**Tabelle 27: Allelfrequenzen (%) der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Base vor Beginn des siebten Exons im Intron 6 des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta$ 1* der atypisch und klassisch scrapiepositiven Tiere und ihrer Kontrolltiere.**

| Allel | atypische Scrapie |                | klassische Scrapie |                |
|-------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
|       | Kontrolltiere     | positive Tiere | Kontrolltiere      | positive Tiere |
| G     | 90,4              | 93,4           | 98,1               | 97,1           |
| T     | 9,6               | 6,6            | 1,9                | 2,9            |

## 5 Diskussion

### 5.1 Mikrosatellitenanalyse

#### 5.1.1 Signifikanzen in von atypischer Scrapie betroffenen Herden

Die Mikrosatelliten *MCMA53* und *MCMA16* wiesen in der Gruppe der von atypischer Scrapie betroffenen Herden hoch signifikante bzw. signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren auf. Dieses kann auf ein die Scrapieresistenz beim Schaf beeinflussendes Gen in der Nähe des jeweiligen Mikrosatelliten hindeuten.

Allerdings können diese Ergebnisse auch durch die unterschiedliche Rassenzusammensetzung und ungewissen Verwandtschaftsgrad der beprobten Tiere untereinander beeinflusst worden sein. Eine falsch positive Assoziation eines Markers kann in einer Fall-Kontroll-Studie durch die Stratifizierung der beprobten Population hervorgerufen werden: Dies ist dann der Fall, wenn die Verteilung der Allele in zwei oder mehreren Subpopulationen voneinander abweicht und die Fall- und Kontrollgruppe aus unterschiedlich großen Anteilen der Subpopulationen bestehen (DeWan et al., 2007). Es ist bekannt, dass Allelfrequenzen von Mikrosatelliten sich zwischen den Schafrassen deutlich unterscheiden können und einige Allele in manchen Rassen gar nicht auftreten, andere hingegen treten exklusiv in einer Rasse auf. Sie zeichnen sich oft durch extrem kleine oder extrem große Größen aus und treten in niedrigen Frequenzen auf (Arranz et al., 2001). In der vorliegenden Studie bestand der größte Teil der beprobten Tiere aus Kreuzungstieren, bei denen eine genaue Rassezuordnung nicht möglich war.

In den Merinolandschafherden waren die Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren nicht mehr signifikant. Ein Grund dafür könnte sein, dass für die Feststellung einer Assoziation umso höhere Probenzahlen benötigt werden, je niedriger der Anteil der durch die Mutation ausgelösten Varianz am Krankheitsphänotyp ist (Long & Langley, 1999). Mutationen mit geringem Einfluss auf die phänotypische Varianz können also in Assoziationsstudien mit einer zu geringen Probenmenge übersehen werden. Mit insgesamt 71 Tieren ist die Anzahl an beprobten Merinolandschafen eher als gering einzustufen. Ein anderer Grund für die fehlende Signifikanz könnte sein, dass die Allele 101, 109 und 113 des Mikrosatelliten *MCMA53*, sowie die Allele 204 und 212 des Mikrosatelliten *MCMA16* nicht in den Merinolandschafherden auftraten. Gerade aber die Gruppe der Allele 101, 109 und 113 des Markers *MCMA53* zeigte bei der Gesamtheit der von atypischer Scrapie betroffenen Herden

höchst signifikante Unterschiede zwischen scrapiepositiven- und Kontrolltieren. Auch das Allel 204 des Markers *MCMA16* war in den Allelfrequenzunterschieden zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren des Gesamtprobenmaterials signifikant.

Da das Ergebnis der vorliegenden Assoziationsstudie eine Kopplung der Mikrosatelliten *MCMA53* und *MCMA16* mit einem die Empfänglichkeit für atypische Scrapie beeinflussenden Genort nahe legt, sind folgende Kandidatengene für die weitere Untersuchung interessant:

Das für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv3.1 kodierende Gen (*KCNC1*) liegt in der Region auf Rinderchromosom 15, die homolog zu der Region auf Schafchromosom 15 ist, in welcher der Mikrosatellit *MCMA53* lokalisiert ist. Kv3.1-Kanäle werden in verschiedenen Bereichen des Gehirns unter anderem im Kleinhirn und den Basalganglien exprimiert. Mäuse mit homozygot defektem *KCNC1* waren ihren heterozygoten Wurfgeschwistern und Mäusen vom Wildtyp in einem Test, der auf motorische Koordination und Ausdauer der Muskulatur ausgelegt war, signifikant unterlegen. Auch wiesen sie ein geringeres Körpergewicht und veränderte Reaktionen auf akustische Reize auf (Ho et al., 1997). Bei Tieren, denen die Kaliumkanäle Kv3.1 und Kv3.3 fehlten, wurden schwere Ataxie, zitternde Bewegungen und Muskelspasmen beobachtet (Espinosa et al., 2001). Mäuse, denen der Kv3.3-Kanal fehlte, die aber mindestens ein intaktes *KCNC1*-Allel besaßen, zeigten hingegen keine offenkundige Ataxie unter visueller Inspektion (McMahon et al., 2004). Verhaltensänderungen sowie Gewichts- und Konditionsverlust sind Symptome, die im Verlaufe einer Scrapieerkrankung auftreten (Petrie et al., 1989, Kümper, 1994). Ataxie ist ebenfalls, insbesondere auch im Hinblick auf die atypische Scrapie des Schafes (Benestad et al., 2003), ein charakteristischer klinischer Befund (Petrie et al., 1989, Kümper, 1994).

*Interleukin 1-B Converting Enzyme (ICE)* ist eine proinflammatorische Caspase, die das Zytokin Interleukin (IL)-1 $\beta$  in seine aktive Form überführt und liegt auf dem zu Schafchromosom 15 homologen Rinderchromosom 15 in der Nähe des Mikrosatelliten *MCMA16*. Schultz et al. (2004) berichteten über eine vermehrte Expression von *IL-1 $\beta$*  und *ICE* im Gehirn im Verlauf einer murinen Scrapieinfektion. Des Weiteren spielt IL-1 $\beta$  eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von Astrozyten und der Entstehung der im frühen Stadium einer Scrapieinfektion beobachteten Astroglie: Bei fehlendem Einfluss von *IL-1 $\beta$*  wurde ein verzögertes Voranschreiten der Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> sowie eine längere Inkubations- und Überlebenszeit beobachtet (Schultz et al., 2004).

*KCNC1* und *ICE* sind also nicht nur durch ihre Position in der Nähe der Mikrosatelliten *MCMA53* bzw. *MCMA16*, sondern auch aufgrund ihrer Funktionen für eine Untersuchung auf

eine Assoziation mit Scrapieresistenz beim Schaf interessant. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht, da alle bearbeiteten Gene schon vor Vorliegen der Ergebnisse aus der Mikrosatellitenanalyse ausgewählt worden waren und die Untersuchung weiterer Gene den Umfang der Studie überstiegen hätte.

### **5.1.2 Signifikanzen in von klassischer Scrapie betroffenen Herden**

Neben den Herden, die von atypischer Scrapie betroffen waren wurden auch von klassischer Scrapie betroffene Herden untersucht. In diesen Herden zeigte der Mikrosatellit *MCM159* signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen scrapiepositiven und Kontrolltieren. Da die Resistenz gegen klassische Scrapie nicht nur vom Prionproteingenotyp allein abhängt (Lloyd et al., 2001, Moreno et al., 2003), sondern Unterschiede in der Inkubationszeit zwischen Tieren des gleichen Genotyps bestehen (Carlson et al., 1988, Elsen et al., 1999), kann der Mikrosatellit *MCM159* mit einem solchen die Resistenz gegen klassische Scrapie beeinflussenden Genort gekoppelt sein.

Die Allelfrequenzen des Mikrosatelliten *MCM159* unterscheiden sich innerhalb der Herde KS, in der 51 Tiere von klassischer Scrapie betroffen waren, hoch signifikant zwischen positiven Tieren und den Kontrolltieren. Da anzunehmen ist, dass sich Tiere innerhalb einer Herde genetisch ähnlicher sind als Tiere mit unterschiedlicher Herdenzugehörigkeit, und mehrere scrapiepositive Tiere aus der Herde vorliegen, sind Störeffekte wie Rasse, Alter und Verwandtschaftseinflüsse geringer als im gesamten Probenmaterial. Aus diesem Grund bekräftigt das aus der Herde KS vorliegende Ergebnis die Kopplung des Mikrosatelliten *MCM159* an einen potentiell die Empfänglichkeit für klassische Scrapie beeinflussenden Genort.

Der Mikrosatellit *MCM159* liegt auf dem distalen Ende von Schafchromosom 15. Auf dem zu Schafchromosom 15 homologen Rinderchromosom 15 findet sich im distalen Bereich das *Reticulon 4 Receptor-like 2*-Gen (*RTN4RL2*). Manolakou et al. detektierten einen hochsignifikanten QTL für eine verkürzte Inkubationszeit für BSE bei der Maus auf Chromosom 2 (2001). Das *RTN4RL2*-Gen ist bei der Maus in eben diesem QTL-Bereich lokalisiert (Mouse Genome Database, 06/2007). Der von *RTN4RL2* kodierte Rezeptor weist eine hohe Homologie zu dem Reticulon 4 Rezeptor (RTN4R) auf (Pignot et al., 2003). Park et al. präsentierten Ergebnisse, die auf eine signifikante Rolle des RTN4R in der Pathophysiologie der Alzheimerschen Erkrankung hinweisen (2006): Zum einen ist die neuronale Lokalisation von RTN4R in Gehirnen von Alzheimerpatienten verändert. Auch wurde eine Interaktion von RTN4R mit dem Amyloidvorläuferprotein (APP), aus dem durch proteolytische Spaltung das für die Krankheit charakteristische  $\beta$ -Amyloid entsteht,

festgestellt, welche die Produktion von  $\beta$ -Amyloid und dessen Ablagerung in Plaques unterdrückte. Eine Ausschaltung des *RTN4*-Gens hatte eine Steigerung der  $\beta$ -Amyloidmenge, der Plaqueablagerung sowie der Neurodystrophie zur Folge während eine Behandlung mit einem Übermaß an löslichem RTN4R-Protein die eben genannten Faktoren verminderte. Wie auch RTN4R wird auch RTN4RL2 sehr stark im Gehirn exprimiert (Pignot et al., 2003). Wegen der strukturellen Verwandtschaft der beiden Proteine und seiner Position nahe des mit Scrapieresistenz assoziierten Mikrosatelliten *MCM159* stellt das *RTN4RL2*-Gen ein potentiell Kandidatengen dar. Da die vorliegende Studie sich mit anderen Kandidatengenen für Scrapieresistenz beschäftigt, deren Auswahl schon vor dem Vorliegen der Ergebnisse aus der Mikrosatellitenanalyse getroffen worden war, wurde das *RTN4RL2*-Gen nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es ist jedoch für weitergehende Studien von großem Interesse.

## **5.2 Kandidatengenanalyse**

Bei der Analyse der Kandidatengene wurden weder in den von klassischer Scrapie noch in den von atypischer Scrapie betroffenen Schafherden signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen positiven und Kontrolltieren festgestellt. Somit liegen keine Hinweise dafür vor, dass die untersuchten Gene einen Einfluss auf die Scrapieempfindlichkeit beim Schaf ausüben. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Mutationen mit nur geringem Einfluss auf die phänotypische Varianz nicht detektiert wurden, da die Probenanzahl möglicherweise hierfür nicht ausreichend ist: Wenn ein Genort für weniger als 10% der totalen Varianz des Phänotyps verantwortlich ist, kann es schwierig sein, eine Marker-Phänotyp-Assoziation zu detektieren. Je höher die Probenanzahl ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, eine Assoziation festzustellen (Long & Langley, 1999).

Zahlreiche Studien belegten, dass sich das Kopplungsungleichgewicht selbst in unverwandten heterogenen Populationen eher weit erstreckt, im Mittel um die 50 kb (Collins, 2007). Beim Rind, das zum Schaf eine hohe Homologie aufweist, sind bis auf das *Calpain*, *Large Polypeptide L2* alle in der vorliegenden Studie untersuchten Gene in Größenordnungen von ca. 10 - 15 kb angesiedelt (Entrez SNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), weswegen auch beim Schaf ähnliche Größenordnungen zu erwarten sind. Dennoch kann eine intragene Rekombination dazu geführt haben, dass ein möglicher Einfluss eines Kandidatengens auf die Scrapieresistenz in der vorliegenden Assoziationsstudie nicht detektiert wurde: Zwar ist das Kopplungsungleichgewicht in intragenen Regionen signifikant höher als in intergenen Regionen (Guryev et al., 2006), aber es kommt ebenfalls vor, dass ein Haplotypenblock mitten in einem Gen durch Rekombination geteilt wird (Ridley, 2004). Dadurch wird zum

einen die Erbinformation grundlegend verändert und zum anderen das Kopplungsungleichgewicht zerstört, sofern beide Haplotypen sowohl stromauf- als auch stromabwärts des Strangbruchs in der genetischen Information voneinander abweichen (Ridley, 2004, Carneiro & Ferrand, 2007). Intragene Rekombination ist zum Beispiel beim Wildkaninchen im *Kappa-Casein* (*CSN3*)-Gen beschrieben (Carneiro & Ferrand, 2007): Beim cuniculinen *CSN3*-Gen unterscheiden sich die beiden Haplotypen A und B durch zwei Deletionen, die der B-Haplotyp in Intron 1 und Intron 4 aufweist. Trotz der Tatsache, dass die beiden Deletionen bei Hauskaninchenrassen immer nur zusammen auf einem Chromosom, aber nie einzeln gefunden worden waren, stellten Carneiro & Ferrand (2007) bei Wildkaninchenrassen Haplotypen mit nur einer der beiden Deletionen fest, was das Ereignis einer intragenen Rekombination im *CSN3*-Gen nahe legt. In der iberischen Wildkaninchenpopulation war trotz des kurzen Abstandes zwischen Intron 1 und 4 die intragene Rekombination in solchem Ausmaß vorgekommen, dass dieses in Kombination mit dem langen Fortbestehen der Tiere in der Region zu einem Kopplungsgleichgewicht zwischen den Deletionen in Intron 1 und Intron 4 geführt hatte.

### 5.2.1 Cathepsin B

In der vorliegenden Studie wurde kein Hinweis darauf gefunden, dass *Cathepsin B* (*CTSB*) einen Einfluss auf die Scrapieempfindlichkeit ausübt. CTSB könnte aber dennoch in den Abbau des PrP<sup>Sc</sup> involviert sein, wie die Untersuchungen von Luhr et al. (2004a) vermuten lassen. Geht man davon aus, dass das CTSB den PrP<sup>Sc</sup>-Abbau positiv beeinflusst, müsste eine Mutation die Expression und damit die Enzymaktivität steigern, um eine kurierende Wirkung zu entfalten und die Scrapieresistenz zu erhöhen. Eine solche Expressionssteigerung könnte jedoch neben einem potentiell vermehrten Abbau von PrP<sup>Sc</sup> auch andere Wirkungen mit sich bringen: Durch aktivierte Mikroglia abgegebenes CTSB kann eine Apoptose von Nervenzellen hervorrufen (Kingham & Pocock, 2001). Da sowohl aktivierte Mikroglia als auch Apoptose Charakteristika in der Pathogenese der Scrapie darstellen (Giese et al., 1995, Betmouni et al., 1996), müsste beim Vorliegen einer genetischen Variante des ovinen *CTSB*, die die Expression des Gens steigert, von einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes durch die vermehrte Auslösung von Apoptose ausgegangen werden. So wäre der durch den möglicherweise vermehrten Abbau von PrP<sup>Sc</sup> gewonnene Resistenzvorteil wieder nichtig. Eine nicht vorhandene Assoziation mit der Scrapieempfindlichkeit muss also eine funktionelle Involvierung des CTSB in die Pathogenese nicht zwangsläufig ausschließen.

### 5.2.2 Cathepsin D

An Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D* (*CTSD*) wurde eine synonyme Nukleotidsubstitution detektiert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Majewski & Ott (2002) zu sehen, die feststellten, dass das Verhältnis von nichtsynonymen zu synonymen Nukleotidsubstitutionen in der Nähe der Spleißseiten, also der Exon-Intron-Übergänge, am geringsten ist. Mutationen, die den Spleißmechanismus beeinflussen, können für genetisch bedingte Krankheiten beim Menschen verantwortlich sein (Ars et al., 2000). Neben dem Spleißakzeptor, dem Spleißdonor und der Branch Site, die hier beim ovinen *CTSD* nicht von einer Mutation betroffen sind, existieren zusätzliche Kontrollelemente, die den Spleißvorgang regulieren: Beim Wildtypallel (C) wurde ein potentieller Exon Splicing Enhancer (ESE), Bindungsstelle für das spezifische Serin/Arginin reiche Protein (SR-Protein) SF2/ASF, von der neunten bis zur 15. Base des neunten Exons des *CTSD* detektiert. Dieser war bei dem mutierten Allel (T) nicht aufzufinden. Der potentielle ESE liegt nahe des 3'-Endes des Exons. Diese Lokalisation nahe der Exon-Intron-Grenze ist typisch für exonische Spleißkontrollelemente (Majewski & Ott, 2002).

ESEs sind kurze und oft, wie auch in diesem Fall, purinreiche Sequenzen, an die SR-Proteine binden können, um die Abgrenzung des jeweiligen Exons aus der pre-mRNA zu fördern. Sie sind sowohl für das konstitutionelle als auch das alternative Spleißen von großer Bedeutung (Cartegni et al., 2002). Es ist demzufolge möglich, dass durch die mutationsbedingte Zerstörung des ESE im neunten Exon des ovinen *CTSD* ein Exon-Skipping ausgelöst wird. Diese Theorie wird von der Tatsache bekräftigt, dass bei einer Reihe von Genen stille Mutationen in der kodierenden Sequenz beschrieben wurden, die mit unterschiedlichen Spleißvarianten assoziiert sind (Cartegni et al., 2002). Um ein mögliches Exon-Skipping abzuklären, wäre ein Vorgehen analog der Studie von Liu et al. (2001) angeraten: Um die funktionelle Beeinflussung einer ESE für das SR-Protein SF2/ASF durch eine Punktmutation nachzuweisen, konstruierten die Autoren so genannte Minigene, die nur aus dem von der Mutation betroffenen Exon, den beiden benachbarten Exons und den dazwischen liegenden Introns bestanden. Nachdem sie deren Transkripte *in vitro* gespleißt hatten, konnten sie feststellen, dass beim Wildtyp das fragliche Exon in der mRNA enthalten war, während die Mutation an Position der ESE zu einem Exon-Skipping führte.

An der 49. Base im siebten Intron des ovinen *CTSD* wurde ein Einzelbasenpaaraustausch (A>G) und an der 20. bzw. 44. Position des achten Introns wurden zwei Einzelbasenpaaraustausche (C>T bzw. G>A) detektiert. Diese Nukleotidsubstitutionen liegen alle mindestens 20 Basenpaare innerhalb des Introns und betreffen weder

Spleißdonor, -akzeptor noch Branch Site. Diese Austausche bestätigen ebenfalls die Studie von Majewski und Ott (2002), die demonstrierten, dass SNPs nahe der Spleißseiten an beiden Intronenden unterrepräsentiert sind. Da die in den Introns 7 und 8 detektierten Einzelbasenpaaraustausche nur mit einer geringen Frequenz auftraten, wurden sie nicht als Marker für eine Assoziationsstudie herangezogen.

Im achten Intron des ovinen *CTSD* wurde weiterhin eine 7 bp lange Deletion festgestellt, die vom 5'-Ende gerechnet die Basen 13 bis 19 involviert. Obwohl keine regulatorischen Spleißsequenzen betroffen sind, könnte der Spleißvorgang dennoch durch die Mutation beeinträchtigt werden, da durch sie das Intron in seiner Länge von 87 bp auf 80 bp reduziert wird. Um korrekt aus der prä-mRNA herausgespleißt zu werden, muss das Intron eine gewisse Länge aufweisen. Dies stellten Wieringa et al. (1984) fest, indem sie so genannte Mini-Introns konstruierten, die nur die für das Spleißen wichtigen Erkennungssequenzen beinhalteten und in der Folge keine korrekt gespleißten Transkripte ergaben. Erst eine Verlängerung der Introns auf 81 bp oder darüber, konnte den normalen Spleißvorgang wieder herstellen. Die Sequenz der ergänzten Basen war hierbei ohne Bedeutung. Die durch die Deletion verursachte Größenreduktion des achten Introns des ovinen *CTSD* befindet sich also in einem kritischen Bereich und behindert potentiell den ordnungsgemäßen Spleißvorgang. Bei einigen Genen wurde bereits über Deletionen berichtet, die den Spleißvorgang durch eine Verkürzung des Introns beeinträchtigten: Peral et al. (1995) identifizierten eine intronische Deletion im *Polycystic Kidney Disease 1*-Gen, die allein aufgrund der daraus resultierenden Sequenzverkürzung eine Intronretention in der mRNA zur Folge hatte. Auch Wang et al. (2002) und Auffray et al. (2006) konnten eine durch die mutationsbedingte Größenreduktion eines Introns hervorgerufene Beeinträchtigung des Spleißvorganges feststellen. In allen drei Studien konnte der korrekte Spleißmechanismus durch eine Integration von zusätzlichen Basenpaaren wieder hergestellt werden, was die Bedeutung der Intronlänge für einen reibungslosen Ablauf des Spleißvorgangs unterstreicht.

Eine potentielle Retention des achten Introns in der mRNA des ovinen *CTSD* kann die Funktionalität des Proteins beeinflussen und somit eine Bedeutung für erbliche Erkrankungen und Prädispositionen haben. So führte z.B. auch die Retention des zehnten Introns in der mRNA des *Notch Gene Homolog 4*-Gens zur Synthese eines verkürzten Proteins (Auffray et al., 2006). Weiterhin untersuchten Wang et al. (2002) eine mutationsbedingte Größenreduktion eines Introns in Zusammenhang mit dem Rothmund-Thomson-Syndrom und postulierten, dass Deletionen in kleinen Introns (< 100 bp) wahrscheinlich auch für andere krankheitsassoziierte Gene von Bedeutung sind. Daher ist es gut möglich, dass die Deletion

im achten Intron des ovinen *CTSD* eine anomale Spleißvariante bedingt, die mit einem Krankheitsphänotyp in Zusammenhang steht.

Im Anschluss an die Deletion im Intron 8 des ovinen *CTSD* wurde eine direkte, sieben bp lange Sequenzwiederholung lokalisiert, die in ihrer Abfolge genau den sieben von der Deletion betroffenen Basenpaaren entspricht. Diese Sequenzwiederholung kann vermutlich für die Entstehung der Deletion durch Begünstigung eines Fehlannealings verantwortlich gemacht werden. Dies bestätigen Untersuchungen von Peral et al. (1995), die einen neun bp langen Direktrepeat in ihrer Sequenz identifizierten, und diesen als Ursache für die von ihnen untersuchte Deletion begriffen.

Die Wichtigkeit einer korrekten Erkennung der Spleißseiten wird unterstützt durch die steigende Anzahl an Krankheiten, die durch fehlerhaftes Spleißen der prä-mRNA hervorgerufen werden oder mit diesem assoziiert sind (Faustino & Cooper, 2003). In den meisten Fällen führen die Nutzung unnatürlicher Spleißseiten oder die Retention eines Introns zu prämaternen Terminationscodons. Dieses wiederum resultiert typischerweise in der Degradierung der mRNA durch Nonsense-mediated Decay und Funktionsverlust des mutierten Allels (Faustino & Cooper, 2003). Gelegentlich kann aber auch die Synthese eines verkürzten und / oder defekten Proteins das Resultat einer ESE-Mutation (Montera et al., 2001) oder Intronretention (Auffray et al., 2006) sein.

Sowohl ein Überspringen (exon skipping) des neunten Exons als auch eine Retention des achten Introns in der mRNA des ovinen *CTSD* kann zu einer Minderung der Funktionalität des Proteins führen. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass ein totales Erliegen der Proteinsynthese und ein daraus resultierender kompletter Aktivitätsverlust des *CTSD* durch die Nukleotidsubstitution (C>T) in Exon 9 oder die Deletion in Intron 8 in homozygoter Ausprägung hervorgerufen wird: Eine *CTSD*-Defizienz äußerte sich bei homozygoten Knock-out-Mäusen schon bald nach der Geburt in schweren neurologischen Defiziten, die wiederkehrende Krämpfe und Blindheit mit einschlossen (Koike et al., 2000). Außerdem wurde eine Verbindung zwischen *CTSD*-Defizienz und dem Krankheitsbild der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) hergestellt: Bei NCLs handelt es sich um neurodegenerative Speicherkrankheiten, die außer beim Menschen auch bei Schaf, Maus und weiteren Spezies vorkommen (Jolly et al., 1992). Charakteristische pathologische und histopathologische Veränderungen sind Atrophie des Gehirns und generalisierte neuronale Einlagerung von autofluoreszierendem Material (Jolly et al., 1992, Tyynela et al., 2000). Beim Mensch wurde ein Mangel an *CTSD* als Ursache der congenitalen humanen NCL festgestellt: Es wurde eine Nukleotidduplikation in homozygoter Ausprägung detektiert, die zur Bildung eines

prämaternen Stopcodons führte und für ein verkürztes, enzymatisch inaktives Protein kodierte. Im Hirngewebe der Patienten konnte das veränderte CTSD jedoch nicht detektiert werden, was *in vitro* auf einen raschen Abbau auf mRNA oder Proteinebene schließen lässt (Siintola et al., 2006). Im Gehirn von Schafen, die von congenitaler oviner NCL (CONCL) betroffen waren, wurde ein enzymatisch inaktives jedoch stabiles CTSD nachgewiesen (Tyynela et al., 2000). Es ist also anzunehmen, dass eine Spleißvariante des ovinen CTSD, die entweder die Synthese eines verkürzten Proteins oder die Degradation durch Nonsense-mediated Decay nach sich zieht, analog der beim Menschen als Ursache der congenitalen humanen NCL beschriebenen Mutation, beim Schaf ebenfalls zum Krankheitsbild der CONCL führen würde. Da jedoch 22,4% aller in dieser Studie genotypisierten Schafe homozygot für die Mutante (T) an Position 12 des neunten Exons waren und sie nicht unter einem der CONCL ähnlichen Krankheitsbild litten, ist davon auszugehen, dass die Zerstörung der potentiellen ESE keinen totalen Aktivitätsverlust des ovinen CTSD nach sich zieht. Möglicherweise nimmt nur die Effizienz des korrekten Spleißvorgangs ab, die Menge an gebildetem CTSD reicht aber immer noch aus, um eine Entstehung des Krankheitsphänotyps zu vermeiden. Die Deletion im achten Intron des *CTSD* wurde homozygot bei einem Herdbuchtier beobachtet, von dem ebenfalls keine Auffälligkeiten bekannt waren. Somit ist auch hier nicht davon auszugehen, dass der korrekte Spleißmechanismus durch die Mutation gänzlich zum Erliegen kommt, sondern es ist wahrscheinlicher, dass dieser in seiner Effizienz nur herabgesetzt ist. Dieses könnte analog dem Vorgehen von Auffray et al. (2006) geprüft werden, indem so genannte Minigene konstruiert würden, die die betroffene und umgebende Gen-Region mit und ohne Mutation enthielten. Nach der Klonierung in einen Expressionsvektor für Säugetiere und nachfolgender Transfektion würden diese anschließend in der Zellkultur exprimiert. Schließlich könnte durch RT-PCR (Müller, 2001) die Spleißung der pre-mRNA analysiert werden (Auffray et al., 2006): Zusammen mit der Auftrennung der Spleißvarianten im Agarosegel könnte eine Konzentrationsbestimmung durch das gleichzeitige Auftragen einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf das Gel und anschließenden Vergleich der Bandenintensitäten (Mühlhardt, 2003) stattfinden und so die auftretenden Spleißvarianten quantifiziert werden. Unterstützt wird die Theorie der durch Intronverkürzung hervorgerufenen Abnahme der Effizienz des Spleißmechanismus im ovinen CTSD durch die Studie von Wieringa et al. (1984), die mit steigender Basenpaarzahl im Intron (siehe oben) eine allmähliche Wiederherstellung des korrekten Spleißmusters und eine Zunahme der Menge an korrekt gespleißten Transkripten beobachteten.

Eine potentiell durch die im ovinen *CTSD* detektierten Mutationen (siehe oben) hervorgerufene verminderte Expression des ovinen Cathepsin D könnte beim Schaf einen Einfluss auf die Entstehung sowie den Krankheitsverlauf von Tumorerkrankungen haben: Dafür spricht, dass *CTSD* beim Menschen in die Entwicklung und Metastasenbildung von malignen Tumoren involviert ist (Glondou et al., 2002, Laurent-Matha et al., 2005, Whiteman et al., 2007) und seine Expression in direktem Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors und der Prognose für den Patienten steht: So hatten Brustkrebspatienten mit primären Mammakarzinomen, in deren Gewebe hohe *CTSD*-Gehalte detektiert wurden, eine deutlich höhere Rückfall- und geringere Überlebensrate (Foekens et al., 1999).

Möglicherweise könnte sich beim Schaf eine herabgesetzte Expression von Cathepsin D positiv auf den Krankheitsverlauf des ovinen Lungenadenokarzinoms (OPA) auswirken. Hierauf weisen Untersuchungen aus der Humanmedizin hin, in deren Rahmen in Tumorgewebe von Patienten mit Lungenkarzinomen erhöhte Plasmakonzentrationen von *CTSD* festgestellt wurden (Lou et al., 2007). Weiterhin wird diese These dadurch bekräftigt, dass eine vermehrte Expression von Procathepsin D in humanen Lungenkrebszellen *in vitro* deren Invasivität und Proliferation förderte und *in vivo* im Mausmodell zu einem gesteigerten Tumorwachstum führte (Vashishta et al., 2006). Beim OPA handelt es sich um einen kontagiösen Tumor der distalen Lunge, welcher durch eine Infektion mit dem Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) hervorgerufen wird (Palmarini et al., 1995, Palmarini et al., 1999). Er wurde zuerst 1915 in Südafrika beschrieben und ist weltweit verbreitet. Studien in Großbritannien und Südafrika haben ergeben, dass das OPA 70% aller Tumoren beim Schaf ausmacht (Sharp & De las Heras, 2007). Klinische Anzeichen sind voranschreitende Atemnot und vermehrt bronchialer Ausfluss, bei fortgeschrittenem Krankheitsgeschehen eitrig und bis zu 500 ml pro Tag. Der Verlauf ist stets letal (Demartini et al., 1988, Leroux et al., 2007). Das Tumorgeschehen breitet sich multifokal in beiden Lungenflügeln aus, Metastasierung ist selten (Head, 1990). Wenn die in der vorliegenden Studie identifizierten Mutationen (siehe oben) eine Verringerung der Expression des ovinen *CTSD* zur Folge hätten, könnten sie sich durch Verringerung der Invasivität und Einschränkung des Tumorwachstums positiv auf den Erkrankungsverlauf des ovinen pulmonären Adenokarzinoms auswirken, den Fortschritt der Erkrankung hemmen und somit die Überlebenszeit des betroffenen Tieres verlängern. Aus den untersuchten Herden lagen keine Daten über ein Auftreten dieser Erkrankung vor, weswegen ein potentieller Einfluss der detektierten Mutationen und der OPA nicht näher studiert werden konnte.

Eine herabgesetzte Expression von CTSD könnte beim Schaf weiterhin für die ebenfalls durch Retroviren ausgelöst (Cousens et al., 1996), enzootisch auftretenden Adenokarzinome der Ethmoidalschleimhaut von Bedeutung sein: Die Invasivität von humanen nasopharyngealen Karzinomzellen konnte *in vitro* durch eine Verminderung der CTSD-Expression signifikant herabgesetzt werden. Bei Patienten mit Nasopharyngealkarzinom wurde weiterhin festgestellt, dass sich Tumoren mit gesteigerter CTSD-Expression in einem fortgeschritteneren klinischen Stadium befanden und eine höhere Rezidivrate sowie mehr Lymphknoten- und Fernmetastasen aufwiesen (Cheng et al., 2008). Das insbesondere in China auftretende Nasopharyngealkarzinom des Menschen zeigt gewisse morphologische Ähnlichkeit mit der undifferenzierten Form des Ethmoidalkarzinoms des Schafes (Weiss & Rudolph, 1999). Somit könnte eine verringerte Expression von CTSD einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Ethmoidalkarzinoms beim Schaf haben. Ovine Adenokarzinome der Ethmoidalschleimhaut wachsen häufig lokal invasiv, metastasieren jedoch nicht (McKinnon et al., 1982, Sharp & De las Heras, 2007). Die Erkrankung wurde erstmalig in Deutschland beschrieben und kommt mit Ausnahme von Australien und Neuseeland weltweit vor. Die Prävalenz in betroffenen Herden ist sehr variabel und liegt in Deutschland zwischen 2% und 15% (De las Heras et al., 2007). Meist sind Tiere im Alter von zwei bis vier Jahren betroffen. Der Verlauf der Erkrankung ist durch die zunehmende Behinderung der Atmung schleichend progressiv und führt durch Auszehrung oder bakterielle / toxämische Komplikationen schließlich zum Tode des Tieres. Ein geringeres Tumorwachstum und verminderte Invasivität, möglicherweise Folgen einer herabgesetzten CTSD-Expression, könnten sich positiv auf die Überlebenszeit sowie die Lebensqualität von erkrankten Tieren auswirken.

Eine hochgradig metastatische Mammakarzinomzelllinie, bei der die CTSD-Expression reduziert worden war, zeigte im Vergleich mit der unveränderten Kontrolle in Nacktmäusen ein signifikant geringeres Tumorwachstum sowie eine deutlich herabgesetzte Metastasierungsneigung in die Lunge (Glondou et al., 2002). Eine Verminderung der Metastasenbildung durch herabgesetzte CTSD-Expression ist beim Schaf im Hinblick auf Adenokarzinome des Dünndarms potentiell interessant, da diese eine hohe Neigung zur Metastasierung aufweisen (Head, 1990, Else, 2007). Eine von Simpson et al. (1972) durchgeführte Studie ergab, dass in Neuseeland ca. 1,5% aller adulten Schafe von Dünndarmkarzinomen betroffen sind. Sie treten meistens im Jejunum, aber auch im Ileum auf. Der Primärtumor besteht gewöhnlich aus einer einzelnen annulären Stenose, die zu einer Aussackung des vorgeschalteten Darmteils führt (Else, 2007). Der Tumor metastasiert zum

einen in die mesenterialen Lymphknoten und von da aus in den Magen, zum anderen über Abklatschmetastasen in das Zwerchfell und in die Leistengegend (Head, 1990). Durch Blockade der abdominalen Lymphdrainage entsteht ein Aszites von bis zu 35 l (Head, 1990, Else, 2007). Die Metastasenbildung könnte durch eine herabgesetzte Expression von CTSD eingeschränkt werden und so die Überlebenszeit verlängern und klinische Beeinträchtigungen hinauszögern.

Es besteht auf der anderen Seite aber auch die Möglichkeit, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Nukleotidsubstitution in Exon 9 und die Deletion in Intron 8 in homozygoter Form den korrekten Spleißmechanismus zwar in seiner Gesamtheit verhindern, aber dass das gebildete Protein doch noch eingeschränkt funktionstüchtig ist. Diese These wird dadurch unterstützt, dass beide detektierten Mutationen am Ende des kodierenden Abschnitts liegen und Exon 3 und 7, die homolog zu den für das aktive Zentrum kodierenden Abschnitten beim Menschen (Siintola et al., 2006) sind, nicht betroffen sind.

Würden sich potentiell entstandene, fehlerhafte Spleißvarianten des ovinen CTSD als stabil erweisen und zu daraus resultierenden verkürzten oder auf eine andere Art veränderten Proteinen führen, könnten diese möglicherweise die Krebsentstehung begünstigen: Bislang wurden auf RNA-Ebene beim Menschen fünf verschiedene Spleißvarianten des *CTSD* detektiert (Alternative Splicing Database Projekt (ASD) (Thanaraj et al., 2004, Stamm et al., 2006), 04/2008). Davon wurde eine in Adenokarzinomgewebe des Pankreas (GenBank Nr.: BE735885) und eine weitere in einer Mammakarzinomzelllinie (GenBank Nr.: BU558156) identifiziert. Ferner wurde eine abnormale Expression von CTSD in verschiedenen Krebsarten, wie Ovar- (Bazzett et al., 1999), Prostata- (Morikawa et al., 2000) und Leberkarzinomen (Maguchi et al., 1988) beschrieben.

Ovartumoren treten gewöhnlich bei älteren Mutterschafen auf und sind deswegen je nach Zuchtmanagement und Remontierungsrate nicht so häufig: Es handelt sich meist um Adenokarzinome mit Implantationsmetastasen am Bauchfell (Else, 2007). Allerdings wurde auch schon über einen Granulosazelltumor bei einem zweijährigen Schaf berichtet, der bei dem nichtgraviden Tier zu Entwicklung des Euters, Laktation und Aszites geführt hatte (Gardner et al., 2005). Lebertumoren hingegen sind beim Schaf nicht ungewöhnlich. Sie sind fast immer gutartig und kommen bei Schafen im Alter von über drei Jahren vor. Sie werden oft nur bei der Beschau des toten Tierkörpers als Zufallsbefund festgestellt (Else, 2007).

Wenn also nun keine Anzeichen dafür vorliegen, dass das *Cathepsin D*-Gen einen Einfluss auf die Scrapieresistenz ausübt, so könnten die hier detektierten Mutationen doch die Genese

von Tumorerkrankungen beim Schaf beeinflussen, was in Folgeuntersuchungen noch zu klären wäre.

### 5.2.3 Calpain, Large Polypeptide L2

Da sich das *Calpain, Large Polypeptide L2 (CAPN2)* beim Rind mit 23 Exons über ca. 65 kb erstreckt, und davon auszugehen ist, dass es beim Schaf ähnlich ist, wurde bei diesem Gen die für die Regulation der Transkription essentielle Promotorregion und ein Teil des ersten Exons untersucht. Es wurde eine CpG-Insel detektiert, die sich über die gesamte Länge der Sequenz zieht.

CpG-Dinukleotide sind im Genom ungleichmäßig verteilt und kommen in nicht kodierenden DNA-Regionen im Vergleich zu den anderen Dinukleotiden viermal weniger vor (Gardiner-Garden & Frommer, 1987, Paulsen et al., 2008). Die Ausnahme bilden CpG-Inseln, in denen das CpG-Dinukleotid genauso häufig vorkommt, wie es von der Frequenz der einzelnen Basen anzunehmen wäre (Gardiner-Garden & Frommer, 1987).

CpG-Inseln sind mit den Promotorregionen von Genen assoziiert. Während die meisten Regionen im Genom methyliert sind, bleiben sie in erster Linie frei von Methylierungen (Paulsen et al., 2008). Eine CpG-Methylierung in Promotorregionen ist mit kondensiertem Chromatin assoziiert, das keine Transkription zulässt, und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der entwicklungsbedingten Stilllegung von Genen (Gronbaek et al., 2007). Regulatorische Sequenzen wie die Promotoren von Housekeeping Genen sind in den meisten Zelltypen größtenteils frei von Methylierungen. Dagegen sind gewebsspezifische Gene nur in den Zelltypen frei von Methylierungen, in denen sie transkribiert werden (Paulsen et al., 2008).

Methylierte Cytosine zeigen eine hohe Anfälligkeit durch spontane Deaminierung zu Thymin zu mutieren, welches nicht durch das Enzym DNA-Uracil-Glycosidase erkannt und herausgeschnitten wird (Coulondre et al., 1978). Von der DNA-Sequenz der CpG-Inseln lässt sich auf ihre Methylierung schließen: In unmethylierten CpG-Inseln ist die Dichte an G+C reichen Sequenzmotiven signifikant höher als in methylierten. So findet sich das Motiv CGCG im Mittel ca. dreizehnmal pro kb bei unmethylierten CpG-Inseln, bei methylierten jedoch nur ca. siebenmal. Genau gegensätzlich verhält es sich mit dem Sequenzmotiv TGTG das ca. elfmal pro kb in methylierten CpG-Inseln vorkommt, aber nur dreimal pro kb in nichtmethylierten (Bock et al., 2006). In der untersuchten Sequenz kommt das Motiv CGCG neunmal in 500 Basen vor und das Motiv TGTG nur einmal. Dies spricht dafür, dass es sich im Falle des ovinen *CAPN2* um eine nichtmethylierte CpG-Insel eines Gens handelt, das

regelmäßig transkribiert wird. Dies stimmt auch mit der Einordnung des ubiquitären *CAPN2* als Housekeeping Gen überein (Rubie et al., 2005).

Wie in der 5'-Region des *CAPN2*-Gens des Huhns und des Menschen sind in der ovinen Sequenz keine TATA- oder CAAT-Box aufzufinden, was im Zusammenhang mit dem hohen GC-Gehalt der Sequenzen auch für eine Zugehörigkeit zu der Familie der Housekeeping Gene spricht (Goll et al., 2003). Die Promotoren von Housekeeping Genen beinhalten des Weiteren mehrere G/C-Boxen (Valerio et al., 1988), die mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten und somit für die Regulation der Genexpression von Bedeutung sind (Briggs et al., 1986, St-Arnaud & Moir, 1993). Auch in der untersuchten Sequenz des ovinen *CAPN2*-Gens sind zwei G/C-Boxen vorhanden. Dies lässt ebenfalls darauf schließen, dass das ovine *CAPN2*, wie auch das humane und galline Gen (Goll et al., 2003), zur Familie der Housekeeping Gene gehört.

Im ovinen *CAPN2* wurde im Promotorbereich an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons eine Nukleotidsubstitution von G gegen T festgestellt. Bei Vorliegen des G-Allels wurde eine potentielle Bindungsstelle für das Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (IA-1) *in silico* detektiert, welche sich von der 196. Base bis zur 184. Base vor Beginn des ersten Exons erstreckt. Diese wurde bei Vorliegen des T-Allels nicht detektiert. IA-1 ist ein Transkriptionsrepressor, der sequenzspezifisch an die Ziel-DNA binden kann (Breslin et al., 2002). Durch den Basenaustausch von G zu T im Promotor des ovinen *CAPN2* wird die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor IA-1 zerstört, da der hoch konservierte „GGGG“-Kern für dessen Bindungsaktivität essentiell ist (Breslin et al., 2002).

Zur Mutationsanalyse der detektierten Nukleotidsubstitution wurde eine allelspezifische PCR (ASPCR) entwickelt. Die ASPCR stellt eine zeitsparende und kostengünstige Testmethode zum Nachweis einer identifizierten Mutation dar, da nur zwei PCR-Reaktionen pro Probe durchgeführt werden müssen (Müller, 2001), die dann direkt zur Auswertung auf ein Agarosegel geladen werden können. Neben der Analyse mittels ASPCR stehen noch zahlreiche Methoden zur SNP-Analyse zur Verfügung, die für die identifizierte Mutation im *CAPN2*-Gen nicht geeignet erschienen: Einem Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) wurde die ASPCR vorgezogen, da die Primer wegen des hohen GC-Gehaltes der Zielsequenz (Müller, 2001) nicht eng genug um die Mutation gelegt werden konnten um ein ausreichend kleines PCR-Fragment für eine erfolgreiche und zügige Entwicklung eines SSCPs zu garantieren: Die Sensitivität eines SSCPs ist am größten bei PCR-Produkten, die eine Größe von 200 bp nicht übersteigen, und nimmt mit zunehmender Größe des PCR-Fragmentes ab (Beier, 1993, Leeb, 2005). Außerdem spielte der erhöhte Material- und

Zeitaufwand, der in Kombination mit einem geringeren Probendurchsatz mit einem SSCP verbunden ist, eine nicht unerhebliche Rolle bei der Auswahl der Methodik.

Ein PCR-RFLP wurde als primäre Testmethode nicht in Betracht gezogen, weil das PCR-Fragment zu groß war, um bei der Auswertung ein zufrieden stellendes Schnittbild im Gel zu gewährleisten. Restriktionsschnittstellen, die über die Position der Mutation und den Kontrollschnitt hinausgehen, sind nicht nur aus Kostengründen, sondern auch wegen der unter Umständen erschwerten Auswertung zu vermeiden.

Die Genauigkeit von Genotypisierungsmethoden kann mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft werden (DeWan et al., 2007). Die hier etablierte ASPCR typisierte zuverlässig die Genotypen der beprobten Tiere, jedoch wurde in einigen wenigen Fällen das G-Allel bei GT-heterozygoten Tieren nicht erkannt, was durch eine Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht aufgefallen war. Dieses machte eine Überprüfung der Typisierungsergebnisse der TT-homozygoten Tiere erforderlich. Hierzu wurde aus den schon unter 3.4.4.4 beschriebenen Gründen eine nested PCR mit anschließendem Restriktionsverdau verwendet. Diese Methode bestätigte zuverlässig den durch die ASPCR ermittelten Genotyp, detektierte aber auch bei einigen wenigen zuvor als TT-homozygot fehltypisierten Tieren ein zusätzliches G-Allel. Die nested PCR mit anschließendem Restriktionsverdau konnte die ASPCR jedoch aufgrund der großen Anzahl an überzähligen Schnittstellen, ihres erhöhten Arbeits- und Kostenaufwandes und ihrer hohen Sensitivität nicht ersetzen. Die Methode wies eine erhöhte Anfälligkeit für Kontaminationen auf, was eine Negativkontrolle unverzichtbar machte. Generell ist bei der Typisierung von Proben mit Hilfe der hoch sensitiven Methode der nested PCR die Verwendung eines Pipettierroboters anzuraten, um mögliche Kontaminationen zuverlässig zu verhindern. Die nested PCR mit anschließendem Restriktionsverdau eignete sich gut zur Überprüfung und Bestätigung der Ergebnisse aus der ASPCR und stellte in Kombination mit dieser ein zuverlässiges und effizientes Testsystem zur Überprüfung der Mutation im *CAPN2* dar.

Die Nukleotidsubstitution an der 191. Position vor Beginn des ersten Exons im ovinen *CAPN2* war zwar in dieser Studie nicht mit Scrapieempfindlichkeit assoziiert, könnte aber durch die Zerstörung der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktors IA-1 eine proapoptotische Mutation darstellen, die die Resistenz gegen neuroendokrine Tumoren erhöht: Apoptotische Vorgänge sind für die Regulation gesunden Zellwachstums von großer Wichtigkeit und spielen bei spontaner Tumoregression eine Rolle. In der Tumorentwicklung kann Apoptose durch extrazelluläre Ursachen, wie Hypoxie oder Bestrahlung, und interne Imbalancen, wie DNA-Beschädigung, ausgelöst werden (Lowe & Lin, 2000). Sedarous et al.

(2003) fanden Hinweise darauf, dass Calpain in den durch DNA-Beschädigung ausgelösten neuronalen Zelltod involviert ist und dass dies über eine Regulierung der Aktivität des Tumorsuppressors p53 stattfindet. Die Ergebnisse von Park et al. (2005) deuten darauf hin, dass die Aktivierung von Calpain zur Apoptose von Insulinomzellen beiträgt. Auch in Hypophysenadenomzellen der Ratte war Calpain an der durch genotoxischen Stress induzierten Apoptose aktiv beteiligt (Leverrier et al., 2002). Die Expression von *IA-1* konnte in zahlreichen Tumorzelllinien neuroendokrinen Ursprungs (u. a. Phäochromozytom, Medulläres Thyroidkarzinom, Insulinom, Tumoren der Hypophyse) festgestellt werden, war jedoch in normalem Gewebe nicht nachzuweisen (Goto et al., 1992). Geht man davon aus, dass von Zelllinien *in vitro* auf Tumorgewebe *in vivo* geschlossen werden kann, würde *IA-1* in neuroendokrinen Tumoren vermehrt exprimiert und könnte dann wiederum die Transkription von *CAPN2* hemmen, was dann möglicherweise die Behinderung von apoptotischen Vorgängen zur Folge hätte. Somit könnten Träger der Mutation eine erhöhte Resistenz gegen neuroendokrine Tumoren aufweisen, da bei ihnen die Expression des *CAPN2* nicht durch *IA-1* gehemmt würde und so apoptotische Vorgänge ungehinderter ablaufen könnten.

Beim Schaf ist das Auftreten von Neoplasien im Allgemeinen eng an das Alter gekoppelt: So ist eher mit Tumoren, die eine klinische Symptomatik auslösen zu rechnen, wenn die Tiere lange in der Zucht verbleiben, wie das zum Beispiel in Australien der Fall ist (Else, 2007). Adenome oder seltener Adenokarzinome der Nebennierenrinde oder Tumoren des Nebennierenmarks, bei welchen es sich immer um Phäochromozytome handelt, sind beim Schaf nicht häufig, werden jedoch am Schlachthof als Zufallsbefund bei älteren Schafen gefunden (Head, 1990, Else, 2007). Phäochromozytome sind meist endokrin in der Katecholaminproduktion aktiv. Klinisch führen sie zu arteriellem Bluthochdruck oder anfallsartigen hypertensiven Krisen mit Linksherzvergrößerung und finaler hypoxischer Herzmuskelnekrose. Maligne Phäochromozytome wachsen infiltrativ und zeigen eine hohe Metastasierungsneigung (Schmidt & Dahme, 1999). Gelegentlich treten beim Schaf funktionelle Adenome aber auch Karzinome der Hypophyse auf (Else, 2007). In diesem Zusammenhang wurde bereits über Prolaktin und Wachstumshormon (GH) produzierende Adenome berichtet (Gonzalez et al., 1994, Oda et al., 1997). Weiterhin konnte bei Tieren mit Zubildungen der Hypophyse neurologische Ausfallerscheinungen beobachtet werden (Gonzalez et al., 1994, Oda et al., 1997, Ortin et al., 2006). Träger der Mutation im Promotorbereich des ovinen *CAPN2*-Gens würden möglicherweise eine höhere Resistenz gegen die eben angesprochenen neuroendokrinen Tumoren aufweisen. Wegen des seltenen

Auftretens dieser Art von Tumoren beim Schaf (Ortin et al., 2006, Else, 2007) dürfte diesem jedoch unter züchterischem Gesichtspunkt keine große Bedeutung beigemessen werden.

#### **5.2.4 Kallikrein 1**

Im ovinen *Kallikrein 1* (*KLK1*) konnte keine Assoziation des untersuchten Polymorphismus an Position 392 des vierten Introns mit der Scrapieempfindlichkeit beim Schaf festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese negative Assoziation auf einer intragenen Rekombination und damit Zerstörung des Kopplungsungleichgewichtes zwischen dem untersuchten und einem möglichen ursächlichen Polymorphismus beruht, ist beim ovinen *KLK1*-Gen eher gering einzuschätzen, da anzunehmen ist, dass das gesamte Gen beim Schaf innerhalb eines Haplotypenblocks lokalisiert ist:

Die Identifikation von Haplotypenblocks hat zum Ziel, in Assoziationsstudien große Abschnitte des Genoms mit vergleichsweise wenigen SNPs untersuchen zu können (Kuo et al., 2007). Das *Kallikrein 1* (*KLK1*) liegt beim Menschen auf Chromosom 19 in einem Abschnitt mit hohem Kopplungsungleichgewicht (Haploview 4.0 (56014 kb - 56020 kb, Chromosom 19, CEU, 05/2008), Barrett et al., 2005). Weinsheimer et al. (2007) untersuchten in der finnischen Population den Kallikrein-Genkluster auf eine Assoziation mit intracranialem Aneurisma mit Hilfe von 18 die einzelnen Haplotypen in diesem Bereich markierenden SNPs, wovon einer die Region um das *KLK1*-Gen abdeckte.

Der interspezifische Vergleich von Haplotypstrukturen zeigt einen Zusammenhang der Haplotypenblockdichte zwischen syntenischen Regionen ungeachtet des Geninhaltes. Bei Mensch, Maus und Ratte gibt es signifikante Zusammenhänge in der Haplotypenblockeinteilung (Guryev et al., 2006). Im Vergleich zum Menschen existieren bei Ratte und Maus größere Segmente im Genom, die sich im Kopplungsungleichgewicht befinden. Dies ist auf die unterschiedliche Populationsgeschichte von Menschen und ingezüchteten Labortieren zurückzuführen (Guryev et al., 2006). Beim Rind ist das Ausmaß von Kopplungsungleichgewicht geringer als in einer durch die Kreuzung von Inzuchtlinien entstandene Population von Mäusen, aber extensiver als beim Menschen (Khatkar et al., 2008). Der Verwandtschaftsgrad in der Rinderpopulation ist aufgrund des systematischen Einsatzes der künstlichen Besamung höher als beim Schaf, da hier der Bock in der Herde mitläuft und für 30 - 40, maximal 100 Mutterschafe eingesetzt wird (Vipond & Greig, 2007). Sowohl Ratte als auch Maus weisen ausgedehnte Haplotypenblöcke mit erhöhtem Kopplungsungleichgewicht auf, die folgenden genomischen Segmenten entsprechen: Erstens einem Genkluster aus fünf Genen (*B3galt2*, *Cdc73*, *Glrx2*, *Trove2* und *Uchl5*), zweitens dem großen *Fam5C*-Gen und drittens der flankierenden Region des *Rgs18*-Gens (Guryev et al.,

2006). Obwohl die humane Haplotypenstruktur durch viele kleinere Blöcke gekennzeichnet ist, beinhalten die ausgedehnteren Blöcke ebenfalls den oben genannten Gencluster aus 5 Genen, den kodierenden Teil von *Fam5C* und die flankierende Region von *Rgs18* (Guryev et al., 2006). Von diesen Ähnlichkeiten bezüglich der Haplotypenstruktur ausgehend kann spekuliert werden, dass Gene, die beim Menschen mitten in einer Region mit hohem Kopplungsungleichgewicht liegen, beim Schaf ebenfalls auf chromosomalen Segmenten mit hohem Kopplungsungleichgewicht liegen, da das Schaf durch züchterische Selektion und den Einsatz von vergleichsweise wenigen Böcken in seiner Populationsgeschichte höhere Verwandtschaftsgrade aufweisen muss als der Mensch. Beim ovinen *KLK1*-Gen ist also die Wahrscheinlichkeit, dass die negative Assoziation durch eine intragene Rekombination zustande kommt eher gering. Diese wird zusätzlich durch die Tatsache bekräftigt, dass das Kopplungsungleichgewicht innerhalb von Genen signifikant höher ist als zwischen diesen (Guryev et al., 2006). Demzufolge kann anhand des Untersuchungsergebnisses aus der Assoziationsanalyse des Polymorphismus an Position 392 des vierten Introns davon ausgegangen werden, dass das *KLK1*-Gen keinen bedeutenden Einfluss auf die Scrapieresistenz beim Schaf hat.

### **5.2.5 Transforming Growth Factor, $\beta 1$**

Zur Mutationsanalyse der Nukleotidsubstitution (G>T) an der 206. Position vor Beginn des siebten Exons im sechsten Intron des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  (*TGFBI*)-Gen wurde eine PCR-ACRS durchgeführt. Die PCR-ACRS ist eine schnelle, effiziente und sichere Methode zum Mutationsnachweis, wenn keine natürliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym vorhanden ist (Haliassos et al., 1989), wie im Falle des Einzelbasenpaaraustausches im ovinen *TGFBI*-Gen. Aufgrund der durch die angewendete Methode eingeschränkte Auswahl der Primer besaß der in der Nähe der Mutation lokalisierte Primer eine hohe 3'-Stabilität (Primer3). Ist der 3'-Terminus eines Primers der Teil mit der höchsten Stabilität, muss nicht das gesamte Primermolekül an die Ziel-DNA binden, um die Produktsynthese auszulösen. Dies führt in der Folge zu Fehlpaarungen und der Amplifikation unspezifischer Produkte (Mattes, 1998).

Mit Hilfe von DMSO können im Hinblick auf unspezifische Amplifikationen, z.B. ausgelöst durch einen hohen GC-Gehalt des PCR-Fragmentes, eindrucksvolle Verbesserungen der PCR erreicht werden (Müller, 2001). In der vorliegenden Studie wurde die Amplifikation des erwünschten Produktes trotz der hohen 3'-Stabilität des ausgewählten Vorwärtsprimers durch Zugabe von DMSO (10% v/v) ermöglicht. Daraus ist ersichtlich, dass auch Primer mit einer hohen 3'-Stabilität unter Verwendung von DMSO erfolgreich zum Einsatz kommen können.

Dies ist besonders im Hinblick auf PCR-Techniken interessant, bei denen die Primerauswahl auf bestimmte Regionen beschränkt und deswegen sehr begrenzt ist, da die Durchführung dieser Methoden durch DMSO auch unter widrigen Umständen ermöglicht werden kann und somit nicht auf eine kosten- oder zeitintensivere Technik ausgewichen werden muss.

In der vorliegenden Studie konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass *TGFB1* die Scrapieresistenz beim Schaf beeinflusst. Jedoch schließt dieses einen eventuellen Einfluss des TGFB1 auf den Krankheitsverlauf nicht aus:

Eine Einschränkung der Bioverfügbarkeit von TGFB1 bei scrapieinfizierten Mäusen führt zu einer verschärften Entzündungsreaktion im Gehirn, welche mit neuronalem Zelltod assoziiert ist (Boche et al., 2006). Die klinische Symptomatik der Scrapie tritt jedoch ebenfalls auf, wenn TGFB1 vermehrt exprimiert wird (Cunningham et al., 2002). Dies lässt darauf schließen, dass die von Boche et al. (2006) angenommene protektive Funktion des TGFB1 den letztendlichen Eintritt der Erkrankung nicht verhindern kann. Nach den Ergebnissen der Autoren kann aber angenommen werden, dass eine eventuelle Mutation im *TGFB1*-Gen, die die Funktion des exprimierten Proteins einschränkt, zu einem verschärften Krankheitsverlauf führen würde. Um eine Mutation zu detektieren, die mit einer Verkürzung der Inkubationszeit oder einem akuterem Verlauf der Erkrankung verbunden ist, ist das vorliegende Probenmaterial jedoch nicht geeignet. Es müssten hierfür scrapiepositive Tiere unter genauer Kenntnis des Infektionszeitpunktes nach Länge der Inkubationszeit und Schwere des Krankheitsverlaufes in Gruppen eingeteilt und untereinander verglichen werden. Um diese Parameter zu erheben müsste ein Infektionsversuch mit anschließender regelmäßiger klinischer Untersuchung durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### **5.3 Ausblick**

Assoziationsstudien sind im Hinblick auf eine Untersuchung des Schafes auf mögliche QTL bzw. Kandidatengene für Scrapieresistenz die Methode der Wahl, da sie zum einen gegenüber Kopplungsstudien eine Lokalisation in viel feinerem Maßstab zulassen und zum anderen nicht auf Familienmaterial angewiesen sind (Collins, 2007). Um gleichzeitig eine Vielzahl von Genorten auf eine Assoziation mit Scrapieempfindlichkeit hin zu untersuchen, wäre der Einsatz eines auf Mikroarray-Technologie basierenden SNP-Genchips vorteilhaft: Beim Menschen können mit Hilfe von Genchips, die über 300 000 SNPs umfassen, bereits genomweite Untersuchungen zur Identifikation von Risikogenen für komplexe Erkrankungen durchgeführt werden: So konnten neueste Studien erfolgreich Genorte für Diabetes (Typ 2)

(Scott et al., 2007), Morbus Crohn (Duerr et al., 2006) und Chronische lymphatische Leukämie (Di Bernardo et al., 2008) identifizieren. Beim Rind ist es mittlerweile möglich, mittels Genchip (~ 10 000 SNP) das Genom nach QTL für ökonomisch bedeutsame Merkmale abzusuchen (Daetwyler et al., 2008). McEwan et al. (2008) sind im Rahmen des International Sheep Genomics Consortium (ISGC) in der Entschlüsselung des Schafgenoms begriffen, wobei sie den größten Teil des nichtredundanten Schafgenoms abdecken. Im Rahmen dieses Projektes ist geplant, 180 000 positionierte SNPs zu identifizieren, die für die Erstellung eines 60 000 SNP Genchips geeignet sind (McEwan et al., 2008). Dieser Genchip könnte dann im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie zur Scrapieempfindlichkeit beim Schaf genutzt werden.

Im Rahmen einer solchen Analyse wäre die Probenanzahl möglichst groß zu wählen. Eine Mutation, die für einen großen Anteil der Varianz eines Phänotyps verantwortlich ist, kann oft unabhängig von der Anzahl der getesteten Proben identifiziert werden. Sinkt der Anteil der durch sie bedingten Varianz jedoch unter 10% ab, was im Hinblick auf polygen bedingte Krankheiten anzunehmen ist, verringert sich selbst bei Probenmengen von 500 Individuen die Wahrscheinlichkeit, eine Assoziation zu detektieren. Mit steigender Probenanzahl werden auch Marker-Phänotyp-Assoziationen mit größerer Häufigkeit identifiziert (Long & Langley, 1999).

Darüber hinaus liegt die Wiederholbarkeit einer Assoziationsstudie bei über 80%, wenn der Anteil der phänotypischen Varianz, der auf die Mutation zurückzuführen ist, über 5% liegt und die Probenanzahl 500 beträgt (Long & Langley, 1999). Zur Erhöhung der Probenmenge ist es sinnvoll, das hier vorliegende Probenmaterial durch die in Deutschland nach 2005 aufgetretenen Scrapiefälle zu ergänzen. Weiterhin könnte eine Zusammenarbeit auf europäischer Ebene die Probenmenge immens erhöhen. Die Auswahl der Tiere müsste analog der vorliegenden Studie vonstatten gehen: Die Diagnose der scrapiepositiven Tiere müsste durch die nationalen Referenzlaboratorien (Verordnung (EG) 999/2001) bestätigt worden sein. Um durch Stratifizierung bedingte falsch-positive Assoziationen zu minimieren, müssten aus der Herde jedes positiven Tieres scrapienegative oder -unverdächtige Kontrolltiere ausgewählt werden, die möglichst den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen, wie das betroffene Tier. Da in Nicht-Herdbuchbetrieben die Verwandtschaftsbeziehungen und die genaue Rasse oft unbekannt sind, muss auf Tiere aus der Altersgruppe des scrapiepositiven Schafes zurückgegriffen werden, die diesem vom Phänotyp her ähnlich sind.

Mit Hilfe des sich in der Entwicklung befindlichen 60 000 SNP Genchips (siehe oben) und einer gesteigerten Probenanzahl könnten weitere Genorte für Scrapieempfindlichkeit beim

Schaf identifiziert werden. Die Ergebnisse hieraus könnten dann in weitere Zuchtprogramme zur Vermeidung / Verminderung von atypischer und / oder klassischer Scrapie einfließen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit bestand darin, Mikrosatelliten auf Schafchromosomen 14 und 15 sowie funktionelle und positionelle Kandidatengene beim Schaf auf eine Assoziation mit der Empfänglichkeit für klassische und atypische Scrapie hin zu überprüfen.

Hierzu wurden 102 klassisch scrapiepositive Tiere und 71 atypisch scrapiepositive Tiere, die in den Jahren 2002 - 2005 in Deutschland als scrapiepositiv identifiziert worden waren, untersucht. Als Kontrolle dienten 441 scrapienegative oder unverdächtige Herdenmitglieder.

Die Mikrosatelliten *MCM159*, *MCMA53*, *UWCA5*, *CSAP26E*, *CSRD63*, *BM6507*, *MCMA16*, *BMS2812* und *RM004* wurden in drei Multiplex-PCRs amplifiziert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Allelfrequenzen wurden für scrapiepositive und Kontrolltiere nach Scrapietyp getrennt ermittelt und untereinander verglichen. Hierbei ergaben die Mikrosatelliten *MCMA53* und *MCMA16* hoch signifikante bzw. signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen atypisch scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren. In den von klassischer Scrapie betroffenen Herden unterschieden sich die Allelfrequenzen des Mikrosatelliten *MCM159* deutlich zwischen positiven und Kontrolltieren. Diese Ergebnisse können auf Gene in der Nähe der genannten Mikrosatelliten hindeuten, die die Scrapieempfindlichkeit beim Schaf beeinflussen.

Im ovinen *Cathepsin B* konnte in der Sequenzanalyse eine Nukleotidsubstitution (C>T) an Position 391 des neunten Introns nachgewiesen werden. Durch PCR-RFLP-Analyse mit dem Enzym *LweI* konnten die Allele identifiziert werden. Zwischen scrapiepositiven Tieren und Kontrolltieren wurden weder in den Genotypfrequenzen noch in den Allelfrequenzen signifikante Unterschiede festgestellt.

An Position 12 des neunten Exons des ovinen *Cathepsin D* wurde eine stille Mutation (C>T) detektiert. Bei Vorliegen des Wildtypallels (C) wurde an dieser Stelle durch das Programm ESEfinder 3.0 ein potentieller Exon Splicing Enhancer (ESE) identifiziert. Dieser konnte bei dem mutierten Allel (T) nicht mehr detektiert werden. Weiterhin wurden ein Einzelbasenpaaraustausch (A>G) an der 49. Base in Intron 7 sowie zwei Einzelbasenpaaraustausche (C>T bzw. G>A) an 20. bzw. 44. Position des achten Introns gefunden. Im achten Intron wurde eine Deletion der Basen 13 bis 19 festgestellt. Sowohl der ESE als auch die Deletion könnten den Spleißmechanismus durch die Nutzung unnatürlicher Spleißseiten oder Intronretention beeinträchtigen. Die scrapiepositiven Tiere und Kontrolltiere wurden an Position 12 des neunten Exons mit Hilfe eines PCR-RFLP durch das Enzym *BseYI* typisiert. Es konnten jedoch weder bei den atypisch noch bei den klassisch scrapiepositiven

Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikante Unterschiede in den Genotyp- oder Allelfrequenzen festgestellt werden.

Beim ovinen *Calpain, Large Polypeptide L2* wurde der Promotorbereich und ein Teil des ersten Exons untersucht. Über die gesamte Länge der Sequenz wurde eine CpG-Insel mit zwei G/C-Boxen identifiziert. Die in der Sequenz vorliegenden Motive lassen auf eine fehlende Methylierung schließen und sprechen für eine Zugehörigkeit des *Calpain, Large Polypeptide L2* zu der Familie der Housekeeping Gene. An der 191. Position vor Beginn des ersten Exons wurde im Promotorbereich eine Nukleotidsubstitution (G>T) detektiert. Bei Vorliegen des Wildtypallels (G) wurde durch das Programm MatInspector eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsrepressor Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (IA-1) festgestellt, welche bei dem mutierten Allel (T) nicht vorlag. Hier könnte eine proapoptotische Mutation vorliegen, die bei ihren Trägern zu einer erhöhten Resistenz gegen neuroendokrine Tumoren führt. Scrapiepositive Tiere und Kontrolltiere wurden durch eine ASPCR typisiert und zweifelhafte Ergebnisse wurden mit Hilfe einer nested PCR mit sich anschließendem RFLP durch das Enzym *MvaI* abgesichert. Zwischen positiven und Kontrolltieren konnten bei keinem Scrapietyp signifikante Unterschiede in Genotyp- oder Allelfrequenzen festgestellt werden.

Im *Kallikrein 1*-Gen wurde an Position 392 des vierten Introns eine Nukleotidsubstitution (C>T) detektiert. Zum Nachweis der Mutation wurde ein PCR-RFLP mit dem Enzym *BsmFI* durchgeführt. Weder bei den klassisch scrapiepositiven Tieren noch bei den atypisch scrapiepositiven Tieren konnte in Genotyp- oder Allelfrequenzen ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

An der 206. Position vor Beginn des siebten Exons wurde im sechsten Intron des ovinen *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  in der Sequenzanalyse eine Nukleotidsubstitution (G>T) detektiert. Atypisch und klassisch scrapiepositive Tiere sowie Kontrolltiere wurden mit Hilfe eines PCR-ACRS mit dem Enzym *BseGI* typisiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Genotyp- oder Allelfrequenzen zwischen positiven Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden.

Für zukünftige Studien würde die Untersuchung funktioneller Kandidatengene in der Nähe der Mikrosatelliten MCMA53, MCMA16 und MCM159 eine mögliche Vorgehensweise darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die hier untersuchten Gene einen Einfluss auf die Scrapieresistenz beim Schaf ausüben, weswegen sie für weitere Untersuchungen nicht von großem Interesse sind. Zukünftig ist es

anzustreben, genomweit mit Hilfe eines Genchips und mit vergrößertem Probenmaterial auf für die Scrapieresistenz bedeutende Gene zu suchen.

## 7 Summary

The aim of the present study was to screen microsatellites on ovine chromosomes 14 and 15 as well as functional and positional candidate genes for an association with susceptibility for classical and atypical scrapie in sheep.

Therefore 102 classical and 71 atypical scrapiecases, identified in Germany during the years 2002 - 2005, were investigated. Controls were either tested scrapie negative or showed no clinical signs of scrapie infection.

Microsatellites *MCM159*, *MCMA53*, *UWCA5*, *CSAP26E*, *CSRD63*, *BM6507*, *MCMA16*, *BMS2812* und *RM004* were amplified in three multiplex PCRs and afterwards separated in gel electrophoresis. Allele frequencies were calculated and compared between scrapie cases and controls with regard to scrapie type. Microsatellites *MCMA53* and *MCMA16* showed highly significant and significant differences respectively in allele frequencies between atypical scrapiecases and controls. Allele frequencies of microsatellite *MCM159* differed significantly between positive and control animals in flocks affected by classical scrapie. These results can be due to genes influencing scrapie susceptibility in sheep which are in linkage disequilibrium with the above-mentioned microsatellites.

During sequence analysis a single nucleotide polymorphism (C>T) was identified at the 391<sup>st</sup> position of the ninth intron of the ovine *Cathepsin B* gene. Animal samples were screened for the mutation with PCR-RFLP using the enzyme *LweI*. Significant aberration was neither detected in allele frequencies nor in genotype frequencies of scrapiepositive and control animals.

At the twelfth position of the ninth exon of the ovine *Cathepsin D* gene a silent mutation (C>T) was detected. In case of the wild type allele (C) a potential exon splicing enhancer was detected at this location by the programme ESEfinder 3.0. In case of the mutation (T) this ESE couldn't be identified any more. Furthermore a single nucleotide polymorphism (A>G) at 49<sup>th</sup> base of the seventh intron and two more single nucleotide polymorphisms (C>T and G>A respectively) on 20<sup>th</sup> and 44<sup>th</sup> position respectively of the eighth intron. In intron eight a deletion of the bases 13 till 19 was confirmed. The ESE as well as the deletion could influence the splice mechanism by usage of unnatural splice sites or intron retention. A hereof resulting changed expression of *Cathepsin D* could influence the formation and course of tumour illnesses in sheep. Scrapiepositive and control animals were screened for the mutation at the twelfth position of exon nine by the use of PCR-RFLP with the enzyme *BseYI*. Neither

atypical nor classical positive sheep showed significant differences in allele or genotype frequencies compared to control animals.

Of the ovine *Calpain, Large Polypeptide L2* gene the promoter and part of the first exon were investigated. Spanning the whole region a CpG island including two G/C boxes was identified. Existing sequence motives point to absence of methylation and indicate that *Calpain, Large Polypeptide L2* belongs to the class of housekeeping genes. In the promoter region at the 191<sup>st</sup> base in front of exon one a single nucleotide polymorphism (G>T) was detected. In case of the wild type allele (G) the programme MatInspector identified a potential binding site for the transcription repressor Zinc Finger Protein Insulinoma-associated 1 (IA-1), which could not be detected in the mutated allele (T). This base pair exchange could be a proapoptotic mutation leading to an increased resistance to neuroendocrine tumours in its carrier. Scrapie positive and control animals were tested via ASPCR and indifferent results were confirmed by a nested PCR followed by a RFLP with the enzyme *MvaI*. Significant differences in genotype or allele frequencies between positive and control animals could be detected in neither scrapie type.

At the 392<sup>nd</sup> position of the fourth intron of the *Kallikrein 1* gene a single nucleotide polymorphism (C>T) was identified. For routine testing a PCR-RFLP with the enzyme *BsmFI* was carried out. Compared to control animals neither in classical nor in atypical scrapiepositive sheep significant differences in genotype or allele frequencies were detected.

In the sixth intron of the ovine *Transforming Growth Factor,  $\beta 1$*  at the 206<sup>th</sup> base in front of the seventh exon a single nucleotide polymorphism (G>T) was identified during sequence analysis. Atypical and classical scrapie cases and controls were investigated by PCR-ACRS with the enzyme *BseGI*. In allele and genotype frequencies no significant differences could be detected between scrapie positive and control animals.

For future studies investigation of candidate genes in the neighbourhood of microsatellites *MCMA53*, *MCMA16* and *MCM159* is a possible approach. In the present study no evidence for an association of the investigated genes with scrapie susceptibility in sheep was detected. Therefore these genes are not of big interest for further studies. In future research a whole genome study using a gene chip and increased sample size should be carried out to screen for gene loci influencing scrapie susceptibility in sheep.

## 8 Literaturverzeichnis

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., Smith, A., Rodellar, C., Badiola, J. J. & Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J. Gen. Virol.* **85**, 2103-10.
- Adamec, E., Mohan, P., Vonsattel, J. P. & Nixon, R. A. (2002). Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2. *Acta Neuropathol.* **104**, 92-104.
- Aguzzi, A. & Sigurdson, C. J. (2004). Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 725-36.
- Akiyama, Y. (1995). TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites. *World Wide Web*, abrufbar unter: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>, 02/2008.
- Albert, J. & Fenyo, E. M. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1560-4.
- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M. & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **81**, 3115-26.
- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M. & Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* **83**, 2607-16.
- Angliker, H., Anagli, J. & Shaw, E. (1992). Inactivation of calpain by peptidyl fluoromethyl ketones. *J. Med. Chem.* **35**, 216-20.
- Arnold, J. E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M. & Mayer, R. J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* **176**, 403-11.
- Arranz, J. J., Bayon, Y. & Primitivo, F. S. (2001). Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Rumin. Res.* **39**, 3-10.
- Ars, E., Serra, E., Garcia, J., Kruyer, H., Gaona, A., Lazaro, C. & Estivill, X. (2000). Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 237-47.
- Arsac, J. N., Andreoletti, O., Bilheude, J.-M., Lacroux, C., Benestad, S. & Baron, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerging Infect. Dis.* **13**, 58-65.
- Auffray, C., Gayon, R., Benraiss, A., Martin, N., Laurendeau, I., Garaud, J., Lucas, B., Boitard, C. & Krief, P. (2006). An 8-bp deletion in mNOTCH4 intron 10 leads to its retention in mRNA and to synthesis of a truncated protein. *Exp. Cell Res.* **312**, 233-44.

- Baker, C. A., Lu, Z. Y., Zaitsev, I. & Manuelidis, L. (1999). Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* **73**, 5089-97.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263-5.
- Baylis, M. & Goldmann, W. (2004). The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr. Mol. Med.* **4**, 385-96.
- Bazzett, L. B., Watkins, C. S., Gercel-Taylor, C. & Taylor, D. D. (1999). Modulation of proliferation and chemosensitivity by procathepsin D and its peptides in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **74**, 181-7.
- Beh, K. J., Riffkin, C. D., Davies, K. P., di Ienno, K. L. & Maddox, J. F. (2000). Dinucleotide repeat polymorphism at the ovine McMA7, McMA10, McMA13, McMA16, McMA17, McMA27, McMA29, McMA42, McMA47 and McMA49 loci. *Anim. Genet.* **31**, 228-9.
- Beier, D. R. (1993). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mamm. Genome* **4**, 627-31.
- Bellworthy, S. J., Dexter, G., Stack, M., Chaplin, M., Hawkins, S. A., Simmons, M. M., Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L. & Hill, P. (2005a). Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet. Rec.* **157**, 206.
- Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Jeffrey, M., Ryder, S., Berthelin-Baker, C. & Simmons, M. M. (2005b). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet. Rec.* **156**, 197-202.
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L. & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **76** (Pt 3), 509-17.
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A. & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**, 202-8.
- Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W. & Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.* **39**, 19.
- Bessen, R. A. & Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* **66**, 2096-101.
- Betmouni, S., Perry, V. H. & Gordon, J. L. (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* **74**, 1-5.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 1-80.

- Billinis, C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyroudis, S., Vlemmas, I., Leontides, S., Sklaviadis, T. & Papadopoulos, O. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J. Gen. Virol.* **85**, 547-54.
- Boche, D., Cunningham, C., Docagne, F., Scott, H. & Perry, V. H. (2006). TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **22**, 638-50.
- Bock, C., Paulsen, M., Tierling, S., Mikeska, T., Lengauer, T. & Walter, J. (2006). CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS Genet.* **2**, e26.
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y. & Nathan, C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* **267**, 23301-8.
- Booth, S., Bowman, C., Baumgartner, R., Dolenko, B., Sorensen, G., Robertson, C., Coulthart, M., Phillipson, C. & Somorjai, R. (2004a). Molecular classification of scrapie strains in mice using gene expression profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1339-45.
- Booth, S., Bowman, C., Baumgartner, R., Sorensen, G., Robertson, C., Coulthart, M., Phillipson, C. & Somorjai, R. L. (2004b). Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection. *J. Gen. Virol.* **85**, 3459-71.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* **110**, 743-52.
- Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B. & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **77** (Pt 10), 2669-73.
- Breslin, M. B., Zhu, M., Notkins, A. L. & Lan, M. S. (2002). Neuroendocrine differentiation factor, IA-1, is a transcriptional repressor and contains a specific DNA-binding domain: identification of consensus IA-1 binding sequence. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1038-45.
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. & Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.
- Brown, A. R., Webb, J., Rebus, S., Williams, A. & Fazakerley, J. K. (2004). Identification of up-regulated genes by array analysis in scrapie-infected mouse brains. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **30**, 555-67.
- Brown, D. R., Schmidt, B., Groschup, M. H. & Kretzschmar, H. A. (1998). Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 29-37.
- Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M. & Robakis, N. K. (1990). The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol.* **80**, 1-6.
-

- Brown, P. & Gajdusek, D. C. (1991). Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337**, 269-70.
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G. & Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **343**, 405-11.
- Bruce, M. E. & Dickinson, A. G. (1985). Genetic control of amyloid plaque production and incubation period in scrapie-infected mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 285-94.
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br. Med. Bull.* **49**, 822-38.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-47.
- Bulgin, M. S., Sorensen, S. J. & Matlock, M. E. (2006). Association between incubation time and genotype in sheep experimentally inoculated with scrapie-positive brain homogenate. *Am. J. Vet. Res.* **67**, 498-504.
- Bulgin, M. S. & Melson, S. S. (2007). What veterinary practitioners should know about scrapie. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **230**, 1158-64, 20.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) (01/2008): Anzahl der bestätigten TSE (Scrapie)-Fälle in Deutschland seit 1990. Abrufbar unter: [http://www.bmelv.de/cln\\_045/nn\\_753460/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Scrapie/TSE-FaelleGesamt.html\\_\\_nnn=true](http://www.bmelv.de/cln_045/nn_753460/DE/07-SchutzderTiere/Tierseuchen/Scrapie/TSE-FaelleGesamt.html__nnn=true).
- Buschmann, A., Biacabe, A. G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J. Y., Erhardt, G., Lühken, G., Baron, T. & Groschup, M. H. (2004a). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* **117**, 27-36.
- Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., Erhardt, G. & Groschup, M. H. (2004b). Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J. Gen. Virol.* **85**, 2727-33.
- Buschmann, A. & Groschup, M. H. (2005). TSE eradication in small ruminants - quo vadis? *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **118**, 365-71.
- Capucchio, M. T., Guarda, F., Pozzato, N., Coppolino, S., Caracappa, S. & Di Marco, V. (2001). Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **48**, 23-31.
- Carlson, G. A., Goodman, P. A., Lovett, M., Taylor, B. A., Marshall, S. T., Peterson-Torchia, M., Westaway, D. & Prusiner, S. B. (1988). Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5528-40.
-

- Carneiro, M. & Ferrand, N. (2007). Extensive intragenic recombination and patterns of linkage disequilibrium at the CSN3 locus in European rabbit. *Genet. Sel. Evol.* **39**, 341-52.
- Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285-98.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. & Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933-42.
- Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D. & Race, R. E. (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* **65**, 6597-603.
- Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J. & Lansbury, P. T., Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol.* **2**, 807-17.
- Chakraborty, C., Nandi, S. & Jana, S. (2005). Prion disease: a deadly disease for protein misfolding. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **6**, 167-77.
- Chao, J. & Chao, L. (2006). Experimental therapy with tissue kallikrein against cerebral ischemia. *Front. Biosci.* **11**, 1323-7.
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P. & Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* **270**, 19173-80.
- Cheng, A. L., Huang, W. G., Chen, Z. C., Zhang, P. F., Li, M. Y., Li, F., Li, J. L., Li, C., Yi, H., Peng, F., Duan, C. J. & Xiao, Z. Q. (2008). Identifying Cathepsin D as a Biomarker for Differentiation and Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma by Laser Capture Microdissection and Proteomic Analysis. *J. Proteome Res.* **7**, 2415-26.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., Garon, C. & Haase, A. T. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-3.
- Chesebro, B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.* **66**, 1-20.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. & Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* **264**, 530-1.
- Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J. & Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* **378**, 779-83.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-90.
-

- Collinge, J. & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**, 930-6.
- Collins, A. R. (2007). Linkage disequilibrium and association mapping: an introduction. In *Linkage disequilibrium and association mapping: analysis and application*, Vol. **376**, pp. 1-15. Edited by A. R. Collins. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Cook, W. (2007). Nor98-like strain of scrapie found in Wyoming. *Wyoming Livestock Board*, abrufbar unter: <http://wlsb.state.wy.us/AnimalHealth.htm>, 01/2008.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J. & Gilbert, W. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* **274**, 775-80.
- Cousens, C., Minguíjon, E., Garcia, M., Ferrer, L. M., Dalziel, R. G., Palmarini, M., De las Heras, M. & Sharp, J. M. (1996). PCR-based detection and partial characterization of a retrovirus associated with contagious intranasal tumors of sheep and goats. *J. Virol.* **70**, 7580-3.
- Cunningham, C., Boche, D. & Perry, V. H. (2002). Transforming growth factor beta1, the dominant cytokine in murine prion disease: influence on inflammatory cytokine synthesis and alteration of vascular extracellular matrix. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **28**, 107-19.
- Daetwyler, H. D., Schenkel, F. S., Sargolzaei, M. & Robinson, J. A. (2008). A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J. Dairy Sci.* **91**, 3225-36.
- Dandoy-Dron, F., Guillo, F., Benboudjema, L., Deslys, J. P., Lasmezas, C., Dormont, D., Tovey, M. G. & Dron, M. (1998). Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J. Biol. Chem.* **273**, 7691-7.
- Davies, K. P., Maddox, J. F., Matthews, P., Hulme, D. J. & Beh, K. J. (1995). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the McM15, McM152, McM159, McM164 and McM210 loci. *Anim. Genet.* **26**, 371.
- Davies, K. P., Maddox, J. F., Harrison, B. & Drinkwater, R. (1996). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at eight anonymous loci. *Anim. Genet.* **27**, 381-2.
- De Bosschere, H., Roels, S., Benestad, S. L. & Vanopdenbosch, E. (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet. Rec.* **155**, 707-8.
- De Bosschere, H., Roels, S., Dechamps, P. & Vanopdenbosch, E. (2005). TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. *Vet. J.* **doi:10.1016/j.tvjl.2005.07.014**.
- De las Heras, M., Ortin, A., Cousens, C., Minguíjon, E. & Sharp, J. M. (2007). Enzootic Nasal Adenocarcinoma of Sheep and Goats. In *Jaagsiekte sheep retrovirus and lung cancer*, pp. 201-24. Edited by H. Fan. Springer, Berlin.
- DeArmond, S. J. (1993). Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease: overlap of pathogenic mechanisms. *Curr. Opin. Neurol.* **6**, 872-81.
-

- Demartini, J. C., Rosadio, R. H. & Lairmore, M. D. (1988). The etiology and pathogenesis of ovine pulmonary carcinoma (sheep pulmonary adenomatosis). *Vet. Microbiol.* **17**, 219-36.
- DeSilva, U., Franklin, I. R., Maddox, J. F., van Hest, B. & Adelson, D. L. (2003). Systematic screening of sheep skin cDNA libraries for microsatellite sequences. *Cytogenet. Genome Res.* **102**, 79-84.
- Detwiler, L. A. & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **22**, 121-43.
- DeWan, A., Klein, R. J. & Hoh, J. (2007). Linkage disequilibrium mapping for complex disease genes. In *Linkage disequilibrium and association mapping: analysis and application*, Vol. **376**, pp. 85-108. Edited by A. R. Collins. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Dheen, S. T., Kaur, C. & Ling, E. A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1189-97.
- Di Bernardo, M. C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, J., Wang, Y., Pittman, A. M., Sunter, N. J., Hall, A. G., Dyer, M. J., Matutes, E., Dearden, C., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., Pettitt, A. R., Hillmen, P., Allsup, D. J., Bailey, J. R., Pratt, G., Pepper, C., Fegan, C., Allan, J. M., Catovsky, D. & Houlston, R. S. (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* **40**, 1204-10.
- Diedrich, J. F., Bendheim, P. E., Kim, Y. S., Carp, R. I. & Haase, A. T. (1991a). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 375-9.
- Diedrich, J. F., Minnigan, H., Carp, R. I., Whitaker, J. N., Race, R., Frey, W., 2nd & Haase, A. T. (1991b). Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* **65**, 4759-68.
- Doherr, M. G. (2007). Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine* **25**, 5619-24.
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13452-7.
- Doré, S., Kar, S. & Quirion, R. (1997). Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **20**, 326-31.
- Drögemüller, C., Leeb, T. & Distl, O. (2001). PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *Vet. Rec.* **149**, 349-52.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T.,

- Gregersen, P. K., Barmada, M. M., Rotter, J. I., Nicolae, D. L. & Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-3.
- Ebringer, A., Rashid, T. & Wilson, C. (2004). Bovine Spongiform Encephalopathy as an Autoimmune Disease Evoked by *Acinetobacter*: Implications for Multiple Sclerosis and Creutzfeldt-Jakob Disease. In *Infection and Autoimmunity*, pp. 383-94. Edited by Y. Shoenfeld & N. R. Rose. Elsevier Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Eiken, H. G., Odland, E., Boman, H., Skjelkvale, L., Engebretsen, L. F. & Apold, J. (1991). Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1427-30.
- Eloit, M., Adjou, K., Culpier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F. & Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.* **156**, 523-4.
- Else, R. W. (2007). Tumours. In *Diseases of sheep*, 4th edn, pp. 443-8. Edited by I. D. Aitken. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Elsen, J. M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andreoletti, O., Eychenne, F., Khang, J. V., Poivey, J. P., Lantier, F. & Laplanche, J. L. (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* **144**, 431-45.
- Enari, M., Flechsig, E. & Weissmann, C. (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9295-9.
- Entscheidung 2003/100/EG der Kommission vom 13. Februar 2003 zur Festlegung von Mindestanforderungen an die Aufstellung von Programmen zur Züchtung von Schafen auf Resistenz gegen übertragbare spongiforme Enzephalopathien. In *ABl. L 41 vom 14.02.2003, S. 41*, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 727/2007 (*ABl. L 165 vom 27.06.2007, S. 8*).
- Epstein, V., Pointing, S. & Halfacre, S. (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet. Rec.* **157**, 667-8.
- Erhardt, G. (2005). Molekulare Gendiagnostik bei Nutztieren. In *Tier-Biotechnologie*, pp. 504-5. Edited by H. Geldermann. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Ersdal, C., Ulvund, M. J., Benestad, S. L. & Tranulis, M. A. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet. Pathol.* **40**, 164-74.
- Espinosa, F., McMahon, A., Chan, E., Wang, S., Ho, C. S., Heintz, N. & Joho, R. H. (2001). Alcohol hypersensitivity, increased locomotion, and spontaneous myoclonus in mice lacking the potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. *J. Neurosci.* **21**, 6657-65.
- European Commission (2001). Opinion on: Hypotheses on the origin and transmission of BSE. Adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 29-30 November 2001. Abrufbar unter: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out236\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out236_en.pdf), 02/2008.

- European Commission (2006): Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2005. Abrufbar unter: [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual\\_reps\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_reps_en.htm), ISSN: 1725-583X.
- European Commission (2007): Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2006. Abrufbar unter: [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual\\_reps\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/annual_reps_en.htm).
- European Food Safety Authority (EFSA) (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on classification of atypical Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) cases in small ruminants. *The EFSA Journal* **276**, 1-30. Abrufbar unter: [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753824\\_1178620776235.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753824_1178620776235.htm).
- Everest, S. J., Thorne, L., Barnicle, D. A., Edwards, J. C., Elliott, H., Jackman, R. & Hope, J. (2006). Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J. Gen. Virol.* **87**, 471-7.
- FAO Statistical Database (FAOSTAT) (01/2008): Sheep stocks in the European Union 27 in 2006. Abrufbar unter: <http://faostat.fao.org/>.
- Faustino, N. A. & Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**, 419-37.
- Ferreiro, E., Resende, R., Costa, R., Oliveira, C. R. & Pereira, C. M. (2006). An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* **23**, 669-78.
- Foekens, J. A., Look, M. P., Bolt-de Vries, J., Meijer-van Gelder, M. E., van Putten, W. L. & Klijn, J. G. (1999). Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br. J. Cancer* **79**, 300-7.
- Foster, J. D., Parnham, D., Chong, A., Goldmann, W. & Hunter, N. (2001a). Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.* **148**, 165-71.
- Foster, J. D., Parnham, D. W., Hunter, N. & Bruce, M. (2001b). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J. Gen. Virol.* **82**, 2319-26.
- Fryer, H. R., Baylis, M., Sivam, K. & McLean, A. R. (2007). Quantifying the risk from ovine BSE and the impact of control strategies. *Proc. Biol. Sci.* **274**, 1497-503.
- Gan, L., Ye, S., Chu, A., Anton, K., Yi, S., Vincent, V. A., von Schack, D., Chin, D., Murray, J., Lohr, S., Patthy, L., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K. & Urfer, R. (2004). Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by Abeta-activated microglial cells using a functional genomics approach. *J. Biol. Chem.* **279**, 5565-72.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261-82.

- Gardner, R. B., Alcaraz, A., Porter, B. F. & Divers, T. J. (2005). Udder development, lactation and ascites in a ewe with an ovarian granulosa cell tumour. *Aust. Vet. J.* **83**, 486-8.
- Gavier-Widen, D., Noremark, M., Benestad, S., Simmons, M., Renstrom, L., Bratberg, B., Elvander, M. & af Segerstad, C. H. (2004). Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**, 562-7.
- Gavier-Widen, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A. & Simmons, M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 509-27.
- Gentile, A. & Testoni, S. (2006). Inherited disorders of cattle: A selected review. *Slov. Vet. Res.* **43**, 17-29.
- Gibbs, C. J., Jr. & Bolis, C. L. (1997). Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol. Psychiatry* **2**, 146-7.
- Giese, A., Groschup, M. H., Hess, B. & Kretzschmar, H. A. (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* **5**, 213-21.
- Giese, A., Brown, D. R., Groschup, M. H., Feldmann, C., Haist, I. & Kretzschmar, H. A. (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* **8**, 449-57.
- Glondou, M., Liaudet-Coopman, E., Derocq, D., Platet, N., Rochefort, H. & Garcia, M. (2002). Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* **21**, 5127-34.
- Goldammer, T., Kata, S. R., Brunner, R. M., Dorroch, U., Sanftleben, H., Schwerin, M. & Womack, J. E. (2002). A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2106-11.
- Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K. & Hope, J. (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2476-80.
- Goldmann, W., Hunter, N., Benson, G., Foster, J. D. & Hope, J. (1991). Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *J. Gen. Virol.* **72** (Pt 10), 2411-7.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. & Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol.* **75** (Pt 5), 989-95.
- Goldmann, W., Houston, F., Stewart, P., Perucchini, M., Foster, J. & Hunter, N. (2006). Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *J. Gen. Virol.* **87**, 3741-5.

- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731-801.
- Gonzalez, L., Balaguer, L., Romano, J., Idigoras, I. & Cuervo, L. (1994). Prolactinoma in a sheep. *J. Comp. Pathol.* **111**, 321-6.
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M. & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J. Comp. Pathol.* **126**, 17-29.
- Goto, Y., De Silva, M. G., Toscani, A., Prabhakar, B. S., Notkins, A. L. & Lan, M. S. (1992). A novel human insulinoma-associated cDNA, IA-1, encodes a protein with "zinc-finger" DNA-binding motifs. *J. Biol. Chem.* **267**, 15252-7.
- Gravenor, M. B., Papasozomenos, P., McLean, A. R. & Neophytou, G. (2004). A scrapie epidemic in Cyprus. *Epidemiol. Infect.* **132**, 751-60.
- Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Lühken, G., Erhardt, G. & Groschup, M. H. (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **52**, 55-63.
- Gronbaek, K., Hother, C. & Jones, P. A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS* **115**, 1039-59.
- Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Lühken, G., Mathey, J., Eiden, M., Lugan, S., Hoffmann, C., Espinosa, J. C., Baron, T., Torres, J. M., Erhardt, G. & Andreoletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging Infect. Dis.* **13**, 1201-7.
- Grynspan, F., Griffin, W. R., Cataldo, A., Katayama, S. & Nixon, R. A. (1997). Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **763**, 145-58.
- Guo, X., Kupfer, D. M., Fitch, G. Q., Roe, B. A. & DeSilva, U. (2003). Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Anim. Genet.* **34**, 303-5.
- Guryev, V., Smits, B. M., van de Belt, J., Verheul, M., Hubner, N. & Cuppen, E. (2006). Haplotype block structure is conserved across mammals. *PLoS Genet.* **2**, 1111-8.
- Haliassos, A., Chomel, J. C., Tesson, L., Baudis, M., Kruh, J., Kaplan, J. C. & Kitzis, A. (1989). Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3606.
- Hardy, G. H. (1908). Mendelian Proportions In A Mixed Population. *Science* **28**, 49-50.
- Harris, D. A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 429-44.
- Hata, A., Ohno, S., Akita, Y. & Suzuki, K. (1989). Tandemly reiterated negative enhancer-like elements regulate transcription of a human gene for the large subunit of calcium-dependent protease. *J. Biol. Chem.* **264**, 6404-11.
-

- Head, K. (1990). Tumours in sheep. *In practice* **12**, 68-80.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A., Podkolodny, N. L. & Kolchanov, N. A. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* **26**, 362-7.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-50, 526.
- Hilton, D. A. (2006). Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Pathol.* **208**, 134-41.
- Ho, C. S., Grange, R. W. & Joho, R. H. (1997). Pleiotropic effects of a disrupted K<sup>+</sup> channel gene: reduced body weight, impaired motor skill and muscle contraction, but no seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1533-8.
- Hopp, P., Ulvund, M. J. & Jarp, J. (2001). A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* **51**, 183-98.
- Hopp, P., Omer, M. K. & Heier, B. T. (2006). A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J. Gen. Virol.* **87**, 3729-36.
- Horn, G. (2001). Review of the origin of BSE. *DEFRA, London*, 1-66. Abrufbar unter: <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/publications/index.html>, 02/2008.
- Hörnlimann, B. (2001). Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten. In *Prionen und Prionkrankheiten*, pp. 3-20. Edited by B. Hörnlimann, D. Riesner & H. Kretzschmar. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin.
- Hou, J., Clemmons, D. R. & Smeekens, S. (2005). Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5. *J. Cell. Biochem.* **94**, 470-84.
- Houston, E. F., Halliday, S. I., Jeffrey, M., Goldmann, W. & Hunter, N. (2002). New Zealand sheep with scrapie-susceptible PrP genotypes succumb to experimental challenge with a sheep-passaged scrapie isolate (SSBP/1). *J. Gen. Virol.* **83**, 1247-50.
- Houston, E. F. & Gravenor, M. B. (2003). Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet. Rec.* **152**, 333-4.
- Houston, F., Goldmann, W., Chong, A., Jeffrey, M., Gonzalez, L., Foster, J., Parnham, D. & Hunter, N. (2003). Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* **423**, 498.
- Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J. & Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* **141**, 809-24.
- Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingwall, W. S. & Greig, A. (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet. Rec.* **140**, 59-63.
-

- Hunter, N. (2003). Scrapie and experimental BSE in sheep. *Br. Med. Bull.* **66**, 171-83.
- Hunter, N. (2007). Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 619-28.
- Iannuzzi, L., Palomba, R., Di Meo, G. P., Perucatti, A. & Ferrara, L. (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **81**, 202-4.
- Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K. M., Snelling, W. M., Kappes, S. M., Beattie, C. W., Bennett, G. L. & Sugimoto, Y. (2004). A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* **14**, 1987-98.
- Ikeda, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Muramatsu, Y., Kai-Uwe, G. D. & Shinagawa, M. (1995). Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J. Gen. Virol.* **76** (Pt 10), 2577-81.
- Ishidoh, K. & Kominami, E. (2002). Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol. Chem.* **383**, 1827-31.
- Iwadate, H., Kawamata, K., Kudo, M. & Kizuki, K. (2000). Biochemical and immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neuronal nuclei of the developing rat brains. *Brain Res.* **863**, 87-93.
- Iwadate, H., Sugisaki, T., Kudo, M. & Kizuki, K. (2003). Actions of insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) are potentially regulated by tissue kallikrein in rat brains. *Life Sci.* **73**, 3149-58.
- Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A., Terry, L., Berthelin-Baker, C. & Bellworthy, S. J. (2001). Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J. Comp. Pathol.* **124**, 280-9.
- Jolly, R. D., Martinus, R. D. & Palmer, D. N. (1992). Sheep and other animals with ceroid-lipofuscinoses: their relevance to Batten disease. *Am. J. Med. Genet.* **42**, 609-14.
- Khatkar, M. S., Nicholas, F. W., Collins, A. R., Zenger, K. R., Cavanagh, J. A., Barris, W., Schnabel, R. D., Taylor, J. F. & Raadsma, H. W. (2008). Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics* doi:10.1186/1471-2164-9-187.
- Kim, S., Ock, J., Kim, A. K., Lee, H. W., Cho, J. Y., Kim, D. R., Park, J. Y. & Suk, K. (2007). Neurotoxicity of microglial cathepsin D revealed by secretome analysis. *J. Neurochem.* doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04995.x.
- Kim, W. K., Hwang, S. Y., Oh, E. S., Piao, H. Z., Kim, K. W. & Han, I. O. (2004). TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Immunol.* **172**, 7015-23.
- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. (1978a). Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J. Comp. Pathol.* **88**, 39-47.
-

- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. (1978b). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J. Gen. Virol.* **39**, 487-96.
- Kingham, P. J. & Pocock, J. M. (2001). Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* **76**, 1475-84.
- Kizuki, K., Ookubo, R., Iwadate, H. & Sada, K. (2006). [Growth-stimulating effect of kallikrein on rat neural stem cells]. *Yakugaku Zasshi* **126**, 997-1001.
- Kizuki, K., Iwadate, H. & Ookubo, R. (2007). Growth-stimulating effect of kallikrein on rat neural stem cells--II. Immunocytochemical analysis and specificity of the enzyme for neural stem cells. *Yakugaku Zasshi* **127**, 919-22.
- Klingeborn, M., Wik, L., Simonsson, M., Renstrom, L. H., Ottinger, T. & Linne, T. (2006). Characterization of proteinase K-resistant N- and C-terminally truncated PrP in Nor98 atypical scrapie. *J. Gen. Virol.* **87**, 1751-60.
- Koike, M., Nakanishi, H., Saftig, P., Ezaki, J., Isahara, K., Ohsawa, Y., Schulz-Schaeffer, W., Watanabe, T., Waguri, S., Kametaka, S., Shibata, M., Yamamoto, K., Kominami, E., Peters, C., von Figura, K. & Uchiyama, Y. (2000). Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J. Neurosci.* **20**, 6898-906.
- Kossarek, L. M., Grosse, W. M., Dietz, A. B., Womack, J. E. & McGraw, R. A. (1993). Rapid communication: bovine dinucleotide repeat polymorphism RM004. *J. Anim. Sci.* **71**, 3175.
- Kovacs, G. G., Gelpi, E., Strobel, T., Ricken, G., Nyengaard, J. R., Bernheimer, H. & Budka, H. (2007). Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 628-36.
- Krebs, S., Medugorac, I., Rother, S., Strasser, K. & Forster, M. (2007). A missense mutation in the 3-ketodihydrosphingosine reductase FVT1 as candidate causal mutation for bovine spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6746-51.
- Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. & Dearmond, S. J. (1986). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315-24.
- Kristensson, K., Feuerstein, B., Taraboulos, A., Hyun, W. C., Prusiner, S. B. & DeArmond, S. J. (1993). Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* **43**, 2335-41.
- Kümper, H. (1994). Scrapie aus klinischer Sicht. *Tierärztl. Prax.* **22**, 115-20.
- Kuo, T.-Y., Lau, W. & Collins, A. R. (2007). LDMAP: The construction of high-resolution linkage disequilibrium maps of the human genome. In *Linkage disequilibrium and association mapping: analysis and application*, Vol. **376**, pp. 47-58. Edited by A. R. Collins. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Kutzer, T., Pfeiffer, I. & Brenig, B. (2002). Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *J. Anim. Breed. Genet.* **119**, 201-8.
-

- Labarga, A., Valentin, F., Anderson, M. & Lopez, R. (2007). Web services at the European bioinformatics institute. *Nucleic Acids Res.* **35**, W6-11.
- Lacroux, C., Corbiere, F., Tabouret, G., Lugan, S., Costes, P., Mathey, J., Delmas, J. M., Weisbecker, J. L., Foucras, G., Cassard, H., Elsen, J. M., Schelcher, F. & Andreoletti, O. (2007). Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep. *J. Gen. Virol.* **88**, 1056-61.
- Lantier, F., Berthon, P., Sarradin, P., Khang, J. V. & Elsen, J. M. (1996). Génétique des encephalopathies spongiformes animales. *Med. Mal. Infect.* **26**, 259-63.
- Laurent-Matha, V., Maruani-Herrmann, S., Prebois, C., Beaujouin, M., Glondou, M., Noel, A., Alvarez-Gonzalez, M. L., Blacher, S., Coopman, P., Baghdiguian, S., Gilles, C., Loncarek, J., Freiss, G., Vignon, F. & Liaudet-Coopman, E. (2005). Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J. Cell Biol.* **168**, 489-99.
- Lawson, V. A., Collins, S. J., Masters, C. L. & Hill, A. F. (2005). Prion protein glycosylation. *J. Neurochem.* **93**, 793-801.
- Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L. & Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16031-6.
- Leeb, T. (2005). Darstellung von DNA-Varianten. In *Tier-Biotechnologie*, pp. 198-230. Edited by H. Geldermann. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Leroux, C., Girard, N., Cottin, V., Greenland, T., Mornex, J. F. & Archer, F. (2007). Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet. Res.* **38**, 211-28.
- Letterio, J. J. & Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137-61.
- Leverrier, S., Vallentin, A. & Joubert, D. (2002). Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem. J.* **368**, 905-13.
- Lewis, P. A., Properzi, F., Prodromidou, K., Clarke, A. R., Collinge, J. & Jackson, G. S. (2006). Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP(Sc) by cathepsin D does not reduce prion infectivity. *Biochem. J.* **395**, 443-8.
- Lezmi, S., Ronzon, F., Bencsik, A., Bedin, A., Calavas, D., Richard, Y., Simon, S., Grassi, J. & Baron, T. (2006). PrP(d) accumulation in organs of ARQ/ARQ sheep experimentally infected with BSE by peripheral routes. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 399-405.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A. & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* **11**, 2453-65.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T. & Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 991-1007.
-

- Liao, Y. C., Lebo, R. V., Clawson, G. A. & Smuckler, E. A. (1986). Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* **233**, 364-7.
- Lipsky, S. (2006). Beziehungen zwischen Prionproteingenotypen und Leistungsmerkmalen bei verschiedenen Schafrassen. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, WB Laufersweiler Verlag, Gießen.
- Liu, H. X., Cartegni, L., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat. Genet.* **27**, 55-8.
- Lloyd, S. E., Onwuazor, O. N., Beck, J. A., Mallinson, G., Farrall, M., Targonski, P., Collinge, J. & Fisher, E. M. (2001). Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6279-83.
- Lloyd, S. E., Uphill, J. B., Targonski, P. V., Fisher, E. M. & Collinge, J. (2002). Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics* **4**, 77-81.
- Lodge, P. A. & Sriram, S. (1996). Regulation of microglial activation by TGF-beta, IL-10, and CSF-1. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 502-8.
- Long, A. D. & Langley, C. H. (1999). The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res.* **9**, 720-31.
- Lopes, J. P., Oliveira, C. R. & Agostinho, P. (2007). Role of cyclin-dependent kinase 5 in the neurodegenerative process triggered by amyloid-Beta and prion peptides: implications for Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies. *Cell. Mol. Neurobiol.* **27**, 943-57.
- Lou, X., Xiao, T., Zhao, K., Wang, H., Zheng, H., Lin, D., Lu, Y., Gao, Y., Cheng, S., Liu, S. & Xu, N. (2007). Cathepsin D is secreted from M-BE cells: its potential role as a biomarker of lung cancer. *J. Proteome Res.* **6**, 1083-92.
- Lowe, S. W. & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-95.
- Lühken, G., Buschmann, A., Groschup, M. H. & Erhardt, G. (2004). Prion protein allele A136 H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch. Virol.* **149**, 1571-80.
- Lühken, G., Brandt, H. R., Buschmann, A., Groschup, M. H. & Erhardt, G. (2006). Microsatellite CTSBJ12 is located distal to the ovine prion protein gene on OAR13 and is not associated with scrapie susceptibility. *Anim. Genet.* **37**, 426-7.
- Lühken, G., Buschmann, A., Brandt, H., Eiden, M., Groschup, M. H. & Erhardt, G. (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet. Res.* **38**, 65-80.
- Luhr, K. M., Nordstrom, E. K., Low, P. & Kristensson, K. (2004a). Cathepsin B and L are involved in degradation of prions in GT1-1 neuronal cells. *Neuroreport* **15**, 1663-7.

- Luhr, K. M., Nordstrom, E. K., Low, P., Ljunggren, H. G., Taraboulos, A. & Kristensson, K. (2004b). Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c<sup>+</sup> dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J. Virol.* **78**, 4776-82.
- Madec, J. Y., Simon, S., Lezmi, S., Bencsik, A., Grassi, J. & Baron, T. (2004). Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock. *J. Gen. Virol.* **85**, 3483-6.
- Maguchi, S., Taniguchi, N. & Makita, A. (1988). Elevated activity and increased mannose-6-phosphate in the carbohydrate moiety of cathepsin D from human hepatoma. *Cancer Res.* **48**, 362-7.
- Majewski, J. & Ott, J. (2002). Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res.* **12**, 1827-36.
- Manolakou, K., Beaton, J., McConnell, I., Farquar, C., Manson, J., Hastie, N. D., Bruce, M. & Jackson, I. J. (2001). Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7402-7.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597-641.
- Mattes, W. B. (1998). The basics of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols in molecular toxicology*, pp. 1-40. Edited by J. P. Vanden Heuvel. Crc.
- McEwan, J. C., Gibbs, R., Weinstock, G., Payne, G. M., Oddy, V. H., Nicholas, F. W., Dalrymple, B. P., International Sheep Genomics Consortia (2008). 454 Sequencing and SNP discovery in sheep: Project design and interim results. *Plant & Animal Genomes XVI Conference*, January 12-6, San Diego, CA, USA. Abrufbar unter: [http://www.intl-pag.org/16/abstracts/PAG16\\_W11\\_93.html](http://www.intl-pag.org/16/abstracts/PAG16_W11_93.html).
- McKinnon, A. O., Thorsen, J., Hayes, M. A. & Misener, C. R. (1982). Enzootic Nasal Adenocarcinoma of Sheep in Canada. *Can. Vet. J.* **23**, 88-94.
- McLaughlin, P., Zhou, Y., Ma, T., Liu, J., Zhang, W., Hong, J. S., Kovacs, M. & Zhang, J. (2006). Proteomic analysis of microglial contribution to mouse strain-dependent dopaminergic neurotoxicity. *Glia* **53**, 567-82.
- McMahon, A., Fowler, S. C., Perney, T. M., Akemann, W., Knopfel, T. & Joho, R. H. (2004). Allele-dependent changes of olivocerebellar circuit properties in the absence of the voltage-gated potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 3317-27.
- Mechelli, L. & Mantovani, A. (1988). Scrapie in sheep in central and southern Italy. *Vet. Res. Commun.* **12**, 165-7.
- Minghetti, L. & Levi, G. (1998). Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* **54**, 99-125.
- Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A. & Levi, G. (1998). Opposite regulation of prostaglandin E2 synthesis by transforming growth factor-beta1 and interleukin 10 in activated microglial cultures. *J. Neuroimmunol.* **82**, 31-9.

- Minghetti, L., Greco, A., Cardone, F., Puopolo, M., Ladogana, A., Almonti, S., Cunningham, C., Perry, V. H., Pocchiari, M. & Levi, G. (2000). Increased brain synthesis of prostaglandin E2 and F2-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 866-71.
- Montera, M., Piaggio, F., Marchese, C., Gismondi, V., Stella, A., Resta, N., Varesco, L., Guanti, G. & Mareni, C. (2001). A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J. Med. Genet.* **38**, 863-7.
- Moreau, A., Duez, C. & Dusart, J. (1997). GC-rich template amplification by Inverse PCR. In *Methods in molecular biology*, Vol. **67**, pp. 47. Edited by B. A. White. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Morel, E., Fouquet, S., Chateau, D., Yvernault, L., Frobert, Y., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., Pillot, T. & Rousset, M. (2004). The cellular prion protein PrP<sup>c</sup> is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J. Biol. Chem.* **279**, 1499-505.
- Moreno, C. R., Lantier, I., Lantier, F., Andreoletti, O., Vaiman, D., Sarradin, P., Echeynne, F., Cribiu, E. P., Cosseddu, G. & Elsen, J. M. (2002). Transposition to sheep of mouse quantitative trait Loci (QTL) influencing susceptibility to prion diseases. *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, August 19th-23rd, Session 13: Disease resistance.
- Moreno, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P. & Elsen, J. M. (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* **165**, 2085-91.
- Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S. & Kuwano, M. (2000). Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 38912-20.
- Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M. & Benestad, S. L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.* **86**, 231-5.
- Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. *World Wide Web* (URL: <http://www.informatics.jax.org>) (01/2008).
- Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. *World Wide Web* (URL: <http://www.informatics.jax.org>) (06/2007).
- Mueller-Stainer, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L. & Gan, L. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* **51**, 703-14.
- Mühlhardt, C. (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
- Müller, H.-J. (2001). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.

- Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drögemüller, C., Zurbriggen, A. & Seuberlich, T. (2007). Diversity in Neuroanatomical Distribution of Abnormal Prion Protein in Atypical Scrapie. *PLoS Pathog.* **3**, e82.
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. & Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503-16.
- O'Doherty, E., Healy, A., Aherne, M., Hanrahan, J. P., Weavers, E., Doherty, M., Roche, J. F., Gunn, M. & Sweeney, T. (2002). Prion protein (PrP) gene polymorphisms associated with natural scrapie cases and their flock-mates in Ireland. *Res. Vet. Sci.* **73**, 243-50.
- O'Donovan, C. N., Tobin, D. & Cotter, T. G. (2001). Prion protein fragment PrP-(106-126) induces apoptosis via mitochondrial disruption in human neuronal SH-SY5Y cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 43516-23.
- Oda, S., Wada, Y., Kondo, H., Ishikawa, Y. & Kadota, K. (1997). Pituitary adenoma with prolactin and growth hormone production in a sheep. *J. Comp. Pathol.* **117**, 171-5.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46.
- OIE (2004). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), **Vol. 2**, pp. 642-53.
- Olsson, A. Y. & Lundwall, A. (2002). Organization and evolution of the glandular kallikrein locus in *Mus musculus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 305-11.
- Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., Benestad, S. L. & Bassett, H. F. (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet. Rec.* **155**, 636-7.
- Orge, L., Galo, A., Machado, C., Lima, C., Ochoa, C., Silva, J., Ramos, M. & Simas, J. P. (2004). Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J. Gen. Virol.* **85**, 3487-91.
- Ortin, A., Ferrer, L. M., Loste, A., Garcia de Jalon, J. A., Gomez, P. & Ramos, J. J. (2006). Coexistence of pituitary adenocarcinoma and intraocular melanoma in a sheep. *Vet. Rec.* **159**, 718-9.
- Östlund, P., Lindegren, H., Pettersson, C. & Bedecs, K. (2001). Up-regulation of functionally impaired insulin-like growth factor-1 receptor in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 36110-5.
- OXGRID - The Oxford Grid Project, Australian National Genomic Information Service (ANGIS). *World Wide Web* (URL: [http://oxgrid.angis.org.au/sheep/mouse/500\\_index.html](http://oxgrid.angis.org.au/sheep/mouse/500_index.html)) (11/2008).
- Palmarini, M., Dewar, P., De las Heras, M., Inglis, N. F., Dalziel, R. G. & Sharp, J. M. (1995). Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. *J. Gen. Virol.* **76** (Pt 11), 2731-7.
-

- Palmarini, M., Sharp, J. M., de las Heras, M. & Fan, H. (1999). Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J. Virol.* **73**, 6964-72.
- Paltrinieri, S., Comazzi, S., Spagnolo, V., Rondena, M., Ponti, W. & Ceciliani, F. (2004). Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 1639-45.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10962-6.
- Park, J. H., Gimbel, D. A., GrandPre, T., Lee, J. K., Kim, J. E., Li, W., Lee, D. H. & Strittmatter, S. M. (2006). Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J. Neurosci.* **26**, 1386-95.
- Park, S. Y., Cho, N., Chang, I., Chung, J. H., Min, Y. K., Lee, M. K., Kim, K. W., Kim, S. J. & Lee, M. S. (2005). Effect of PK11195, a peripheral benzodiazepine receptor agonist, on insulinoma cell death and insulin secretion. *Apoptosis* **10**, 537-44.
- Pattison, J. (1998). The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerging Infect. Dis.* **4**, 390-4.
- Paulsen, M., Tierling, S. & Walter, J. (2008). DNA methylation and the mammalian genome. In *Epigenetics*, pp. 1-22. Edited by J. Tost. Caister Academic Press.
- Peral, B., Gamble, V., San Millan, J. L., Strong, C., Sloane-Stanley, J., Moreno, F. & Harris, P. C. (1995). Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 569-74.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R. & Prusiner, S. B. (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**, 739-43.
- Peter, C. (2005). Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, WB Laufersweiler Verlag, Wettenberg.
- Petrie, L., Heath, B. & Harold, D. (1989). Scrapie: Report of an outbreak and brief review. *Can. Vet. J.* **30**, 321-7.
- Pignot, V., Hein, A. E., Barske, C., Wiessner, C., Walmsley, A. R., Kaupmann, K., Mayeur, H., Sommer, B., Mir, A. K. & Frentzel, S. (2003). Characterization of two novel proteins, NgrH1 and NgrH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J. Neurochem.* **85**, 717-28.
- Prinzenberg, E. M. (1998). Entwicklung von Gendiagnoseverfahren für seltene Milchproteinvarianten beim Rind unter Berücksichtigung des Vorkommens bei vom Aussterben bedrohten Rassen. Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachverlag Köhler, Gießen.
-

- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44.
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P. & Alpers, M. P. (1985). Transmission of scrapie in hamsters. *J. Infect. Dis.* **152**, 971-8.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., Hoppe, P. C., Westaway, D. & DeArmond, S. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-86.
- Prusiner, S. B. (1991a). Molecular biology of prions causing infectious and genetic encephalopathies of humans as well as scrapie of sheep and BSE of cattle. *Dev. Biol. Stand.* **75**, 55-74.
- Prusiner, S. B. (1991b). Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-22.
- Prusiner, S. B. (1995). The prion diseases. *Sci. Am.* **272**, 48-51, 4-7.
- Prusiner, S. B. (1998). The prion diseases. *Brain Pathol.* **8**, 499-513.
- Ridley, M. (2004). Evolution. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-2.
- Riemer, C., Neidhold, S., Burwinkel, M., Schwarz, A., Schultz, J., Kratzschmar, J., Monning, U. & Baier, M. (2004). Gene expression profiling of scrapie-infected brain tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 556-64.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by S. Krawetz & S. Misener. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Rubie, C., Kempf, K., Hans, J., Su, T., Tilton, B., Georg, T., Brittner, B., Ludwig, B. & Schilling, M. (2005). Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol. Cell. Probes* **19**, 101-9.
- Safar, J. G., DeArmond, S. J., Kociuba, K., Deering, C., Didorenko, S., Bouzamondo-Bernstein, E., Prusiner, S. B. & Tremblay, P. (2005). Prion clearance in bigenic mice. *J. Gen. Virol.* **86**, 2913-23.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-7.
- Saunders, G. C., Cawthraw, S., Mountjoy, S. J., Hope, J. & Windl, O. (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J. Gen. Virol.* **87**, 3141-9.
-

- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* **245**, 362-74.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 63-9.
- Schmidt, P. & Dahme, E. (1999). Organe der inneren Sekretion (endokrines System). In *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, pp. 459-84. Edited by E. Dahme & E. Weiss. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Schneider, K., Fangerau, H. & Raab, W. H. (2007). [The early history of transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie]. *Nervenarzt* **78**, 156, 8-60, 62-65.
- Schultz, J., Schwarz, A., Neidhold, S., Burwinkel, M., Riemer, C., Simon, D., Kopf, M., Otto, M. & Baier, M. (2004). Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am. J. Pathol.* **165**, 671-8.
- Scott, L. J., Mohlke, K. L., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Li, Y., Duren, W. L., Erdos, M. R., Stringham, H. M., Chines, P. S., Jackson, A. U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C. J., Swift, A. J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X. Y., Conneely, K. N., Riebow, N. L., Sprau, A. G., Tong, M., White, P. P., Hetrick, K. N., Barnhart, M. W., Bark, C. W., Goldstein, J. L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T. A., Watanabe, R. M., Valle, T. T., Kinnunen, L., Abecasis, G. R., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Collins, F. S. & Boehnke, M. (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* **316**, 1341-5.
- Sedarous, M., Keramaris, E., O'Hare, M., Melloni, E., Slack, R. S., Elce, J. S., Greer, P. A. & Park, D. S. (2003). Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J. Biol. Chem.* **278**, 26031-8.
- Seidel, B., Thomzig, A., Buschmann, A., Groschup, M. H., Peters, R., Beekes, M. & Terytze, K. (2007). Scrapie Agent (Strain 263K) Can Transmit Disease via the Oral Route after Persistence in Soil over Years. *PLoS ONE* **2**, e435.
- Sharp, J. M. & De las Heras, M. (2007). Contagious respiratory tumours. In *Diseases of sheep*, 4th edn, pp. 211-7. Edited by I. D. Aitken. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Sheep Comparative Maps CMap site, this site uses CMap v0.16, free software of the Generic Components for Model Organism Database project (GMOD; <http://www.gmod.org>). <http://sphinx.vet.unimelb.edu.au/cmap/> (01/2008).
- Shyng, S. L., Huber, M. T. & Harris, D. A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 15922-8.
- Siintola, E., Partanen, S., Stromme, P., Haapanen, A., Haltia, M., Maehlen, J., Lehesjoki, A. E. & Tyynela, J. (2006). Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **129**, 1438-45.

- Simmons, M. M., Konold, T., Simmons, H. A., Spencer, Y. I., Lockey, R., Spiropoulos, J., Everitt, S. & Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet. Res.* **3**, 20.
- Simpson, B. H. (1972). An epidemiological study of carcinoma of the small intestine in New Zealand sheep. *N. Z. Vet. J.* **20**, 91-7.
- Skinner, P. J., Abbassi, H., Chesebro, B., Race, R. E., Reilly, C. & Haase, A. T. (2006). Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie. *BMC Genomics* **7**, 114.
- Smith, P. J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S. L., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2490-508.
- Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., DeArmond, S., Westaway, D., Prusiner, S. B. & Weiner, L. P. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 7358-62.
- St-Arnaud, R. & Moir, J. M. (1993). Wnt-1-inducing factor-1: a novel G/C box-binding transcription factor regulating the expression of Wnt-1 during neuroectodermal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1590-8.
- Stack, M. J., Chaplin, M. J. & Clark, J. (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol.* **104**, 279-86.
- Stamm, S., Riethoven, J. J., Le Texier, V., Gopalakrishnan, C., Kumanduri, V., Tang, Y., Barbosa-Morais, N. L. & Thanaraj, T. A. (2006). ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **34**, D46-55.
- Stephenson, D. A., Chiotti, K., Ebeling, C., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Carlson, G. A. (2000). Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* **69**, 47-53.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**, 1102-4.
- Sun, H. S., Huff, B. M., Dentine, M. R. & Kirkpatrick, B. W. (1994). Polymorphic bovine microsatellites UWCA5, UWCA7 and UWCA9. *Anim. Genet.* **25**, 59.
- Supattapone, S., Nguyen, H. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Scott, M. R. (1999). Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14529-34.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F. C., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Scott, M. R. (2001). Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.* **75**, 3453-61.

- Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D. & Prusiner, S. B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* **3**, 851-63.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. & Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**, 2079-82.
- Thanaraj, T. A., Stamm, S., Clark, F., Riethoven, J. J., Le Texier, V. & Muilu, J. (2004). ASD: the Alternative Splicing Database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D64-9.
- Toh, Y., Oki, E., Oda, S., Tomoda, M., Tomisaki, S., Ichiyoshi, Y., Ohno, S. & Sugimachi, K. (1996). An integrated microsatellite length analysis using an automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res.* **56**, 2688-91.
- Toumazos, P. (1988). First report of ovine scrapie in Cyprus. *Br. Vet. J.* **144**, 98-100.
- Toumazos, P. (1991). Scrapie in Cyprus. *Br. Vet. J.* **147**, 147-54.
- Tranulis, M. A. (2002). Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. *APMIS* **110**, 33-43.
- Tsuji, T., Shimohama, S., Kimura, J. & Shimizu, K. (1998). m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* **248**, 109-12.
- Tuo, W., Zhuang, D., Knowles, D. P., Cheevers, W. P., Sy, M. S. & O'Rourke, K. I. (2001). Prp-c and Prp-Sc at the fetal-maternal interface. *J. Biol. Chem.* **276**, 18229-34.
- Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R. & Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6310-5.
- Tyynela, J., Sohar, I., Sleat, D. E., Gin, R. M., Donnelly, R. J., Baumann, M., Haltia, M. & Lobel, P. (2000). A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. *EMBO J.* **19**, 2786-92.
- Vaccari, G., D'Agostino, C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., Di Bari, M. A., Chiappini, B., Esposito, E., De Grossi, L., Giordani, F., Marcon, S., Morelli, L., Borroni, R. & Agrimi, U. (2007). Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J. Virol.* **81**, 7306-9.
- Valerio, D., van der Putten, H., Botteri, F. M. & Hoogerbrugge, P. M. (1988). Activity of the adenosine deaminase promoter in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10083-97.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. & Langeveld, J. P. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet. Pathol.* **32**, 299-308.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. & Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1228-31.
-

- van Keulen, L. J., Vromans, M. E. & van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* **110**, 23-32.
- Vana, K., Zuber, C., Nikles, D. & Weiss, S. (2007). Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* **27**, 107-28.
- Vargas, F., Bolea, R., Monleon, E., Acin, C., Vargas, A., De Blas, I., Lujan, L. & Badiola, J. J. (2005). Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Vet. Rec.* **156**, 318-20.
- Vashishta, A., Ohri, S. S., Proctor, M., Fusek, M. & Vetvicka, V. (2006). Role of activation peptide of procathepsin D in proliferation and invasion of lung cancer cells. *Anticancer Res.* **26**, 4163-70.
- Verordnung (EG) Nr. 36/2005 der Kommission vom 12. Januar 2005 zur Änderung der Anhänge III und X der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlamentes und des Rates hinsichtlich der epidemiologischen Überwachung auf transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Rindern, Schafen und Ziegen. In *ABl. L 10 vom 13.01.2005*, S. 9.
- Verordnung (EG) Nr. 727/2007 der Kommission vom 26. Juni 2007 zur Änderung der Anhänge I, III, VII und X der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlamentes und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien. In *ABl. L 165 vom 27.06.2007*, S. 8.
- Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. In *ABl. L 273 vom 10.10.2002*, S. 1, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 829/2007 (*ABl. L 191 vom 21.07.2007*, S. 1).
- Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien. In *ABl. L 147 vom 31.05.2001*, S. 1, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 727/2007 (*ABl. L 165 vom 27.06.2007*, S. 8).
- Verordnung zur Festlegung der Mindestanforderungen an die Züchtung auf Resistenz gegen transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Schafen (TSE-Resistenzzuchtverordnung) vom 17. Oktober 2005. In *BGBl. I S. 3028*, geändert durch Artikel 415 der Verordnung vom 31. Oktober 2006 (*BGBl. I S. 2407*).
- Vidal, E., Tortosa, R., Costa, C., Benavides, J., Francino, O., Sanchez-Robert, E., Perez, V. & Pumarola, M. (2007). Lack of PrP(sc) immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: A case report. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.014.
- Vipond, J. & Greig, A. (2007). Management and care of rams. In *Diseases of sheep*, 4th edn, pp. 61-5. Edited by I. D. Aitken. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Wadsworth, J. D. & Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 598-609.
-

- Walsh, D. T., Perry, V. H. & Minghetti, L. (2000). Cyclooxygenase-2 is highly expressed in microglial-like cells in a murine model of prion disease. *Glia* **29**, 392-6.
- Walsh, D. T., Betmouni, S. & Perry, V. H. (2001). Absence of detectable IL-1beta production in murine prion disease: a model of chronic neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 173-82.
- Wang, L. L., Worley, K., Gannavarapu, A., Chintagumpala, M. M., Levy, M. L. & Plon, S. E. (2002). Intron-size constraint as a mutational mechanism in Rothmund-Thomson syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 165-7.
- Weinsheimer, S., Goddard, K. A., Parrado, A. R., Lu, Q., Sinha, M., Lebedeva, E. R., Ronkainen, A., Niemela, M., Khusnutdinova, E. K., Khusainova, R. I., Helin, K., Jaaskelainen, J. E., Sakovich, V. P., Land, S., Kuivaniemi, H. & Tromp, G. (2007). Association of kallikrein gene polymorphisms with intracranial aneurysms. *Stroke* **38**, 2670-6.
- Weiss, E. & Rudolph, R. (1999). Atmungsorgane. In *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, pp. 70-113. Edited by E. Dahme & E. Weiss. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 861-71.
- Wells, G. A. (2003). Pathogenesis of BSE. *Vet. Res. Commun.* **27 Suppl 1**, 25-8.
- Whiteman, H. J., Weeks, M. E., Dowen, S. E., Barry, S., Timms, J. F., Lemoine, N. R. & Crnogorac-Jurcevic, T. (2007). The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D. *Cancer Res.* **67**, 8633-42.
- Wieringa, B., Hofer, E. & Weissmann, C. (1984). A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit beta-globin intron. *Cell* **37**, 915-25.
- Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. & Schatzl, H. M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* **289**, 1163-78.
- Wu, H. Y., Tomizawa, K. & Matsui, H. (2007). Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med. Okayama* **61**, 123-37.
- Wyss-Coray, T., Feng, L., Masliah, E., Ruppe, M. D., Lee, H. S., Toggas, S. M., Rockenstein, E. M. & Mucke, L. (1995). Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Am. J. Pathol.* **147**, 53-67.
- Xia, C. F., Yin, H., Yao, Y. Y., Borlongan, C. V., Chao, L. & Chao, J. (2006). Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Hum. Gene Ther.* **17**, 206-19.
- Xiang, W., Windl, O., Wunsch, G., Dugas, M., Kohlmann, A., Dierkes, N., Westner, I. M. & Kretzschmar, H. A. (2004). Identification of differentially expressed genes in scrapie-
-

- infected mouse brains by using global gene expression technology. *J. Virol.* **78**, 11051-60.
- Yadavalli, R., Guttman, R. P., Seward, T., Centers, A. P., Williamson, R. A. & Telling, G. C. (2004). Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrP<sup>Sc</sup> modulates scrapie prion propagation. *J. Biol. Chem.* **279**, 21948-56.
- Yull, H. M., Ritchie, D. L., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Bruce, M. E., Ironside, J. W. & Head, M. W. (2006). Detection of type 1 prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* **168**, 151-7.
- Zhang, Y., Spiess, E., Groschup, M. H. & Burkle, A. (2003). Up-regulation of cathepsin B and cathepsin L activities in scrapie-infected mouse Neuro2a cells. *J. Gen. Virol.* **84**, 2279-83.



---

## **DANKSAGUNG:**

Zu allererst danke ich Herrn Prof. Dr. G. Erhardt für die gute Betreuung der Arbeit, die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes und die lehrreiche und schöne Zeit am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik: Ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, nie die Geduld verloren und mir mit viel Spaß und Humor die Zeit am Institut versüßt.

Meine Mädels aus unserem Doktorandenzimmer möchte ich in diesem Zusammenhang besonders hervorheben: Shirin, Du hast mir den Start sehr erleichtert und mir immer weitergeholfen! Michaela, neben allem anderen, was Du für mich getan hast, nochmals vielen Dank für die Durchsicht des Literaturteils und die Fiffi-Beratung! Isabella, Michaela und Shirin, vielen Dank für alles, sowohl für alle Hilfen, die konstruktive Kritik, die vielen Fachsimpelien als auch die schöne Zeit in unserem Zimmer!

An meine ganz persönlichen SLF (Special-Lab-Force) Magarete, Sylvia, Stephi und Carina: Ich werde Euch nie vergessen, dass Ihr mich mit übermenschlicher Geduld in die Laborpraxis eingeführt und mir bei der Typisierung der Kandidatengene und Mikrosatelliten so viel Eurer wertvollen und von allen hart umkämpften Zeit zur Verfügung gestellt habt. Dass ich jetzt schon diese Danksagung schreiben kann und nicht erst am Sankt-Nimmerleins-Tag verdanke ich Euch!!!

Horst danke ich für die umfangreiche und unverzichtbare Unterstützung meines Projektes sowie die außergewöhnliche Geduld, welche er für die statistische Erweiterung meines Horizontes aufgebracht hat. Dank Dir weiss ich heute, dass wenn man drei Kekse isst und vier wieder ausspuckt, man noch einen essen muss, um einen leeren Magen zu haben.

Des Weiteren danke ich Christina für die Durchsicht der Diskussion und die von ihr in diesem Zusammenhang gemachten wertvollen Anregungen, die mir sehr weitergeholfen haben.

Neben Gesine, welche für die Initiierung und Leitung dieses Projektes zuständig war, danke ich der TSE-AG, sowie allen, die sich um die Beschaffung und Aufarbeitung der TSE-Proben verdient gemacht haben. Ein Dankeschön auch an die Kollegen der Veterinärämter und die Schäfer aus den von Scrapie betroffenen Landkreisen für die gute Zusammenarbeit. Frau Dr. A. Buschmann und Herrn Prof. Dr. M. Groschup vom Friedrich-Loeffler-Institut danke ich für die Überlassung des Probenmaterials der positiven Tiere. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt im Rahmen der BMELV-Forschungsprojekte 02HS024 und 04HS059.

Und da wie jeder weiss, das Beste, in diesem Fall das Wichtigste, zum Schluss kommt, danke ich am allermeisten meiner Mutter, die immer für mich da war, mich in allen Bereichen bis

---

aufs Äußerste unterstützt hat und ohne die weder mein Studium noch meine Doktorarbeit in dieser Art und Weise möglich gewesen wäre. Egal, was auch kommt, ich weiss, dass Du immer für mich da sein wirst und ich mich in allen Lebenslagen auf Dich verlassen kann. Mama, Du bist toll und ich hab Dich lieb! :-)

---

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



