

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Prof. Dr. U. Truyen (Uni Leipzig)
Korreferent: Prof.- Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Untersuchung der genetischen Variabilität des porzinen Prionproteingens

Ortrun Lipp

Aus dem Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern e. V., Poing,
der Klinik für Schweine der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
und dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Uwe Truyen

**Untersuchung der genetischen Variabilität
des porzinen Prionproteingens**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ortrun Lipp
aus Mühlacker

München 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1. Prionen	3
2.2. Erregerhypothesen	6
2.2.1. Prionenhypothese	7
2.2.2. Virushypothese	8
2.2.3. Virinohypothese	9
2.2.4. Unified Hypothesis	9
2.3. Prionkrankheiten	10
2.3.1. Prionkrankheiten des Menschen	10
2.3.1.1. Kuru	10
2.3.1.2. Creutzfeld-Jakob-Krankheit	11
2.3.1.3. Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit	12
2.3.1.4. Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	13
2.3.1.5. Letale Familiäre Schlaflosigkeit	14
2.3.2. Prionkrankheiten des Tieres	16
2.3.2.1. Scrapie	16
2.3.2.2. Bovine spongiforme Enzephalopathie	17
2.3.2.3. Prionkrankheiten bei Zootieren	18
2.3.2.4. Übertragbare spongiforme Hirndegeneration der Nerze	19
2.3.2.5. Chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen	19
2.3.2.6. Übertragbare spongiforme Hirndegeneration der Katzen	20
2.4. Bedeutung von Tiermehl in der Rinder- und Schweinefütterung	21

2.5.	Übertragbarkeit der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie	24
2.5.1.	Natürliche Übertragung	24
2.5.2.	Akzidentielle Übertragung	24
2.5.3.	Experimentelle Übertragung	25
2.6.	Infektionsversuche beim Schwein	25
2.6.1.	Parenteraler Übertragungsversuch	26
2.6.2.	Oraler Übertragungsversuch	28
2.6.3.	Untersuchung der Infektiosität verschiedener Gewebe	29
2.7.	Prionproteingen	29
2.7.1.	Allgemeines	29
2.7.2.	Prionproteingen und Genotypisierung beim Schaf	30
2.7.3.	Prionproteingen der Maus	33
2.7.4.	Prionproteingen des Rindes	34
2.7.5.	Prionproteingen des Menschen	35
3.	Material und Methoden	37
3.1.	Auswahl der Schweine	37
3.2.	Untersuchungsmaterial	37
3.3.	Entnahme der Blutproben	37
3.4.	Transport und Lagerung der Blut- und Leberproben	38
3.5.	Lymphozytenisolierung	38
3.6.	Isolierung der DNA	39
3.7.	Polymerase-Ketten-Reaktion	40
3.7.1.	Prinzip	40
3.7.2.	Kontroll-PCR	41
3.7.2.1.	Primer	41
3.7.2.2.	PCR-Reaktion	41
3.7.2.3.	Temperaturprofil der Reaktionszyklen	41
3.7.2.4.	Gelelektrophorese	43
3.7.2.5.	Färben und Dokumentation des Gels	43
3.7.3.	PCR	44
3.8.	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel	44
3.9.	Weitere Behandlung der DNA	45

3.10. Sequenzierung	45
3.11. Sequenzanalyse	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Auswahl der Schweine	47
4.2. Amplifizierung des Prionproteingens durch PCR	49
4.3. Beweis der Einheitlichkeit durch Sequenzanalyse	49
5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	53
7. Summary	55
8. Literaturverzeichnis	57
9. Anhang	71
9.1. Verzeichnis der verwendeten Geräte	71
9.2. Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer	71
9.3. Verzeichnis der verwendeten Materialien	72
9.4. Verzeichnis der verwendeten Programme	72
9.5. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	73

1. Einleitung

Das zeitliche Auftreten der neuen Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, Erregerstammtypisierungen und Ähnlichkeiten im pathologischen Läsionsprofil sprechen dafür, dass die neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit beim Mensch durch den Verzehr von hochtitrigem erregerhaltigem bovines Gewebe, das in Großbritannien in den 80er Jahren in Lebensmittel gelangte, verursacht wurde. Da Schweine in weit höherem Maße als Rinder mit BSE-kontaminiertem Tiermehl gefüttert wurden kam die Frage auf, welche Rolle Schweine im Hinblick auf die alimentäre Übertragung der bovines spongiformen Enzephalopathie (BSE) auf den Mensch spielen.

Ein in Großbritannien durchgeführter Fütterungsversuch mit Schweinen, die Gehirnmaterial BSE-erkrankter Rinder verabreicht bekamen, ergab weder klinische noch histopathologische Hinweise auf eine Übertragung des BSE-Erregers auf Schweine.

Bei Schaf, Maus und Mensch treten im Prionproteingenen verschiedene Variationen auf, die zum Teil mit erhöhter Empfänglichkeit für beziehungsweise einer Resistenz gegen Scrapie bei Schaf und Maus beziehungsweise die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, die Letale Familiäre Schlaflosigkeit und das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom beim Mensch in Verbindung gebracht werden. Aufgrund der bei diesen Arten auftretenden genetischen Variabilität des Prionproteingenen und den damit verbundenen unterschiedlichen Empfänglichkeiten für bestimmte Prionerkrankungen stellt sich die Frage, ob das Ergebnis des o. g. Fütterungsversuchs beim Schwein nur für die Rassen der in diesem Versuch eingesetzten Schweine oder für die gesamte Tierart Schwein zutrifft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) festzustellen, ob bei verschiedenen deutschen Schweinerassen, aber auch dem

Wildschwein und anderen bekannten nicht deutschen Rassen, bezüglich des Prionproteingens unterschiedliche Genotypen existieren.

Damit sollte im Interesse eines umfassenden gesundheitlichen Verbraucherschutzes das Risiko der Übertragung des BSE-Erregers von möglicherweise BSE-infizierten Schweinen auf den Mensch weiter untersucht werden.

2. Schrifttum

2.1. Prionen

Prionen sind Pathogene, die sich sowohl hinsichtlich ihrer Struktur und Eigenschaften, als auch in den Krankheiten, die sie auslösen, von herkömmlichen Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen unterscheiden (Prusiner, 1991)

In den folgenden Abschnitten sollen Eigenschaften, Struktur, Vermehrung, Lokalisation und Funktion von Prionen erläutert werden.

Der Begriff „Prion“ wurde 1982 von Stanley B. Prusiner geprägt. (Prusiner, 1982). Ihm gelang es, aus dem Gehirn experimentell mit Scrapie infizierter Hamster infektiöses Material zu isolieren und genauer zu untersuchen. Dabei stellte er fest, dass das Scrapie-Agens eine außergewöhnliche Resistenz gegenüber nukleinsäureschädigenden Substanzen und Einflüssen, wie Nukleasen, Hydroxylamin, Zn^{2+} -Ionen, UV- oder ionisierende Strahlung und Hitze, besitzt (Prusiner, 1982, 1991), nach Behandlung mit proteindenaturierenden Substanzen wie Diethylpyrocarbonat, SDS (Sodiumdodecylsulfat), Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Harnstoff seine Infektiosität jedoch einbüßt (Prusiner, 1982). Daraus schloss Prusiner, dass der Scrapie-Erreger hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, aus Protein besteht (Prusiner 1982). Diesen neuen Erregertyp nannte er „Prion“ als Abkürzung für „**proteinaceous infectious particle**“. Die genaue Abkürzung „Proin“ wurde zugunsten der einfacheren Sprechweise in „Prion“ geändert (Prusiner, 2001).

Bei der Suche nach der Herkunft des Prions entdeckten Prusiner und seine Mitarbeiter das Prionprotein, welches die meiste Zeit aktiv ist. Das bedeutet, dass das Prionprotein (PrP) als Genprodukt des Wirtes in jedem Organismus vorkommt, ohne dass dieser erkrankt (Prusiner, 2001).

Aus dieser Erkenntnis entstand die Überlegung, ob das Scrapie-Agens vielleicht eine veränderte Form des normal auftretenden Prions sein könnte. Mitarbeiter Prusiners fanden schließlich auch einen deutlichen Unterschied zwischen dem normalen PrP und dem PrP aus Scrapie-infizierten Gehirnen: letzteres ist sehr resistent gegenüber Proteinasen, während diese Eigenschaft beim normalen PrP nicht existiert. Daraus leitete Prusiner ab, dass das Scrapie-verursachende PrP eine veränderte Form des normalen PrP ist (Prusiner, 1982).

Um diese beiden Formen unterschiedlich zu benennen, wurde für das normale PrP die Abkürzung PrP^C (c = cellular) und für die veränderte Form die Abkürzung PrP^{Sc} (Sc = Scrapie) eingeführt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc} liegt also in ihrer Konformation. Sie weisen zwar beide keinerlei Differenzen in ihrer Aminosäuresequenz auf, jedoch bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur (Prusiner, 1998; Dormont, 2002). In PrP^C ist die Aminosäurekette hauptsächlich zu α -Helices aufgewunden. PrP^{Sc} enthält mehr zu β -Faltblättern gestreckte Bereiche und besteht nur zu ca. 30% aus α -Helices (s. Abb. 1) (Pan et al., 1993).

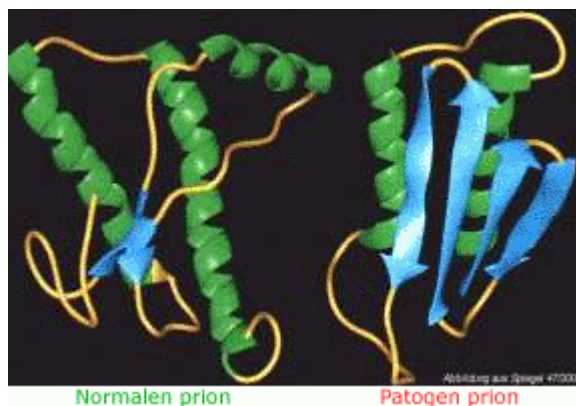


Abb.1: Konformationsänderung vom normalen PrP^C zum krankhaften PrP^{Sc}.

Links das physiologisch vorkommende PrP^C mit größerem Anteil an α -Helices (grün dargestellt); rechts das krankhafte PrP^{Sc} mit mehr zu β -Faltblättern gestreckte Bereichen (blau dargestellt)

(www.arzt-und-gesundheit.de)

Durch die veränderte dreidimensionale Struktur des PrP^{Sc} ist hier die Molekülmasse von 33-35 kD auf 27-30 kD reduziert. Mit der veränderten Konformation ist auch die extreme Stabilität gegen Hitze, Säuren, Proteasen und Strahlen zu erklären (Dahme und Schmahl, 1999).

Da in infektiösem Hirnmaterial bisher keine Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte, die für die Vermehrung von Prionen verantwortlich sein könnte (Prusiner, 1982), mussten für die Biosynthese von Prionen andere Mechanismen in Erwägung gezogen werden (Prusiner, 1991). Aufgrund der Konformationsunterschiede zwischen PrP^C und PrP^{Sc} (Prusiner, 1998; Dormont, 2002) schloss Prusiner, dass das PrP^{Sc} durch Umfaltung von PrP^C entsteht. Er postulierte, dass ein PrP^{Sc}-Molekül ein PrP^C-Molekül veranlasst, sich in PrP^{Sc} umzufalten. Diese beiden PrP^{Sc}-Moleküle zwingen dann zwei weiteren PrP^C-Molekülen die PrP^{Sc}-Konformation auf, die ihrerseits weitere PrP^C-Moleküle umfalten. Dies bedeutet, dass durch Umfaltung neu entstandene PrP^{Sc}-Moleküle gleichzeitig die Umwandlung von weiteren PrP^C-Molekülen induzieren. Dadurch kommt ein katalytischer Prozess in Gang, durch den PrP^{Sc} exponentiell repliziert wird (Prusiner, 1991)

Das gebildete PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C extrem stabil und kann nicht abgebaut werden. Durch die Anhäufung von PrP^{Sc} kommt es zur Bildung amyloider Plaques und letztendlich zur Schädigung und zum Untergang der Nervenzellen (Möstl und Möstl, 1998).

PrP^C ist ein Glykoprotein, welches besonders stark in neuronalem Gewebe, aber auch in anderen Organen wie Lunge, Milz und Muskulatur synthetisiert wird (Lehmann et al., 1999). Laut Dahme ist es nicht Bestandteil der Zelloberflächen von Pankreas und Leber (Dahme und Schmahl, 1999). Es ist an der Oberfläche von Neuronen durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) verankert (Büeler et al., 1992; Lehmann et al., 1999; Dormont, 2002), in geringerem Maß ist es auch auf Lymphozyten und anderen Zellen zu finden (Büeler et al., 1992). Im Gegensatz dazu akkumuliert PrP^{Sc} intrazellulär, wo es sich in zytoplasmatischen Vesikeln ablagert (Prusiner, 1991).

Um die Funktion des PrP^C zu erforschen, wurden Prion-Protein-Knock-out-Mäuse (PrnP^{0/0}-Mäuse) gezüchtet und deren Entwicklung und Verhaltensweisen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich PrnP^{0/0}-Mäuse bis zum Alter von mindestens sieben Monaten normal entwickeln und verhalten (Büeler et al., 1992). Allerdings

fürte Collinge elektrophysiologische Untersuchungen an PrnP^{0/0}-Mäusen durch und stellte verschiedene Auffälligkeiten fest (Collinge et al., 1994), die Brown mit der verminderten Kupferkonzentration in den synaptischen Membranen der PrnP^{0/0}-Maus in Zusammenhang brachte (Brown et al., 1997). PrnP^{0/0}-Mäuse zeigen neben dieser Verminderung auch eine reduzierte Aktivität eines kupferabhängigen Enzyms, der Superoxiddismutase (SOD) (Brown et al., 1997). Eine weitere Forschungsgruppe stellte bei PrnP^{0/0}-Mäusen einen gestörten circadianen Rhythmus fest (Tobler et al., 1996). Dieser kann ebenfalls mit der bereits erwähnten verminderten Kupferkonzentration erklärt werden: an der Synthese des für den circadianen Rhythmus bedeutenden Hormons Melatonin ist die Monaminoxidase, ein ebenfalls kupferabhängiges Enzym beteiligt (McArthur et al., 1991).

Brown konnte zeigen, dass der N-Terminus des PrP^C eine Oktapeptidsequenz aufweist, die in der Lage ist Kupfer zu binden (Brown et al., 1997).

Dies und die bei PrnP^{0/0}-Mäusen auftretenden Veränderungen führten zu der Schlussfolgerung, dass PrP^C ein kupferbindendes Protein an der Synapse ist oder dass es die Aktivität anderer kupferbindender Proteine beeinflusst (Brown et al., 1997). Eine Hypothese zu Funktion der Kupferbindung durch PrP^C im synaptischen Spalt besagt, dass Kupfer, welches bei der synaptischen Vesikelverschmelzung frei wird, von PrP^C gebunden wird. PrP^C und Kupfer werden anschließend durch Endozytose in die Präsynapse aufgenommen. Dort wird das Kupfer von PrP^C abgespalten. So wird durch das PrP^C gewährleistet, dass die Kupferkonzentration im synaptischen Spalt und in der Präsynapse konstant bleibt (Herms, 2001).

2.2. Erregerhypothesen

Sowohl die außergewöhnliche Resistenz des Erregers gegenüber inaktivierenden Substanzen als auch die nicht vorhandene Immunantwort führten zu kontroversen Diskussionen und Hypothesen bezüglich der Natur des Erregers, die die bisherigen Erkenntnisse auf unterschiedliche Art und Weise interpretieren und erklären.

2.2.1. Prionhypothese

1982 postulierte Prusiner die Prion - oder Nur-Eiweiß-Hypothese (protein only hypothesis) und führte den Begriff „Prion“ (proteinaceous infectious particle) ein (Prusiner, 1982). Diese These besagt, dass der Erreger hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich aus Protein, und zwar dem Prionprotein, besteht. Prusiner und Mitarbeiter stellten fest, dass das Prionprotein ein Genprodukt des Wirtes ist, also auch im gesunden Organismus vorkommt, ohne dass eine Erkrankung vorliegt (Prusiner, 2001). Folglich wird zwischen zwei Formen des Prionproteins unterschieden: dem normalen zellulären Prionproten (PrP^{C}) auf der einen Seite und der veränderten Form, dem PrP^{Sc} , auf der anderen Seite. Laut dieser Hypothese soll nach Anlagerung von PrP^{Sc} an das physiologische PrP^{C} dieses in die veränderte Form PrP^{Sc} überführt werden (Prusiner, 1991). Diese Umfaltung von PrP^{C} in PrP^{Sc} soll mit Hilfe eines Katalysators, der als Protein X bezeichnet wird, ablaufen (Telling et al., 1995; Kaneko et al., 1997).

Die verschiedenen Scrapie-Erregerstämme, die stets als Gegenargument zur Prionhypothese aufgeführt werden, und die sich in der Inkubationszeit, dem Krankheitsverlauf und dem neuropathologischen Veränderungen, die sie bei erkrankten Tieren hervorrufen, unterscheiden, erklären sich die Vertreter dieser Hypothese mit strukturellen Variationen der PrP^{Sc} – Moleküle (DeArmond et al., 1993; Telling et al., 1996; Safar et al., 1998).

Die bei Erkrankten nicht nachweisbare oder fehlende Immunantwort wird dadurch begründet, dass zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} keine Unterschiede bezüglich der Aminosäuresequenz vorliegen. Da PrP^{C} ein wirtseigenes Protein ist, gegen das keine Antikörper gebildet werden, kommt es nach einer Infektion mit PrP^{Sc} das sich wie bereits erwähnt nur in der Sekundärstruktur, nicht jedoch in der Primärstruktur von PrP^{Sc} unterscheidet, nicht zu einer Immunantwort mit Ausbildung von Antikörpern (Möstl und Möstl, 1998).

Für diese Hypothese sprechen hauptsächlich die Resistenz des Erregers gegenüber Nukleasen bei gleichzeitiger Sensitivität gegenüber Proteinasen (Prusiner, 1982, 1991), die Korrelation zwischen der Infektiosität und dem Vorhandensein des PrP^{Sc} (Beekes et al., 1996) sowie der bisher nicht gelungene Nachweis einer spezifischen Nukleinsäure. Auch die Erkenntnisse Büelers, dass $\text{PrP}^{0/0}$ – Mäuse nach

Inokulation des Scrapie-Agens nicht an Scrapie erkranken, sprechen für die Prionhypothese (Büeler et al., 1993).

2.2.2. Virushypothese

Befürworter dieser Hypothese betrachten Scrapie als virusinduzierte Amyloidose (Braig und Diringer, 1985; Diringer und Özel, 1995). Sie machen ein bisher nicht identifiziertes konventionelles Virus als Erreger verantwortlich, für welches das Prionprotein an der Oberfläche von Nervenzellen als Rezeptor fungiert. Diese Interaktion zwischen Rezeptor und Virus bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, also des Prionproteins, wodurch dieses zur Aggregation veranlasst wird. Dadurch entstehen die amyloiden Fibrillen, die den Untergang der Nervenzellen zur Folge haben (Diringer und Özel, 1995).

Für die Anhänger der Virushypothese sprechen die verschiedenen Scrapie-Stämme gegen die Prionhypothese (Möstl und Möstl, 1998). Sie vertreten die Ansicht, dass Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) als Träger der Erbinformation notwendig ist, insbesondere um das Vorkommen dieser Erregerstämme zu erklären (Riesner, 2001). In der Tat war bisher keine auf Infektiosität angereicherte Probe frei von Nukleinsäure (Diringer und Özel, 1995, Diringer et al, 1997, Aiken und Marsh, 1990; Akowitz et al., 1990; Meyer et al., 1991; Kellings et al., 1992; Manuelidis et al., 1995).

Lasmézas und Mitarbeiter führen als Gegenargument zur Prionhypothese zusätzlich noch an, dass bei einem Übertragungsversuch von BSE auf Mäuse zwar alle Tiere Krankheitssymptome entwickelten, aber bei mehr als 55% dieser Mäuse kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte (Lasmézas et al., 1997). Aus der Erkenntnis, dass Mäuse ohne das Vorhandensein von PrP^{Sc} trotzdem erkranken, schlossen Lasmézas und Mitarbeiter, dass das PrP^{Sc} alleine nicht das infektiöse Agens darstellen kann. Sie gehen davon aus, dass neben dem PrP^{Sc} ein zusätzliches Agens, ihrer Meinung nach ein Virus, existiert, was für die Entstehung der Krankheit verantwortlich ist. Die bisherigen Erkenntnisse schließen das Vorhandensein eines Virus als Erreger der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien nicht aus. Jedoch konnte bislang keine spezifische Nukleinsäure nachgewiesen werden (Möstl und Möstl, 1998, Riesner, 2001).

Der fehlende Nachweis einer erregerspezifischen Nukleinsäure wird von den Anhängern der Virushypothese auf eine besonders effektive Verpackung (Riesner, 2001) der Nukleinsäure zurückgeführt. Diese Verpackung soll auch für die außergewöhnliche Resistenz gegen chemische und physikalische Einflüsse verantwortlich sein (Riesner, 2001).

2.2.3. Virinohypothese

Diese Hypothese unterstützt die Theorie, dass das Scrapie-Agens, ein Virino, aus einer kleinen wirtsfremden Nukleinsäure besteht, die von wirtseigenem Protein umhüllt ist. Bei den Virinos soll also das vom Wirt festgelegte Prionprotein als Hülle dienen, während Viren ihre Hülle genetisch selbst bestimmen (Diringer und Özel, 1995). Diese Hülle verleiht der Nukleinsäure Schutz vor inaktivierenden Einflüssen (Aiken und Marsh, 1990). Die Virino-Nukleinsäure konnte bisher jedoch experimentell nicht nachgewiesen werden, was die Befürworter dieser Hypothese mit der geringen Größe und der festen Verpackung begründen (Riesner, 2001).

Mit dieser Hypothese wäre die ausbleibende Immunantwort des infizierten Wirtes zu erklären, da das die Nukleinsäure umhüllende Protein wirtseigen ist und so vom Immunsystem nicht als fremd erkannt wird.

2.2.4. Unified Hypothesis

Diese Hypothese wurde 1991 von Charles Weissmann vorgeschlagen (Weissmann, 1991). Er kombiniert die Prionhypothese mit der Virinohypothese in dem er sagt, dass sich das infektiöse Agens aus zwei Komponenten zusammensetzt: dem PrP^{Sc} das er Apoprion nennt, und der Nukleinsäure, die er als Coprion bezeichnet. Das Apoprion stellt seiner Meinung nach das pathogene Element dar, welches die Krankheit hervorruft, während die Nukleinsäure als Coprion die biochemischen Eigenschaften des PrP^{Sc} moduliert und dadurch die stamm-spezifischen Eigenschaften des Erregers bestimmt. Weissmann vermutet, dass die Nukleinsäure mit dem PrP^{Sc} assoziiert ist oder aber eine zelluläre Nukleinsäure durch das PrP^{Sc} rekrutiert wird.

2.3. Prionkrankheiten

Erkrankungen, die durch Prionen ausgelöst werden, kommen sowohl beim Tier als auch beim Mensch vor. Es handelt sich dabei um subakute, degenerative und stets tödlich verlaufende Erkrankungen des Zentralnervensystems mit z.T. extrem langen Inkubationszeiten. In den folgenden Abschnitten sollen die Erkrankungen, die durch Prionen ausgelöst werden, kurz beschrieben werden.

2.3.1. Prionkrankheiten des Menschen

2.3.1.1. Kuru

Kuru trat ausschließlich im östlichen Hochland Papua-Neuguineas beim Volkstamm der Fore auf (Gajdusek und Zigas, 1957). Ausgelöst wurde diese Krankheit durch den bei den Fore üblichen Endokannibalismus verstorbener Familienmitglieder und den damit verbundenen Vorbereitungen der rituellen Mahlzeiten (Gajdusek, 1977). Bekannt wurde Kuru erst 1956 durch V. Zigas (Hörnlimann, 2001b), jedoch ließ sich das erstmalige Auftreten dieser Krankheit aufgrund Befragungen älterer Stammesmitglieder auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurückdatieren (Gajdusek und Zigas, 1957).

Erkrankte zeigten progredient entwickelnde Bewegungsstörungen (Gajdusek und Zigas, 1957) und mussten aufgrund ihrer Stand- und Gangunsicherheit gestützt werden (Kompolti et al., 1999). Im späteren Stadium waren schwerste Koordinationsstörungen (Hörnlimann, 2001b) und Tremor des gesamten Körpers (Gajdusek und Zigas, 1957) zu erkennen. Letzterer war namensgebend für diese Erkrankung. Kuru bedeutet in der Sprache der Fore „schüttelfrostartiges Zittern“ (Gajdusek, 1977). Ein weiteres sehr charakteristisches Symptom bei Kuru ist das ständige Lachen und die ausgeprägte Euphorie der Patienten. Dies führte zu der Bezeichnung „laughing death“ (Stöcklin, 1967). Die klinische Phase dauert durchschnittlich 1 Jahr und endet stets tödlich (Gajdusek und Zigas, 1957).

Bei dieser Erkrankung sind pathologische Veränderungen in Form von Vakuolenbildung und Ablagerung amyloider Plaques vorwiegend im Bereich des Kleinhirns zu finden (Hörnlimann, 2001b).

Nach Bekanntwerden des Zusammenhangs zwischen endokannibalischen Praktiken und dem Auftreten der Kuru, wurde der Endokannibalismus Ende der 50er Jahre eingestellt. Keines der Stammesmitglieder der Fore, die nach 1960 geboren wurden, erkrankte an Kuru (Gajdusek, 1977).

2.3.1.2. Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD)

Die Creutzfeld-Jakob-Krankheit wurde erstmals in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts von H. G. Creutzfeld und A. M. Jakob beschrieben (Creutzfeld, 1920; Jakob, 1921).

Diese Erkrankung ist beim Menschen die häufigste Prionkrankheit (Sturzenegger, 2001) mit einer Prävalenz von rund 1 Fall pro 1 Mio Einwohner (Tyler, 2003). Die CJD kommt weltweit in vielen Ländern vor (Zerr, und Poser, 2001) und tritt in drei verschiedenen Formen auf (Budka, 2001):

i. *sporadische Form (sCJD)*

80–90 % aller CJD-Fälle treten sporadisch auf. Ursächlich wird eine somatische Mutation des Prionproteingens (PRNP) oder eine spontane Konfigurationsänderung des Prionproteins (PrP) diskutiert, die zur Umfaltung des PrP^C zu PrP^{Sc} führt.

ii. *familiäre Form (fCJD)*

Ca. 10% der CJD-Fälle gehören zu dieser Form. Sie wird autosomal-dominant vererbt und tritt in Familien mit unterschiedlichen Mutationen des Prionproteingens auf.

iii. *iatrogene Form (iCJD)*

Diese akzidentiell verursachte CJD-Form tritt am seltensten auf. Sie ist auf therapeutische Verabreichung erregerhaltiger Wachstums- und Geschlechtshormonpräparate (Gonadotropin), sowie auf die Transplantation von Dura mater- oder Cornea-Transplantaten zurückzuführen. Einige Fälle der iCJD wurden durch Operationsinstrumentarium bei neurologischen Eingriffen oder durch Tiefenelektroden zur intrazerebralen

Elektroenzephalogrammableitung, denen CJD-Erreger anhafteten, ausgelöst (Budka, 1998)

Bisher sind ca. 180 Fälle der iatrogenen CJD bekannt geworden. (Budka, 1998).

Schnell fortschreitende Demenz in Verbindung mit verschiedenen neurologischen Störungen, wie z.B. Myoklonien, Hyperreflexie, Ataxie und Spastik ist charakteristisch für die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (Budka, 2001).

Die pathologischen Läsionen setzen sich zusammen aus Nervenzellverlust, spongiformen Veränderung und Astrozytose (Tyler, 2003).

2.3.1.3. Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit

Seit Mitte der 90er Jahre ist eine neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD) bekannt. Bei dieser Form der CJD ist das Alter der betroffenen Patienten besonders auffallend. Während das Erkrankungsalter von Patienten mit sCJD bei ungefähr 60 Jahren liegt, beträgt dieses bei der neuen Variante der CJD durchschnittlich 30 Jahre. Auch bezüglich der Symptomatik unterscheidet sich die vCJD deutlich von der sCJD. Stehen bei der sCJD Demenz und Myoklonien im Vordergrund, so sind die Hauptsymptome der vCJD neben Verhaltensstörungen und psychiatrischen Auffälligkeiten, wie Depressionen und Halluzinationen, auch Parästhesien und eine bereits in einem relativ frühen Krankheitsstadium auftretende Ataxie. Die progressive Demenz, die die sCJD auszeichnet, tritt erst im späteren Verlauf der Krankheit auf. Auch das Muster der elektroenzephalographischen Untersuchung von vCJD-Patienten zeigt Unterschiede zu dem von sCJD-Patienten und kann sogar unauffällig sein (Will et al., 1996, Will, 2001). Das mittlere Sterbealter liegt bei der vCJD ungefähr bei 30 Jahren, gegenüber 66 Jahren bei der sCJD (Will, 2001; Zerr und Poser, 2002).

Bei der neuropathologischen Untersuchung zeigen sich neben den für Prionerkrankungen charakteristischen Veränderungen, wie spongiforme Veränderungen, Nervenzellverlust und Astrozytose, sogenannte amyloide Plaques, die in der Groß- und Kleinhirnrinde zu finden sind (Will et al., 1996).

Aufgrund des regionalen und zeitlichen Auftretens dieser neuen Variante der CJD wurde ein kausaler Zusammenhang mit der bovinen spongiformen Enzephalopathie vermutet (Will et al., 1996). Bisher (Stand 1.10.2003) sind in Großbritannien 140 Fälle der vCJD aufgetreten. Außerhalb Großbritanniens wurden weit weniger Erkrankungsfälle nachgewiesen: sechs in Frankreich, jeweils ein Fall in Italien, China (Hongkong) und Irland und weiterhin jeweils ein Fall in den USA und Kanada. Die beiden letztgenannten Fälle betrafen Patienten, die mehrere Jahre in Großbritannien gelebt und sich höchstwahrscheinlich dort infiziert haben. In Italien, Spanien, Tschechien, Neuseeland und der französischen Karibik gibt es zudem noch Verdachtsfälle der neuen Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, für die die endgültige Diagnose noch aussteht (<http://www.promedmail.org/pls/askus>). Der Verdacht, dass zwischen der vCJD und der BSE ein Zusammenhang besteht, ließ sich anhand von Untersuchungen mit Mäusen erhärten. Bruce et al. inokulierten Hirngewebehomogenate von BSE-Rindern und vCJD-Patienten in Mäuse und stellten fest, dass die Übertragungscharakteristika der vCJD nicht von denen der BSE zu unterscheiden waren (Bruce et al., 1997). Sowohl die Symptome, die die Mäuse entwickelten, als auch der Krankheitsverlauf und die neurologischen Befunde zeigten weitgehende Übereinstimmung. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass das Agens, welches die vCJD verursacht, identisch mit dem BSE-Agens ist, und dass vCJD auf die Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie auf den Menschen zurückgeführt wird (Hill et al., 1997).

2.3.1.4. Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)

Das GSS ist eine autosomal-dominant vererbte Prionerkrankung, die äußerst selten auftritt (Yamamoto et al., 1997). Weltweit sind ca. 48 betroffenen Familien bekannt (Prusiner, 2001).

Die Ursache liegt in einer Reihe von Mutationen des Prionproteingens. Die weltweit am häufigsten auftretende Mutation führt zu einer Substitution von Leucin für Prolin am Codon 102 (Hsiao und Prusiner, 1990). Andere GSS-assoziierte Mutationen betreffen die Codons 105, 117, 198 und 217 (Budka, 2001).

Aufgrund der beträchtlichen klinischen Heterogenität lassen sich zwei Erscheinungsformen unterscheiden (Hsiao und Prusiner, 1990):

- i. Die ataktische Form ist zunächst durch Verlust der Bewegungskoordination geprägt, später folgen dann Vergesslichkeit und schwerste Demenz.
- ii. Der dementielle Typ zeigt einen rascheren Verlauf und ist der CJD ähnlich. Hierbei steht ausgeprägte Geistesschwäche im Vordergrund.

Nach einer Krankheitsdauer von durchschnittlich fünf Jahren tritt der Tod ein (Hsiao und Prusiner, 1990).

Pathologische Veränderungen in Form von spongiformen Veränderungen und Amyloidplaques sind entsprechend dem klinischen Phänotyp in der Klein- bzw. der Großhirnrinde zu finden (Budka, 2001).

2.3.1.5. Letale familiäre Schlaflosigkeit

(fatal familial insomnia (FFI))

Die letale familiäre Schlaflosigkeit ist wie das GSS und fCJD eine autosomal-dominant vererbte Krankheit (Budka, 2001). Sie wurde 1986 erstmals in Italien beschrieben (Lugaresi, 1986). Es handelt sich hierbei um eine neurodegenerative Erkrankung, deren charakteristisches Merkmal unbeeinflussbare Schlafstörungen sind. Weiterhin treten neben vegetativen, motorischen und kognitiven Störungen auch Verhaltensstörungen auf (Lugaresi et al., 1986).

FFI tritt bei Patienten mit einer Mutation von Aspartat zu Asparagin am Codon 178 (D178N) in Kombination mit Methionin am Codon 129 des Prionproteingens auf (Goldfarb et al., 1992; Medori et al., 1992b; Monari et al., 1994).

Sowohl die Verlaufsform als auch die Krankheitsdauer sind davon abhängig, ob die o.g. Mutation am Codon 178 in Verbindung mit einer Methionin-Homozygotie oder einer Methionin-Valin-Heterozygotie auf Codon 129 auftritt. Bei homozygoten Patienten verläuft die Krankheit schneller als bei heterozygoten Patienten und ist durch eine deutlichere Ausprägung der Schlafstörungen gekennzeichnet (Montagna et al., 1998; Parchi et al., 1998).

Die histopathologischen Befunde der bisher untersuchten FFI-Fälle zeigten Nervenzellverlust und eine Astrozytose (Lugaresi et al., 1986). Auffallend bei der FFI ist, dass in untersuchtem Hirnmaterial kein oder nur sehr wenig PrP^{Sc} nachweisbar ist (Budka et al., 1997).

Tabelle 1: Prionkrankheiten des Menschen (Kretzschmar, 2001)

Ursprung	Form
Idiopathisch	- Sporadische CJD (sCJD)
Erworben	- Iatrogene CJD (iCJD) - Neue Variante der CJD (vCJD) - Kuru
Hereditär	- Familiäre CJD (fCJD) - Gerstmann-Sträussler-Scheinker - Syndrom (GSS) - Letale familiäre Insomnie (FFI)

2.3.2. Prionkrankheiten des Tieres

2.3.2.1. Scrapie

Scrapie ist eine seit dem 18. Jahrhundert bekannte Krankheit bei kleinen Wiederkäuern. Sie tritt hauptsächlich beim Schaf auf, kommt jedoch ebenfalls, wenn auch seltener, bei Ziegen vor (Dalsgaard, 2002). Die Symptome variieren in ihrer Ausprägung und sind relativ vielfältig. Durch Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS), wie Astrozytose, Nervenzellverlust und Vakuolenbildung in der grauen Substanz (Hadlow, 1961), kommt es bei Scrapie-infizierten Tieren zunächst zu Verhaltensänderungen. Die Tiere sondern sich von der Herde ab, sind nervös, aggressiv und reagieren ängstlich und schreckhaft auf laute Geräusche, Bewegungen oder Lichtreize. Im Verlauf der Erkrankung zeigen die Tiere progrediente Bewegungsstörungen, liegen schließlich fest (Detwiler, 2001) und verenden. Betroffene Tiere scheuern und kratzen sich infolge von Juckreiz. Dies führt zu Scheuerwunden und Wollschäden. Von diesem Krankheitssymptom leitet sich der Name „Scrapie“ ab (Detwiler, 2001). Das englische Wort „to scrape“ bedeutet „sich kratzen / scheuern“.

Ein anderes Synonym für Scrapie ist *Traberkrankheit*. Dieser Begriff rührt von der Inkoordination des Ganges betroffener Tiere her (Kaaden, 2002).

Die Übertragung des Erregers erfolgt i.d.R. vertikal vom infizierten Muttertier auf das Lamm. Neben der intrauterinen Infektion spielt dabei auch die extrauterine Übertragung durch engen Kontakt während oder nach der Geburt eine Rolle. Die Krankheit kann aber ebenfalls horizontal übertragen werden, wobei Nachgeburt, Fruchthüllen und -wasser infizierter Schafe und kontaminiertes Weideland als Infektionsquelle angesehen werden (Brotherston et al., 1968; Pattison et al., 1972). Es existieren unterschiedliche Scrapie-Erregerstämme, die sich in der Inkubationszeit, den Krankheitssymptomen, dem Krankheitsverlauf, dem pathologischen Läsionsprofil, ihrem Inaktivierungsverhalten und in den biochemischen Eigenschaften des PrP^{Sc} unterscheiden (Groschup und Kuczius, 2001) und die stets als Gegenargument zur Prionhypothese Prusiners aufgeführt werden (Möstl und Möstl, 1998).

Scrapie ist weltweit in allen Ländern verbreitet, in denen Schafzucht betrieben wird (Detwiler, 2001). Eine Ausnahme stellen Australien und Neuseeland dar. Diese

beiden Länder sind aufgrund strenger Importvorschriften und Quarantänemaßnahmen frei von Scrapie (MacDiarmid, 1996).

2.3.2.2. Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)

1985 trat der erste BSE-Fall in England auf. Über ganz England verbreitet wurden damals gehäuft Rinder mit zentralnervösen Störungen beobachtet. Diese zeichneten sich durch ängstliches und aggressives Verhalten, extreme Schreckhaftigkeit und Störungen der Bewegungskoordination wie Hypermetrie, Ataxie und plötzliches Niederfallen aus (Wells et al., 1987). Wells untersuchte die Gehirne einiger betroffener Rinder und stellte in histologischen Schnitten von Gehirnmateriale dieser Tiere eine Vakuolenbildung in der grauen Substanz fest. Diese schwammartige Veränderung wurde „bovine spongiforme Enzephalopathie“, kurz BSE, genannt (Wells et al., 1987).

Seit der Diagnose des ersten BSE-Falles wurden bis Ende des Jahres 2002 183 191 BSE-Fälle in Großbritannien festgestellt (http://www.oie.int/eng/info/en_esbru.htm). 1988 trat BSE zum ersten Mal in Nordirland auf (Denny et al., 1992), 1990 wurde der erste BSE-Fall in der Schweiz bekannt (Hörnlimann et al., 1994). Inzwischen ist BSE auch in anderen Ländern aufgetreten. 2003 wurde erstmals BSE bei einer Kuh in Kanada festgestellt (<http://www.heute.t-online.de/ZDFheute/artikel/28/0,1367,MAG-0-2047100,00.html>).

Da sowohl die Krankheitssymptome als auch die pathologischen Veränderungen in der grauen Substanz den Auffälligkeiten bei Scrapie-infizierten Schafen sehr ähneln, wurde vermutet, dass Schafe Rinder mit Scrapie infiziert haben könnten. Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Übertragung nicht direkt vom Schaf auf das Rind, sondern indirekt über Tiermehl oder andere Produkte aus Rindern, welche auch Gewebe Scrapie-infizierter Schafe enthielt, erfolgte (Wilesmith et al., 1988, Wilesmith et al., 1991). Die Tiermehlproduktion wurde zwischen Anfang der 70er Jahre und Mitte der 80er Jahre von einem diskontinuierlichen („batch“) auf ein kontinuierliches Verfahren umgestellt. Im Rahmen dieser Umstellung wurde auch Fettextraktionsschritt aufgegeben (Hörnlimann, 2001a). Dies führte zur reduzierten oder fehlenden Inaktivierung von Scrapie-Erregern (Wilesmith et al., 1991), wodurch diese letztlich auf das Rind übertragen werden konnten.

BSE wurde vor allem durch Exporte von mit Scrapie-Erregern kontaminiertem Tiermehl in andere Länder verschleppt (Hörnlimann et al., 1994). Auf die Tiermehlproblematik wird in Kapitel 2.4. genauer eingegangen.

2.3.2.3. Prionkrankheit bei Zootieren

Seit 1986 wurde eine Scrapie-ähnliche spongiforme Enzephalopathie bei 19 Zootieren diagnostiziert. Diese 19 Tiere wurden ausschließlich in Zoos in Großbritannien gehalten oder von dort in andere Zoos verbracht (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Die betroffenen Tiere gehörten den Familien der Bovidae und Felidae an. Darunter waren ein Nyala (*Tragelaphus angasi*), vier Elenantilopen (*Taurotragus oryx*), sechs große Kudus (*Tragelaphus strepsiceros*), ein südafrikanischer (*Oryx gazella*) und ein arabischer Spießbock (*Oryx leucoryx*) und eine Säbelantilope (*Oryx dammah*). Zu den betroffenen Vertretern der Felidae gehörten vier Geparde (*Acinonyx jubatus*) und ein Puma (*Felis concolor*) (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Die Symptome waren recht vielfältig. Sie umfassten u.a. Absondern von der Herde, Ataxie, Muskelzittern, z.T. kollapsartiges Zusammenbrechen, abnorme Kopfhaltung und Gliedmaßenstellung (gekreuzte Vordergliedmaßen), auffallende Knabberbewegungen der Lippen, Hyperästhesie und Auszehrung. Diese Symptome traten bei den betroffenen Tieren in unterschiedlichen Konstellationen auf (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Histopathologische Veränderungen des ZNS waren Vakuolisierung, Nervenzellverlust und Astrozytose (Wells und McGill, 1992). Aufgrund der Ähnlichkeit der pathologischen Veränderungen dieser Tiere mit denen BSE-erkrankter Rinder geht man davon aus, dass sich diese 19 Zootiere mit BSE infiziert haben. Dafür spricht auch, dass alle betroffenen Tiere mit wiederkäuerproteinreichem Futter bzw. direkt mit Rindfleisch, welches noch mit Knochen versehen war, gefüttert wurden. Auf diese Weise konnten die Zootiere mit dem BSE-Erreger oral in Kontakt kommen. Erhärtet wird die These dass es sich bei den Erkrankungen der Zootiere um BSE handelt durch das Ergebnis von Inokulationsversuchen mit Mäusen. Das pathologische Läsionsprofil in den Gehirnen von Mäusen, in die Gehirnhomogenisat des Nyala und eines Großen Kudus inokuliert wurde, war dasselbe wie bei BSE-inokulierten Mäusen (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Weiterhin wurden 1986, 1988 und 1989 in zwei norddeutschen Zoos drei Fälle von spongiformer Enzephalopathie bei Straussen (*Struthio camelus*) diagnostiziert, die 1991 von Schoon und Mitarbeitern beschrieben wurden (Schoon et al., 1991). Die Tiere zeigten zentralnervöse Störungen wie Ataxie, Gleichgewichtsstörungen und gestörte Futteraufnahme. Das Futter dieser Vögel beinhaltete Geflügelmischfutter und Fleisch, welches z.T. von notgeschlachteten Rindern stammte (Schoon et al., 1991). Die Autoren stellten fest, dass das Muster der pathologischen Veränderungen dasselbe war wie bei transmissiblen Enzephalopathien anderer Säugetiere. Jedoch konnte die definitive Diagnose einer aviären spongiformen Enzephalopathie nicht gesichert werden. (Schoon et al., 1991).

2.3.2.4. Übertragbare spongiforme Hirndegeneration der Nerze (transmissible mink encephalopathy, TME)

Bei der transmissiblen Enzephalopathie der Nerze handelt es sich um eine seltene Krankheit bei Zuchtnerzen, die durch ein im Futter enthaltenes TSE-Agens ausgelöst wird (Marsh und Bessen, 1993).

Der erste Fall trat 1947 in Brown County, Wisconsin auf. Weitere Ausbrüche der Erkrankung wurden 1961 und 1963 ebenfalls in Wisconsin und in Idaho beobachtet (Hartsough und Burger, 1965).

Die Tiere zeigten zentralnervöse Symptome wie Störungen der Bewegungskoordination, Kreisbewegungen und Konvulsionen. Weitere Symptome waren Verhaltensstörungen, die sich in Schwanzbeißen und herabgesetztem Hygieneverhalten zeigten. Die Tiere wurden zunehmend schwächer und somnolent und starben 2-6 Wochen nach dem Auftreten der ersten Symptome, wobei auffiel, dass männliche Tieren früher starben als weibliche. Auffallend ist auch, dass nur Tiere, die älter als ein Jahr waren, erkrankten (Hartsough und Burger, 1965).

Bei der pathologischen Untersuchung wurde die für Prionkrankheiten typische Vakuolenbildung in der grauen Substanz des Gehirns festgestellt.

2.3.2.5. Chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (chronic wasting disease, CWD)

Die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen wurde zum ersten Mal 1967 in Fort Collins, USA, bei Maultierhirschen (*Odocoileus hemionus hemionus*)

beobachtet. Die beiden ersten Fälle bei Wapitihirschen (*Cervus elaphus nelsoni*) traten 1979 im selben Gehege auf (Williams und Young, 1982). Diese Erkrankung wurde zwischen 1981 und 1998 bei in Gefangenschaft gehaltenen Hirschen in den Vereinigten Staaten von Amerika vermehrt beobachtet und im selben Zeitraum auch bei freilebenden Hirschen diagnostiziert und näher untersucht (Williams, 2001).

Bei den in Gefangenschaft gehaltenen Hirschen handelte es sich um verschiedene nordamerikanische Hirscharten wie Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus hemionus*), Scharzwedelhirsch (*Odocoileus hemionus columbianus*), Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) und Wapitihirsch (*Cervus elaphus nelsoni*) (Williams und Young, 1982).

Betroffene Tiere waren nervös und überreizt, zeigten Gewichtsverlust bis hin zu extremer Abmagerung, Polydipsie, Zähneknirschen, Salivation, Ösophagusdilatation, Bewegungs- und Koordinationsstörungen in Form von Tremor und Ataxie (Williams und Young, 1980, Williams und Young, 1982).

Histopathologisch waren spongiforme Veränderungen der grauen Substanz und Vakuolenbildung zu erkennen (Williams und Young, 1982). In den Gehirnen betroffener Tiere konnten amyloide Plaques nachgewiesen werden (Bahmanyar et al., 1985).

Da die in Gefangenschaft gehaltenen Hirsche nicht mit vom Wiederkäuer stammenden Protein in Kontakt kamen (sie wurden mit Heu und einem Mischfutter aus Getreide, Mineralstoffen und Vitaminen gefüttert (Williams und Young, 1982)) und bei wildlebenden Hirschen ein Zugang zu einer Scrapie-kontaminierten Proteinquelle unwahrscheinlich ist, gibt es bisher keine Hinweise, die für eine fütterungsbedingte Ursache der CWD sprechen.

Klinik und Histopathologie der CWD sind mit denen anderer spongiformer Enzephalopathien bei Mensch und Tier zu vergleichen (Williams und Young, 1982).

Vergleiche der Erregerstämme haben jedoch ergeben, dass CWD nicht BSE entspricht (Bruce et al., 1997) und der Erreger der CWD nicht humanpathogen ist.

2.3.2.6. Übertragbare spongiforme Hirndegeneration der Katzen

(Feline Spongiforme Enzephalopathie, FSE)

Über diese Krankheit bei einer Hauskatze wurde 1990 zum ersten Mal berichtet (Wyatt et al., 1990). Berichte über spongiforme Enzephalopathien bei in Zoos

gehaltenen Wildkatzen stammen aus dem Jahr 1994 (Kirkwood und Cunningham, 1994).

Bis Anfang des Jahres 2000 wurden in Großbritannien in 88 Fällen FSE bei Hauskatzen diagnostiziert (Herwicker-Trautwein, 2001). Der erste Fall außerhalb des Vereinigten Königreiches wurde 1995 in Norwegen beschrieben (Bratberg et al., 1995). Die klinischen Hauptsymptome, die betroffene Tiere zeigten, waren Bewegungsstörungen, wie Ataxie, Hyper- und Dysmetrie und Verhaltensänderungen, die sich in Ängstlichkeit, Aggressivität und reduziertem Fellpflegeverhalten äußerten. Außerdem war in den meisten Fällen eine ausgeprägte Hyperästhesie auf akustische und taktile Reize zu erkennen. In einigen Fällen war Hypersalivation, Polyphagie und Polydipsie zu beobachten (Leggett et al., 1990; Wyatt et al., 1991; Gruffydd-Jones et al., 1991).

Man geht davon aus, dass FSE durch die Verabreichung von Futter entstand, welches infektiöses Material BSE-infizierter Kühe enthielt (Wyatt et al., 1991). Dies wird durch das Ergebnis der Erregerstammtypisierung erhärtet, die ergab, dass FSE eine Form der BSE bei Katzen ist (Hewicker-Trautwein, 2001).

Bei der pathologischen Untersuchung von Hirnmaterial wurde eine Astrozytose und Vakuolisierung der grauen Substanz festgestellt (Wyatt et al., 1990, Wyatt et al., 1991; Leggett et al., 1990; Bratberg et al., 1995).

2.4. Bedeutung von Tiermehl in der Rinder- und Schweinefütterung

In Großbritannien entwickelte sich in der zweiten Hälfte der 80er Jahre eine BSE-Epidemie. Aufgrund der Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen lässt sich sagen, dass diese Epidemie in Großbritannien durch gleichzeitiges Auftreten mehrerer begünstigender Faktoren entstand (Wilesmith et al., 1988):

- i. hohe Prävalenz von Scrapie
- ii. hohe Schafdichte im Verhältnis zur Rinderpopulation
- iii. technische Änderungen bei der Tiermehlproduktion wie deutliche Temperatursenkung und Verzicht auf Lösungsmittel zur Fettextraktion
- iv. Verfütterung von Tiermehl, das Gewebe von Schafen enthielt

Das endemische Vorkommen von Scrapie in Großbritannien stellte die Infektionsquelle für die Rinderpopulation dar. Durch die hohe Schafdichte entstand der für die Übertragung des Scrapieerregers auf Rinder notwendige Infektionsdruck. Das veränderte Herstellungsverfahren von Tiermehl führte zu mangelhafter oder fehlender Inaktivierung des infektiösen Agens, welches folglich durch Tiermehl auf Rinder übertragen wurde (Dahms et al., 2001).

Die wesentliche Ursache für die Ausbreitung der BSE in Großbritannien war die Verfütterung von Tiermehl, das wiederaufbereitetes Gewebe Scrapie-infizierter Schafe enthielt (Wilesmith et al., 1991).

Unter Tiermehl versteht man Futtermittel, die aus Körpern und Körperteilen warmblütiger Landtiere nach Fettabscheidung und Entfernung schwer verdaulicher Bestandteile hergestellt werden. Je nachdem welche Körperteile hauptsächlich verarbeitet werden, spricht man von Fleisch-, Fleischknochen-, Blut- und Federmehl. Tiermehle sind gut verdauliche, sehr eiweiß- und calciumreiche Futtermittel (Supplemente, 1999).

Bereits seit dem 19. Jahrhundert kommen Schlachtabfälle in Form von Tiermehl in der Tierfütterung zum Einsatz. Als Anfang des 20. Jahrhunderts damit begonnen wurde, Autoklaven in der Tiermehlproduktion einzusetzen, wurde es möglich, bis dahin nicht nutzbare Schlachtabfälle wie Horn, Haare, Federn oder sogar gefallene Tiere, zu Tiermehl zu verarbeiten (Schubert und Flachowsky, 1994). Seitdem stellten Schlachtabfälle und Kadaver eine bedeutende Eiweißquelle dar. Sie wurden zu Futtermitteln aufbereitet und sowohl in der Rinder- als auch in der Schweine- und Geflügelfütterung eingesetzt (Schubert und Flachowsky, 1994).

Die allein in der Bundesrepublik Deutschland jährlich anfallenden Schlachtabfälle reichen nach Verarbeitung zu Tiermehl für die Proteinversorgung von ungefähr 6 Millionen Schweinen aus. Dies entspricht etwa 12% der jährlich in Deutschland geschlachteten Schweine (Schubert und Flachowsky, 1994).

Der große Vorteil, anfallende Schlachtabfälle auf diese Art und Weise in der Tierfütterung zu verwenden, lag neben der Nutzung dieses Eiweißpotentials auch in der Entlastung der Eiweißfuttererzeugung über andere Wege und in der ökologisch vorteilhaften Entsorgung des beseitigungspflichtigen Materials (Schubert und Flachowsky, 1994).

Seit den 60er Jahren fielen aufgrund des ansteigenden Fleischkonsums und des rückläufigen Verzehrs von bestimmten vom Verbraucher weniger bevorzugten Fleischteilen immer größere Mengen an Schlachtabfällen an. Dies führte dazu, dass Tiermehl zum einen in immer größeren Mengen, und zum anderen immer günstiger produziert werden konnte (Hörnlimann, 2001a).

Seit Beginn der 70er Jahre wurde die Herstellung von Tiermehl in Großbritannien mit einem vereinfachten Verfahren durchgeführt. Man verzichtete aufgrund der Rückstandsproblematik auf Perchlorethylen als Lösungsmittel zur Fettextraktion, reduzierte die Dauer des Erhitzungsprozesses ebenso wie die Erhitzungstemperatur von 120°C auf nur noch 80-90°C. Außerdem wurde der Herstellungsprozess nicht mehr bei Überdruck durchgeführt. Dies alles zusammen führte zu reduzierter oder fehlender Inaktivierung des infektiösen Agens (Wilesmith et al., 1991).

Auf diese Art und Weise hergestelltes Tiermehl wurde nicht nur in Großbritannien in der Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere eingesetzt, sondern auch in andere Länder exportiert. Besonders Frankreich und die Beneluxstaaten, aber auch Deutschland und Spanien gehörten zu den Ländern, die zwischen 1985 und 1989 Tiermehl aus Großbritannien importierten (Hörnlimann, 1994).

Infolge der inadäquaten Tiermehlproduktion und jahrelang fortgesetzter Exporte von Tiermehl und Rindern aus Großbritannien und der daraus resultierenden Exposition nicht britischer Rinderpopulationen mit dem infektiösen Agens, wurde infektiöses Material jahrelang innerhalb dieser Tierart rezykliert und BSE somit auch außerhalb Großbritanniens verbreitet (Hörnlimann, 2001a).

Seit man den Zusammenhang zwischen inadäquater Tiermehlproduktion und dem Auftreten der BSE erkannt hat und festgestellt wurde, dass die Verunreinigung von Futtermitteln mit Tiermehlen bei Transport, Lagerung und Verarbeitung nicht ausgeschlossen werden kann, wurden aus Gründen des Verbraucherschutzes Tiermehlverfütterungsverbote erlassen. Im Juli 1988 trat in Großbritannien das Fütterungsverbot von Wiederkäuerprotein an Wiederkäuer in Kraft. Dieses Verbot wurde im November 1994 ergänzt. Ab diesem Zeitpunkt war die Fütterung von Säugetierprotein an Wiederkäuer verboten (Heim, 1998). Im März 1996 wurde schließlich die Verfütterung von Säugetierprotein an alle landwirtschaftlichen Nutztiere in Großbritannien verboten (Heim, 1998; Wells et al., 2003).

EU-weit wurde die Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Tiermehlen an Wiederkäuer erst im Juni 1994 untersagt. In Deutschland wurde das entsprechende Verbot bereits im März 1994 erlassen. Im August 1996 folgte schließlich ein generelles Verbot der Tiermehlverfütterung an lebensmittelliefernde Nutztiere in Deutschland. Seit Januar 2001 gilt auch innerhalb der gesamten EU ein solches Verbot (<http://www.verbraucherministerium.de/>). Seit dem 3.10.2002 ist aufgrund der Entscheidung (EG) Nr. 1774/2002 der EU das Verfüttern von Tierkörpermehl, produziert von als tauglich beurteilten Säugetieren, grundsätzlich wieder erlaubt, wenn ein „Kannibalismus“ ausgeschlossen ist, d.h. kein Verfüttern von Rind an Rind, Schwein an Schwein, o.ä. stattfindet. Die Umsetzung in deutsches Recht steht noch aus.

2.5. Übertragung der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie

2.5.1. Natürliche Übertragung

Unter natürlicher Übertragung soll im folgenden die Infektion unter Feldbedingungen verstanden werden.

Durch den Kontakt zwischen infizierten und nichtinfizierten Tieren scheint BSE nicht übertragbar zu sein. In Rinderbeständen, in denen BSE auftritt, ist meist nur ein Tier betroffen. Es handelt sich also um eine Einzeltierkrankung, was gegen die horizontale Übertragung von Tier zu Tier spricht. Auch eine vertikale Übertragung vom Muttertier auf das Kalb spielt bei der Verbreitung wahrscheinlich keine Rolle (Buschmann und Groschup, 1998).

2.5.2. Akzidentielle Übertragung

Unter akzidenteller Übertragung versteht man die Übertragung innerhalb einer oder zwischen zwei Spezies, die auf die Einwirkung des Menschen zurückzuführen ist. Als akzidentiell ist das Auftreten der BSE beim Rind anzusehen. Durch Änderungen des Herstellungsverfahrens für Tiermehl wurde der Scrapie-Erreger ungenügend

bzw. nicht inaktiviert und konnte folglich durch Verfütterung von erregerehaltigem Tiermehl auf die Spezies Rind übertragen werden (Wilesmith, 1991).

Aufgrund der Hinweise, die dafür sprechen, dass durch den Verzehr von erregerehaltigem bovinen Gewebe, das in Großbritannien in den 80er Jahren in die Nahrungskette des Menschen gelangte, die neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD) verursacht wurde, ist auch diese Erkrankung auf eine akzidentielle Übertragung zurückzuführen (Hill et al., 1997). Obwohl anfänglich das Risiko einer Übertragung auf den Menschen als unwahrscheinlich eingestuft wurde (Taylor, 1989), belegten später Erregerstammtypisierungen und Untersuchungen mit Mäusen, die sowohl mit BSE als auch mit vCJD infiziert wurden, dass vCJD BSE entspricht (Bruce et al., 1997).

Durch Verfütterung von wiederkäuerproteinhaltigem Futter an Wildwiederkäuer und -katzen in britischen Zoos wurde die BSE auf diese Tiere übertragen (Kirkwood und Cunningham, 1994). Auf dem selben Weg entstand wahrscheinlich die Feline spongiforme Enzephalopathie der Hauskatze (Wyatt et al., 1991) und die übertragbare spongiforme Hirndegeneration der Nerze.

2.5.3. Experimentelle Übertragung

Experimentell lässt sich BSE auf parenteralem und auf oralem Weg auf Mäuse (Fraser et al., 1988; Barlow und Middleton, 1990), Schaf und Ziege (Foster, 1993), Rind (Dawson et al., 1990a; Wells et al., 1994) und Nerze (Robinson et al., 1994) übertragen. Beim Schwein gelang nur die parenterale Übertragung (Dawson et al., 1990b; Wells et al., 2003). Ebenfalls erfolgreich verlief die parenterale Übertragung auf das Krallenäffchen (*Callithrix jacchus*) (Baker et al., 1993) und bei Makaka-Affen (Meerkatzen) (Lasmézas et al., 1996).

2.6. Infektionsversuche beim Schwein

Die BSE-Epidemie in Großbritannien ist vor allem auf die Verfütterung von mit Scrapie-Agens kontaminiertem Tiermehl an Rinder zurückzuführen (Wilesmith et al., 1991).

In Großbritannien wurde die Fütterung von Tiermehl an landwirtschaftliche Nutztiere 1996 verboten (Wells et al., 2003). In den Jahren davor kam kontaminiertes Tiermehl sowohl in der Rinder- als auch in der Geflügel- und Schweinefütterung zum Einsatz (Hörnlmann, 2001a; Wells et al., 2003). Schweine erhielten, verglichen mit Rindern, mehr Tiermehl, da in kommerziellem Mischfutter für Schweine größere Mengen Tiermehl eingemischt wurden als in Wiederkäuerfutter (Wells et al., 2003). Trotz dieser exzessiven Exposition von Schweinen mit dem BSE-Agens via Tiermehl gibt es bisher keine Berichte über das Auftreten einer natürlichen spongiformen Enzephalopathie beim Schwein (Dawson et al., 1990b; Done, 1990).

Dawson begann 1989 Infektionsversuche mit Schweinen durchzuführen (Dawson et al., 1990b, Dawson et al., 1991; Wells et al., 2003), um die Empfänglichkeit dieser Tierart für BSE zu untersuchen. Er führte sowohl einen parenteralen als auch einen oralen Übertragungsversuch durch und inokulierte anschließend Inzuchtmäuse mit Gewebe infizierter Schweine, um die Infektiosität von Geweben dieser Schweine zu untersuchen (Wells et al., 2003).

2.6.1. Parenteraler Übertragungversuch

Für den parenteralen Versuch wurden 21 Ferkel aus einer spezifisch pathogenfreien Herde entnommen und in zwei Gruppen geteilt. Die Versuchsgruppe bestand aus 10, die Kontrollgruppe aus 11 Ferkeln. Alle diese Tiere waren Kreuzungen zwischen Landrasse und Large White Schweinen. Sie wurden während des Versuchs mit einem kommerziellen Mischfutter für Schweine gefüttert.

Den 10 Ferkeln der Versuchsgruppe wurden unter Halothananästhesie gleichzeitig 0,5 ml Inokulum intrazerebral (i. c.), 1-2 ml intravenös (i. v.) und 8-9 ml intraperitoneal (i. p.) verabreicht (Dawson et al., 1990, Dawson et al., 1991; Wells et al., 2003). Das Inokulum bestand aus einer 10%igen Kochsalzlösung mit homogenisiertem Gehirngewebe von vier auf natürlichem Weg an BSE-erkrankten Kühen.

Den 11 Kontrolltieren wurde ebenfalls unter Halothannarkose Kochsalzlösung inokuliert.

Zwei Tiere jeder Gruppe starben im Verlauf des Versuches oder mussten aufgrund anderer Erkrankungen euthanasiert werden (Wells et al., 2003).

69 Wochen post inoculationem (p. i.) konnte bei einem Schwein der Versuchsgruppe die erfolgreiche Übertragung von BSE festgestellt werden (Dawson et al., 1990, Dawson et al., 1991). Dieses Tier zeigte zunächst aggressives Verhalten gegenüber dem Betreuer, Inappetenz und Depressionen. Wenige Tage später wurde neben ziellosem Beißen eine symmetrische Ataxie festgestellt. In den folgenden Wochen konnte dann zusätzlich eine Hinterhandschwäche beobachtet werden. Das Tier stürzte häufig und konnte schließlich nicht mehr ohne Hilfe aufstehen. Nach 5 Wochen Krankheitsverlauf waren die Symptome weiter fortgeschritten. Das Schwein wurde euthanasiert (Dawson et al., 1990, Dawson et al., 1991) und pathologisch untersucht. Vier weitere Schweine aus der Versuchsgruppe entwickelten bis zur 163. Woche p. i. ebenfalls klinische Symptome, die den oben beschriebenen entsprachen (Wells et al., 2003).

Drei klinisch unauffällige Schweine der Versuchsgruppe wurden nach 105 – 107 p. i. zusammen mit vier Kontrolltieren getötet und histopathologisch untersucht.

Neuropathologische Veränderungen, die für eine spongiforme Enzephalopathie sprechen, konnten sowohl in den fünf erkrankten und klinisch auffälligen als auch bei zwei der drei klinisch unauffälligen Tiere festgestellt werden (Wells et al., 2003). Das pathologische Läsionsprofil war charakterisiert durch vakuoläre Veränderungen der grauen Substanz und Proliferation der Astrozyten. (Ryder et al., 2000). Diese waren bei den vier klinisch erkrankten Tieren, die erst später Symptome zeigten, besonders deutlich und in den meisten Gehirnregionen zu finden (Wells et al., 2003). Bei den beiden klinisch unauffälligen Tieren waren die Vakuolen bezüglich Ausmaß und Verbreitung im Gehirn weniger ausgeprägt. Die Veränderungen bei dem Schwein, welches bereits 69 Wochen p. i. Materials neurologische Symptome zeigte, befanden sich in Bezug auf ihre Schwere zwischen den beiden genannten Gruppen (Wells et al., 2003). Im ZNS der Schweine mit spongiformer Enzephalopathie konnten Ansammlungen von PrP^{Sc} festgestellt werden (Wells et al., 2003).

Die Schweine der Kontrollgruppe entwickelten keine Symptome und blieben klinisch unauffällig. Sie wurden 2 bis 7 Jahren p. i. euthanasiert und ebenfalls histopathologischen Untersuchungen unterzogen (Wells et al., 2003). Hierbei konnten keine so deutlichen vakuolären Veränderungen wie bei den Versuchstieren festgestellt werden. Jedoch wurde bei allen Kontrolltieren eine Vakuolisierung der oberen Schichten der grauen Substanz festgestellt. Diese Vakuolen waren, abgesehen von

der Häufigkeit ihres Auftretens, nicht von denen in den Gehirnen der infizierten Schweine zu unterscheiden (Ryder et al., 2000).

In früheren Veröffentlichungen wurde bereits darauf hingewiesen, dass auch in Gehirnen gesunder Schweine gelegentlich solche vakuolären Veränderungen beobachtet werden können (Wyatt et al., 1991). Dies steht im Gegensatz zu der Aussage Ryders, dass solche Veränderungen bei gesunden Schweinen noch nie beschrieben wurden. Er schließt nicht aus, dass diese Vakuolisierung auf den Beginn einer spongiformen Enzephalopathie hinweisen kann (Ryder et al., 2000).

2.6.2. Oraler Übertragungsversuch

Für den Fütterungsversuch wurden Schweine verschiedener, im Vereinigten Königreich geläufiger Rassen verwendet. Diese Ferkel entstammten aus Würfen von 5 verschiedenen Sauen. Sie wurden vor dem Versuch mit Futter gefüttert, das kein Tiermehl enthielt (Dawson et al., 1991; Wells et al., 2003).

Für diesen Versuch wurden sowohl eine Versuchs- als auch eine Kontrollgruppe, jeweils aus 10 Ferkeln bestehend, gebildet. Aus jedem der 5 Würfe wurde je ein kastriertes männliches und ein weibliches Ferkel den beiden Gruppen zugeteilt (Dawson et al., 1991; Wells et al., 2003).

Als Futter wurden die Gehirne von natürlichen BSE-Fällen homogenisiert und 4 kg dieses Homogenats unter das normale Futter gemischt. Diese Mischung wurde den 10 Tieren der Versuchsgruppe dreimal im Abstand von 1-2 Wochen gefüttert (Dawson, et al., 1991). Um sicher zu gehen, dass alle Tiere der Versuchsgruppe das Futter aufnahmen, wurden sie bei der Fütterung überwacht (Dawson et al., 1991; Wells et al., 2003).

Die Menge an verabreichtem zentralnervösem Gewebe war bei diesem Versuch größer als sie im Feld jemals hätte sein können. Jedem Ferkel wurde etwa 50 000 x mehr ZNS-Gewebe verabreicht, als die für das Feld kalkulierte Menge (Wells et al., 2003). Die Kontrollgruppe erhielt tiermehlfreies Futter und wurde von der Versuchsgruppe getrennt gehalten (Wells et al., 2003).

Aufgrund anderer Krankheiten mussten drei Tiere der Versuchs- und zwei der Kontrollgruppe euthanasiert werden (Wells et al., 2003). Keines der 20 Schweine entwickelte klinische Symptome einer spongiformen Enzephalopathie (Wells et al.,

2003). Vier Tiere jeder Gruppe wurden 103 – 109 Wochen und die verbleibenden drei bzw. vier Schweine der Versuchs- bzw. Kontrollgruppe 359 – 371 Wochen nach Versuchsbeginn euthanasiert und histopathologisch untersucht. Bei Tieren beider Gruppen wurde dabei eine Vakuolisierung der grauen Substanz unterschiedlichen Ausmaßes festgestellt. Es konnten jedoch keine PrP^{Sc}-Ansammlungen nachgewiesen werden (Wells et al., 2003).

2.6.3. Untersuchung der Infektiosität verschiedener Gewebe

Um die Infektiosität bestimmter Gewebe der infizierten Schweine zu testen, wurden verschiedene Gewebehomogenate mit 10%iger Kochsalzlösung zu Suspensionen verarbeitet und jede dieser Suspensionen jeweils 20 Mäusen verabreicht. Jede Maus erhielt 0,02 ml Inokulum i.c. und 0,1 ml i. p. (Wells et al., 2003). Anschließend wurde zunächst beobachtet, ob die Mäuse neurologische Symptome entwickelten. Nach Euthanasie wurden die Gehirne dieser Mäuse dann histopathologisch untersucht. Die Tiere, die keine klinischen Symptome entwickelten, wurden trotzdem eingeschläfert und einer histopathologischen Untersuchung unterzogen.

Bei allen sieben Schweinen, die auf parenteralem Weg infiziert wurden und eine spongiforme Enzephalopathie entwickelten, wurde Infektiosität im ZNS festgestellt. Dies konnte auch in bestimmten Geweben des Gastrointestinaltraktes von vier dieser sieben Schweine festgestellt werden (Wells et al., 2003). Alle anderen Gewebe der Schweine des parenteralen Übertragungsversuches scheinen nicht infektiös zu sein. Dasselbe gilt sowohl für neurales als auch für nicht neurales Gewebe der Schweine, die im Fütterungsversuch eingesetzt wurden (Wells et al., 2003).

2.7. Prionproteingen (PrP-Gen)

2.7.1. Allgemeines

Bisher wurden von ungefähr 70 Säugetieren, hauptsächlich von Huftieren und Primaten, die PrP-Gene analysiert. Weiterhin sind auch die PrP-Gene einiger Vogelarten und Beuteltiere untersucht worden (Schätzl, 2001).

Bei allen bisher analysierten PrP-Genen fiel eine Gemeinsamkeit auf: sie weisen am 5`-Ende ein oder zwei Exons und am 3`-Ende ein weiteres Exon auf. Letzteres enthält den Leserahmen (ORF, open reading frame), d. h. den proteincodierenden Teil des PrP-Gens, der für ca. 250 Aminosäuren codiert. Zwischen den Exons am 5`- und 3`-Ende befindet sich ein Intron, eine nicht codierende Sequenz innerhalb des Gens (Schätzl, 2001).

Das PrP-Gen des Menschen wird in der Literatur üblicherweise mit PRNP, das der Tiere mit Prnp abgekürzt.

Bei einigen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien ist eine genetische Komponente, die die Krankheitsempfänglichkeit beeinflusst, bekannt. Das bedeutet, dass bestimmte Genotypen die Resistenz gegen beziehungsweise die Empfänglichkeit für einige der Prionkrankheiten mitbestimmen. Sowohl beim Tier als auch beim Mensch stellt das PrP-Gen das zentrale Element dieser genetischen Komponente dar (Hunter, 2001), da bei Vorhandensein bestimmter PrP-Gen-Allele das zelluläre PrP (PrP^c) mit höherer Wahrscheinlichkeit in die Scrapie-Form des PrP (PrP^{Sc}) umgeformt wird (Goldmann et al., 1994). Solche Allele haben demzufolge einen großen Einfluß auf die Pathogenese von spongiformen Enzephalopathien.

2.7.2. Prionproteingen und Genotypisierung beim Schaf

Manche Autoren betrachten Scrapie als rein genetisch bedingte Erkrankung (Ridley und Baker, 1995). Dass es sich bei Scrapie jedoch um eine übertragbare Krankheit handelt, konnte experimentell nachgewiesen werden (Brotherston et al., 1968; Pattison et al., 1972; Dickinson et al., 1974; Baker et al., 1993). Gegen die These, bei Scrapie würde es sich um eine ausschließlich genetische Krankheit handeln, spricht ebenfalls, dass Schafe, deren Genotyp mit Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert wird, auch in Australien und Neuseeland gehalten werden (Hunter et al., 1997), beides Länder, in denen Scrapie aufgrund sehr strenger Importverbote und Quarantänemaßnahmen nicht vorkommt (MacDiarmid, 1996).

Nach heutigem Wissenstand handelt es sich bei Scrapie um eine übertragbare Krankheit mit einer genetischen Komponente (Detwiler, 2001), die die Empfänglich-

keit für Scrapie beeinflusst. Das heißt also, dass die Empfänglichkeit individueller Schafe, Schaflinien oder ganzer Schafrassen vom Genotyp dieser Tiere mitbestimmt wird.

Hunter und Mitarbeiter beschreiben die Selektion einer Herde von Cheviots-Schafen aufgrund unterschiedlicher Reaktionen auf die experimentelle Übertragung von SSBP/1 (Scrapie sheep brain pool 1) in zwei Linien (Hunter et al., 1996, Hunter 2001). Laut Hunter werden diese unterschiedlichen Reaktionen auf das Sip-Gen (scrapie incubation period-Gen) des Schafes zurückgeführt (Hunter et al., 1989), welches laut Erkenntnissen von Moore (Moore et al., 1998) mit dem PrP-Gen identisch ist.

Bei der Untersuchung der oben genannten Cheviots wurden zwei Genotypen dieses Sip-Gens entdeckt (Hunter et al., 1989): sA (short incubation allele) und pA (prolonged incubation allele). Diese Allele nehmen Einfluss auf die Inkubationszeit bei Scrapie. Sie unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz im Codon 136 des ovinen Prionproteingens (Hunter et al., 1989). Valin an Codon 136 hat, im Gegensatz zu Alanin an dieser Position, eine vergleichsweise kürzere Inkubationszeit zur Folge. Schafe, die an Codon 136 homozygot für Valin sind (VV_{136}) weisen dabei eine kürzere Inkubationszeit auf als Schafe, die heterozygot sind (VA_{136}). Alanin-Homozygotie an Codon 136 (AA_{136}) resultiert in Scrapie-Resistenz (Hunter et al., 1996). Neben Codon 136 beeinflussen auch Änderungen in der Aminosäuresequenz an Codon 154 und 171 die Scrapie-Empfänglichkeit (Hunter et al., 1996). Auf Codon 154 des ovinen Prnp führt Arginin-Homozygotie (RR_{154}) zu Scrapie-Resistenz. Jedoch scheint bei heterozygoten Tieren (HR_{154}) die Inkubationszeit länger zu dauern als bei Tieren, die an dieser Position homozygot für Histidin sind (HH_{154}). Schafe, die an Codon 171 homozygot für Glutamin (QQ_{171}) sind, sind sehr Scrapie-empfindlich und erkranken mit hoher Wahrscheinlichkeit, währenddessen Schafe, die an dieser Position homozygot für Arginin sind (RR_{171}), sehr Scrapie-resistent sind. Heterozygote Tiere (RQ_{171}) weisen eine längere Inkubationszeit auf als Glutamin-Homozygote (QQ_{171}). An Codon 171 kann noch ein weiterer Polymorphismus auftreten: Glutamin \rightarrow Histidin. Diese Variante ist die einzige, die bei homozygoten Schafen einen Überlebensvorteil bewirkt. Bei heterozygoten Tieren, die an Position 171 Histidin tragen, wird PrP^c stärker zu PrP^{Sc} umgefaltet als bei Histidin-homozygoten Schafen (HH_{171}) (Bossers et al., 2000).

Neben dem Genotyp einzelner Schafe oder ganzer Rassen spielt hinsichtlich der Empfänglichkeit für Scrapie aber auch die Art des Agens eine Rolle (Goldmann et al., 1994). Goldmann und Mitarbeiter inokulierten Versuchsschafe der Rasse Cheviots mit zwei verschiedenen Scrapie-Isolaten (SSBP/1 und CH1641) und mit einem BSE-Agens. Die Tiere, die nach Inokulation mit CH1641 oder BSE erkrankten, waren am Codon 171 homozygot für Glutamin (QQ₁₇₁), während Schafe, die nach SSBP/1-Übertragung an Scrapie erkrankten, Valin am Codon 136 aufwiesen, d.h. entweder homozygot für Valin oder Alanin-Valin-heterozygot waren.

Weitere Polymorphismen befinden sich an den Positionen 112, 137, 141 und 211 (Hunter, 2001). Diese sind jedoch zu Vergleich mit den Polymorphismen an Codon 136, 154 und 171 von geringerer Bedeutung (Hunter et al., 1996; Detwiler, 2001). Das Auftreten von Scrapie in anderen Schafrassen wurde ebenfalls mit den genannten Variationen an den Codons 136, 154 und 171 des ovinen PrP-Gens in Verbindung gebracht (Hunter et al., 1993; Laplanche et al., 1993; Westaway et al., 1994; Belt et al., 1995; Cloucard, et al., 1995). Es bestehen jedoch rassespezifische Unterschiede. Schafrassen, die das PrP^{VRQ}-Allel tragen, sind extrem empfänglich für Scrapie (Drögemüller et al., 2001). In Rassen wie z.B. Suffolk kommt das PrP^{VRQ}-Allel selten bzw. nicht vor (Hunter, 1997). Hier wird das PrP^{ARQ}-Allel (Alanin, Arginin und Glutamin an den Positionen 136, 154, und 171) mit hochgradiger Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert.

Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass der PrP-Genotyp AA₁₃₆RR₁₅₄RR₁₇₁ in allen Rassen die größte Scrapie-Resistenz (Dawson et al., 1998; Hunter, 2001) aufweist. Bisher wurde nur bei einem Suffolk-Schaf in Japan, welches diesen Genotyp aufwies, Scrapie festgestellt (Ikeda et al., 1995). Das ARR-Allel scheint dominant zu sein, so dass heterozygote Schafe genau wie Homozygote sehr resistent gegen Scrapie sind (Dawson et al., 1998). Schafe mit Glutamin-Glutamin-Homozygotie auf Codon 171 (QQ₁₇₁), also die Genotypen VV₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁ oder VA₁₃₆RR₁₅₄QQ₁₇₁, sind extrem Scrapie-empänglich und erkranken mit großer Sicherheit an Scrapie (Hunter et al., 1996).

Dass das ovine Prnp die Empfänglichkeit für Scrapie beeinflusst, konnte auch auf Zellkulturebene gezeigt werden (Sabuncu et al., 2003). Zellen, die das ovine PrP^{VRQ}-Allel tragen, welches mit Scrapie-Empfänglichkeit assoziiert wird, zeigen sich hochgradig empfänglich für Scrapie und replizieren das Agens in hohem Maße,

während dies bei Zellen mit dem ARR-Allel, das mit Scrapie-Resistenz in Zusammenhang gebracht wird, nicht der Fall war.

In mehreren Ländern, z.B. Großbritannien und Deutschland (Drögemüller et al., 2001; Arnold et al., 2002), wurden Zuchtprogramme zur Kontrolle der Scrapie-Inzidenz in Schafpopulationen vorgeschlagen, die auf der selektiven Zucht von Scrapie-resistenten Genotypen basieren (Drögemüller et al., 2001). Ziel dieser gezielten Auswahl von Zuchttieren, die das mit extremer Resistenz gegen Scrapie assoziierte ARR-Allel tragen, soll dabei die allmähliche Erhöhung des Anteils Scrapie-resistenter Tiere in den Schafpopulationen sein. Schafe mit hoher Scrapie-Empfänglichkeit sollen dagegen von der Zucht ausgeschlossen werden (Drögemüller et al., 2001). Man geht davon aus, dass durch Genotypisierung aller Zuchttiere und Selektion der Scrapie-resistenten Genotypen der Scrapie-Erreger getilgt werden kann (Doherr und Hunter, 2001). Durch diese selektive Zucht auf Krankheitsresistenz werden sowohl Ziele des Tierschutzes, als auch des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit verfolgt.

2.7.3. Prionproteingen der Maus

Auch im Genom der Maus existiert ein Gen, das wie das Sip-Gen des Schafes, die Inkubationszeit bei Maus-Scrapie beeinflusst (Bruce et al., 1991). Dieses wird als Sinc-Gen (scrapie incubation gen) bezeichnet (Bruce et al., 1991) und ist mit dem PrP-Gen der Maus identisch (Moore et al., 1998).

Das murine Prnp existiert wie das ovine in 2 Allelen, die in der Literatur unterschiedlich benannt werden: entweder PrP-A und PrP-B (Westaway et al., 1987) oder s7 (short) und p7 (prolonged) (Bruce et al., 1991). Diese beiden Allele unterscheiden sich an den Codons 108 und 189 (Carlson et al., 1988; Westaway et al., 1987).

Mäuse, die das s7-Allel tragen, weisen an Codon 108 Leucin und an Codon 189 Threonin auf, während sich bei Mäusen mit dem p7-Allel Phenylalanin an Position 108 und Valin an Codon 189 befindet (Bruce et al., 1991; Westaway et al., 1987; Carlson et al., 1988).

S7-homozygote Mäuse (s7s7) haben nach experimenteller Infektion mit Scrapie eine kurze Inkubationszeit. Das p7-Allel determiniert eine lange Inkubationszeit, die bei

p7-homozygoten (p7p7) Mäusen länger dauert als bei heterozygoten Tieren. Diese weisen eine mittlere Inkubationszeit auf (Detwiler, 2001).

Nach Erkenntnissen von Race et al. und Kingsbury et al. ist das p7-Allel dominant über das s7-Allel (Kingsbury et al., 1983; Race et al., 1990).

Andere Gene der Maus nehmen ebenfalls Einfluss auf die Inkubationszeit, spielen aber im Vergleich mit dem Sinc-Gen eine untergeordnete Rolle (Bruce et al., 1991).

Wie beim Schaf hängt die Länge der Inkubationszeit für Scrapie bei Mäusen nicht ausschließlich vom Genom, sondern auch vom Scapiestamm (Kingsbury et al., 1983; Detwiler, 2001) und laut Kingsbury auch vom Geschlecht der erkrankten Mäuse ab (Kingsbury, 1983).

2.7.4. Prionproteingen des Rindes

Neibergs untersuchte das bovine PrP-Gen verschiedener Rinder aus USA, Kenia, Australien und dem Vereinigten Königreich. In diese Studie bezog er sowohl an BSE erkrankte Rinder und deren gesunde Verwandte, als auch nicht verwandte Rinder mit ein. Er konnte im PrP-Gen dieser Rinder verschiedene Allele feststellen. Diese werden mit A, B, C, 1 und 2 bezeichnet (Neibergs et al., 1994).

Die an BSE erkrankten Rinder und deren Verwandte wiesen hauptsächlich den Genotyp AA auf. Es konnten jedoch keine Differenzen im Genotyp zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden (Neibergs et al., 1994).

Da die Rinder dieser Studie unter anderem aus verschiedenen geographischen Regionen des Vereinigten Königreiches stammten, kann für diese Tiere nicht von der selben Exposition mit dem BSE-Erreger ausgegangen werden. Es könnte also sein, dass den BSE-erkrankten Rinder mehr erregerhaltiges Futter gefüttert wurde als den gesunden Tieren. Neibergs betont jedoch, dass die verwandten Tiere, besonders die Halbgeschwister BSE-kranker Rinder, aus der gleichen Geburtskohorte der selben Farm stammen und man daher mit großer Sicherheit annehmen kann, dass diese Tiere mit dem selben Futter gefüttert wurden und dementsprechend dem BSE-Erreger gleich stark ausgesetzt waren.

Diese gleichen „Ausgangspositionen“ bezüglich der Exposition verwandter Rinder mit dem BSE-Erreger und die Erkenntnis, dass zwischen den BSE-kranken Rindern und gesunden Verwandten keine genotypischen Differenzen festzustellen sind, lässt

darauf schließen, dass sich der AA-Genotyp nicht zur Genotypisierung von Rindern eignet, um ein Erkrankungsrisiko individueller Rinder festzustellen. Es ist also nicht möglich, anhand des AA-Genotyps Rinder mit möglicherweise erhöhter Empfänglichkeit für BSE zu selektieren, und so, ähnlich wie beim Schaf, eine selektive Zucht auf BSE-Resistenz durchzuführen.

Andere molekulargenetische Untersuchungen des bovinen PrP-Gens ergaben ebenfalls keine Hinweise auf eine genetische determinierte erhöhte Empfänglichkeit für BSE (Wijeratne und Curnow, 1990; Donnelly et al., 1997).

2.7.5. Prionproteingen des Menschen

Für das Auftreten der familiär-genetischen Formen der Prionkrankheiten des Menschen, des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms (GSS), der Letalen Familiären Schlaflosigkeit (FFI) und der familiären Form der Creutzfeld-Jakob Krankheit (fCJD), sind verschiedene Mutationen des PrP-Gens verantwortlich, die an bestimmten Stellen des PrP^c den Einbau einer anderen Aminosäure zur Folge haben.

Bei GSS-Patienten konnten fünf verschiedene Mutationen identifiziert werden. Die häufigste Mutation findet sich an Codon 102, wo Prolin durch Leucin (P102L) ausgetauscht wird (Goldgaber et al., 1989; Hsiao und Prusiner, 1990). Andere mit dieser Erkrankung assoziierte Mutationen betreffen die Codons 105 (Prolin → Leucin), 117 (Alanin → Valin), 198 (Phenylalanin → Serin) und 217 (Glutamin → Arginin) (Budka, 2001b; Kretzschmar, 2001). Je nachdem welche Mutation vorliegt, variieren die pathologischen Veränderungen in ihrer Ausprägung. Bei der P102L-Mutation stehen spongiforme Veränderungen im Vordergrund, während bei der F198S- und Q217R-Mutation neurofibrilläre Tangles auffallen (Kretzschmar, 2001). FFI wird bei Patienten mit einer Mutation von Aspartat zu Asparagin im Codon 178 des PrP-Gens festgestellt (Medori et al., 1992a, Medori et al., 1992b), wenn diese in Verbindung mit einer Homozygotie für Methionin im Codon 129 auftritt (Goldfarb et al., 1992; Monari et al., 1994). Ist am Codon 129 Valin vorhanden, so ist die D178N-Mutation mit der fCJD vergesellschaftet (Goldfarb et al., 1992; Monari et al., 1994). Die Krankheit, die durch diese Mutation an Codon 178 hervorgerufen wird, wird also durch das Auftreten von Methionin oder Valin an Codon 129 determiniert.

Neben der Mutation an Codon 178, die in Kombination mit Valin an Codon 129 fCJD hervorruft, sind für diese Prionerkrankung noch weitere Mutationen bekannt. Die häufigste findet sich an Codon 200 (Glutaminsäure → Lysin). Diese Mutation wurde bei slowakischen und chilenischen Familien sowie bei libyschen Einwanderern in Israel festgestellt, bei denen CJD gehäuft vorkommt (Goldfarb et al., 1991; Brown et al., 1992; Chapman et al., 1994; Meiner et al., 1997). An den Codons 108 (Valin → Isoleucin), 183 (Threonin → Alanin), 208 (Arginin → Histidin), 210 (Valin → Isoleucin) und 232 (Methionin → Arginin) wurden Mutationen identifiziert, die ebenfalls mit dem Auftreten der fCJD in Zusammenhang stehen (Kretzschmar, 2001).

Ca. 72% der Patienten mit sporadischer CJD (sCJD) sind an Position 129 homozygot für Methionin. Der Anteil der Methionin-Homozygoten in der Normalbevölkerung liegt jedoch nur bei 37%. Auch bei den bisher aufgetretenen Fällen der neuen Variante von CJD (vCJD) war der homozygote Genotyp MM an Codon 129 vorherrschend (Will et al., 1996). In Fällen von iatrogenen CJD (iCJD) wurde beobachtet, dass die betroffenen Personen an Position 129 häufiger homozygot für Methionin oder Valin sind, als die Durchschnittsbevölkerung (Collinge et al., 1991; Palmer et al., 1991). Homozygotie an Codon 129 scheint also prinzipiell eine genetische Prädisposition zur CJD beim Mensch zu bedingen (Palmer et al., 1991).

3. Material und Methoden

3.1. Auswahl der Schweine

Für diese Arbeit wurden Schweine verschiedener Rassen gesucht. Das Teilnahme-kriterium war ausschließlich die Reinrassigkeit der Tiere. Die Auswahl der teil-nehmenden Schweine erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Heinritzi, Herrn Dr. Ritzmann und Frau TÄ Kixmöller aus der II. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Alle Tierbestände, aus denen Schweine für diese Untersuchung herangezogen wurden, waren der II. Medizinischen Tierklinik bekannt.

3.2. Probenmaterial

Für diese Studie wurden, mit Ausnahme des Wildschweins, Blutproben verwendet. Da die Blutentnahme beim Wildschwein nicht möglich war, wurden von geschlachte-ten Wildschweinen Leberproben für die Untersuchung herangezogen.

3.3. Entnahme der Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte nach Standardmethoden mit 1,10 x 50 mm Sterican[®]-Einwegkanülen (Braun, Melsungen) aus der Vena jugularis (Heinritzi, 1999). Als Auffanggefäß dienten 9ml K⁺-EDTA-Blutröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht).

3.4. Transport und Lagerung der Blut - und Leberproben

Die gewonnenen Blutproben wurden gekühlt bei 4°C ins Labor transportiert. Im direkten Anschluss erfolgte die Isolierung der Lymphozyten.

Die Leberproben wurden tiefgekühlt transportiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.5. Lymphozytenisolierung

Vor Beginn wurden 15 ml Gefäße (Falcons, Nunc, Wiesbaden) entsprechend der Nummerierung der Blutproben beschriftet, um ein Verwechseln der Proben zu verhindern.

Für die Isolierung der Lymphozyten aus den Blutproben wurde mit Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin) gearbeitet, einer speziellen Lösung zur Abtrennung der Lymphozyten von den übrigen Blutbestandteilen. Biocoll Separating Solution enthält Polysucrose 400, ein Polymer, welches sich mit geeigneten Pufferlösungen, z.B. PBS, auf eine exakte Dichte einstellen lässt. Zentrifugiert man anschließend ein Zellgemisch, z.B. Vollblut, damit, so erhält man scharfe Banden definierter Zelltypen, z.B. Lymphozyten.

Zur Isolierung wurde 1 ml Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin) in ein 15 ml Falcongefäß gegeben. Auf diese Trennungslösung wurde vorsichtig 1 ml Blut pipettiert. Das vorsichtige Pipettieren der Blutprobe sollte verhindern, dass sich die beiden Komponenten vor der Zentrifugation mischen. Nach Verschluss der Gefäße wurden die Proben in den Falcons für 20 min bei 1200 x g zentrifugiert. Um ein Mischen der Komponenten zu vermeiden, sollte der Abbremsvorgang der Zentrifuge nicht ruckartig verlaufen. Daher wurde die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet. Die Temperatur in der Zentrifuge betrug konstant 10°C. Die Probengefäße wurden der Zentrifuge vorsichtig entnommen. Die Lymphozyten befanden sich nun in der weißlichen Schicht zwischen Trennlösung und Plasma und wurden durch Abpipettieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) verbracht. Um ein Vermischen der drei Schichten zu verhindern, musste vorsichtig gearbeitet werden.

Nach der Isolierung der Lymphozyten wurden diese bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das beschriebene Verfahren wurde für jede Blutprobe mit 3-4 ml Blut durchgeführt.

3.6. Isolierung der DNA

Zur Isolierung der DNA aus Lymphozyten wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) gearbeitet. Dieses System ermöglicht eine schnelle und einfache Reinigung von Gesamt-DNA mit Hilfe von Affinitätsäulen.

Nach Lyse der Lymphozyten mittels 20 μl Proteinnase K und 200 μl Puffer und anschließender Ausfällung der DNA mit 200 μl 100%igem Ethanol wird das Zelllysat auf die Säule gegeben. Die DNA wird während eines Zentrifugationsschrittes bei 6000 x g für 1 min an die QIAamp Silicagel-Membran (Qiagen, Hilden) gebunden. Die gebundene DNA wird nacheinander durch Zentrifugation bei 6 000 bzw. 20 000 x g für 1 bzw. 3 min mit jeweils 500 μl Waschpuffer von zellulären Proteinen gereinigt. Danach wird die DNA in 200 μl Elutionspuffer aus der QIAamp Spinsäule (Qiagen, Hilden) aufgefangen.

Für diese Untersuchung wurde das QIAamp Verfahren als Spin-Variante (Qiagen, Hilden) angewendet.

Die Aufreinigung wurde mit dem Spin-Protokoll für Vollblut und andere Körperflüssigkeiten durchgeführt.

Die Isolierung der DNA aus den Leberproben der Wildschweine wurde ebenfalls mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden), jedoch anhand des Tissue-Protokolls durchgeführt.

Je 25 mg der Leberproben wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben und nach Zugabe von 180 μl Lysispuffer und 20 μl Proteinase K für 3 Stunden bei 56°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Danach wurden 200 μl eines weiteren Lysispuffers dazu gegeben und anschließend nochmals für weitere 10 min bei 70°C inkubiert.

Nach der Ausfällung der DNA durch Zugabe von 200 μl 100%igem Ethanol wurde das Lysat auf die Säule gegeben und durch Zentrifugieren bei 6 000 x g für 1 min an

diese gebunden. Danach folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl Waschpuffer und Zentrifugation bei 6 000 x g bzw. 20 000 x g für 1 bzw. 3 min. Im Anschluss daran wurde die Säule in ein 1,5,ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben und die DNA von dieser mit 200 µl Puffer eluiert.

Die DNA wurde im Anschluss an die Aufreinigung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei –20°C gelagert.

Man erhält nach korrekter Durchführung der Protokolle reine DNA zur direkten PCR-Amplifikation.

3.7. Polymerase-Ketten-Reaktion

3.7.1. Prinzip

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), das es ermöglicht, auch kleinste Mengen an DNA einer Analyse zugänglich zu machen. Binnen weniger Stunden führt die zyklische Wiederholung von Doppelstrangtrennung (Denaturierung), Primer-Bindung (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) zur Synthese größerer DNA-Mengen.

Die Denaturierung doppelsträngiger DNA erreicht man durch Temperaturerhöhung bis 95°C. Spezifische Oligonukleotide (Primer), die synthetisch hergestellt werden, binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang, der dann von einer DNA-Polymerase dupliziert wird, so dass wiederum Doppelstrang-DNA vorliegt. Durch erneute Temperaturerhöhung entstehen abermals DNA-Einzelstränge, die nach Annealing wiederum durch die Polymerase verdoppelt werden. Da auch die neu gebildeten DNA-Stränge als Matrize zur Verfügung stehen, führt die Polymerase-Ketten-Reaktion zu einer exponentiellen Zunahme an DNA. Die vervielfältigte DNA steht dann einem diagnostischen Nachweis oder anderen analytischen Methoden zur Verfügung.

3.7.2. Kontroll-PCR

Um zu überprüfen, ob genügend DNA gewonnen wurde, wurde zuerst eine Kontroll-PCR durchgeführt.

3.7.2.1. Primer

Die Sequenzen der Primer für die PCR zur Amplifizierung des PrP-Gens wurden aus einer früheren Veröffentlichung übernommen (Martin et al., 1995) und sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Synthese erfolgte durch die Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg).

Tabelle 2:

Primer	Primersequenz (5` - 3`)
PrP I	CATTTGATGCTGACACCCTCTTTA
PrP II	ATGAGACACCACCACTACAGGGCT

3.7.2.2. PCR-Reaktion

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes enthielt 41 µl Reddymix (ABgene, Hamburg), 8 µl Proben-DNA und je 50 pmol Primer PrP I und PrP II (MWG Biotech, Ebersberg).

3.7.2.3. Temperaturprofil der Reaktionszyklen

Die PCR wurde im Thermocycler GeneAmp PCRSystem 9700 (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) unter den in Tabelle 3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3: PCR-Temperaturprofil

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	1 min	10 x
Annealing	60°C	2 min	
Elongation	72°C	2 min	
Denaturierung	94°C	1 min	20 x
Annealing	60°C	2 min	
Elongation	72°C	2 min + 20 sec je Zyklus*	
finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlen	4°C	8	

* Die Elongationsdauer während des ersten der 20 Zyklen beträgt 2 min. Jeder weitere Zyklus wird jeweils um 20 sec verlängert. Der letzte Zyklus dauert dann 8 min und 20 sec.

3.7.2.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei dem beispielsweise DNA, aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld aufgetrennt wird.

Da DNA negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Bei der Gelelektrophorese hängt die Wanderungsgeschwindigkeit neben der Stärke des elektrischen Feldes auch von der Größe der DNA-Moleküle und der Porengröße des aus vernetzten Molekülen bestehenden Trägergels ab, durch welches die Moleküle wandern, um die positive Elektrode zu erreichen. Da sich kleinere DNA-Fragmente schneller durch das Gel bewegen, können DNA-Moleküle mittels einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurde die Agarose (Peqlab, Erlangen) in 1 x TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde die verflüssigte Agarose in die mit einem Kamm versehene Elektrophoresekammer gegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Nach dem Umbau der Kammer für die Elektrophorese, wurde auf das Gel TAE-Puffer gegeben, bis das gesamte Gel gut bedeckt war. Nun erfolgte die Beladung des Gels durch Einpipetieren von je 15 µl Reaktionsansatzes in die vom Kamm gebildeten Geltaschen. Als DNA-Standard wurden 10 µl einer 100 bp DNA-Leiter (Roth, Karlsruhe) aufgetragen. Nach Anlegen der Spannung von 140 V wurden die Reaktionsansätze je nach Größe des Gels für die Dauer von 40-60 min elektrophoretisch aufgetrennt.

3.7.2.5. Färben und Dokumentation des Gels

Um das Ergebnis der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, kann das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Ethidiumbromid bindet an die DNA-Moleküle, indem es sich interkalierend zwischen benachbarte Basenpaare einlagert. Nach der Färbung erkennt man im UV-Licht Banden, die den verschiedenen Größenklassen der DNA-Fragmente entsprechen (Brown, 1996).

Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese für 20-30 Minuten in einer 1%igen Ethidiumbromidlösung (Roth, Karlsruhe) gefärbt, im UV-Illuminator (d = 405)

visualisiert und anschließend mit dem Computerprogramm Multianalyst Version 1.1. (Biorad, München) fotografiert und gespeichert.

3.7.3. PCR

Laut Martin et al. (1995) müssen für jede Probe 32 PCR-Ansätze gemacht werden, um genügend DNA für die Sequenzierung zu erhalten. Diese wurden auf speziellen für die PCR geeigneten 96-Lochplatten (ABgene, Hamburg) angesetzt. Auf eine derartige Platte konnten also drei Proben mit jeweils 32 Ansätzen verbracht werden. Das Temperaturprofil im Thermocycler entsprach dem in Tabelle 3 dargestellten. Nach der PCR wurden die Amplifikate wie unter 3.7.2.4. und 3.7.2.5. erklärt behandelt, jedoch wurde das Gel nicht mehr fotografiert sondern einer DNA-Extraktion (s. 3.8.) unterzogen.

Für die Elektrophorese wurden präparative Kämme verwendet.

3.8. DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

Zur Untersuchung der DNA war es erforderlich, diese aus dem Agarosegel zu extrahieren. Hierfür wurden die DNA-Banden während der Visualisierung auf dem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten.

Für die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieses System beruht ebenfalls auf der Wirkung von Affinitätsäulen, an die DNA gebunden und nach Waschschrinen wieder von dieser eluiert wird.

Hier wurde das QIAquick Gel Extraction Kit Spin-Protokoll (Qiagen, Hilden) verwendet.

Zu einem Volumen Agarosegel wurden drei Volumina eines Puffers hinzugegeben, der das Gel auflöst. Dies erfolgte während einer zehnminütigen Inkubation bei 50°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von einem Volumen 100%-igem Isopropanol ausgefällt. Um die DNA an die Säulenmembran zu binden, wurde diese beladen und 1 min bei 17900 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Wasch-

schritt mit 0,75 ml Waschpuffer durch Zentrifugation bei 17900 x g für 1 min. Nach Dekantieren des Durchflusses wurde die Säule nochmals für 1 min zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt und die DNA mit 50 µl Elutionspuffer bei 17900 x g für 1 min eluiert. Man erhält die DNA in 50 µl Elutionspuffer gelöst.

3.9. Weitere Behandlung der DNA

Um die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurde der Elutionspuffer bei 60°C im Vakuum-Konzentrator (Eppendorf, Hamburg) eingedampft. Die DNA wurde anschließend in 30 µl ultrareinem Wasser (Merck, Darmstadt) gelöst.

3.10. Sequenzierung

Das Sequenzieren (Seqlab GmbH, Göttingen) der Proben erfolgte mit Primer PrP I, PrP 1 und PrP 2. Primer PrP 1 und PrP 2 wurden mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO[®] Version 4.1. (National Biosciences Inc., Plymouth, USA) ausgesucht. Die Synthese der Primer führte die Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg) durch. Die Primersequenzen und -lokalisationen sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4:

Primer	Primerlokalisierung	Primersequenz (5` - 3`)
PrP 1	302 – 324	CCACATGCTTCATGTTGGTT
PrP 2	330 – 349	GTCAGTGGAACAAGCCCAGTAAG

3.11. Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Computerprogramm CHROMAS[®] Version 1.45 (Technelysium Pty Ltd., 1999) editiert. Anschließend erfolgte das Alignment, das mit dem Computerprogramm JELLYFISH[®] Version 1.5 (LabVelocity, San Francisco) durchgeführt wurde. Jede Sequenz wurde aus dem Programm CHROMAS[®] Version 1.45 (Technelysium Pty Ltd., 1999) in das Programm JELLYFISH[®] Version 1.5.(LabVelocity, San Francisco) übernommen und mit der von Martin et al. (1995) publizierten Sequenz des porzinen Prionproteingens (Embl, accession no. L07623) verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Auswahl der Schweine

Für die vorliegende Arbeit konnten Schweine 12 verschiedener Rassen aus verschiedenen Regionen Deutschlands gefunden werden. Insgesamt nahmen 66 Tiere an der Studie teil. Von 62 Tieren wurden Blutproben gewonnen, von den vier Wildschweinen wurden Leberproben als Untersuchungsmaterial verwendet. Die Rasse- und Geschlechtsverteilung sowie das Bundesland, in welchem sich die Betriebe, in denen die Schweine gehalten werden, befinden, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Rasseverteilung der Teilnehmer

Rasse	Geschlecht	Bundesland
Deutsche Landrasse	2 w	Bayern
Deutsches Edelschwein	1 w, 1 m 1 w	Bayern Mecklenburg-Vorpommern
Piértrain	4 w, 7 m	Bayern
Leicoma	3 k. A. 1 w	Schleswig-Holstein Sachsen
Schwäbisch Hällisches	4 w, 4 m	Bayern
Large White	5 w, 1 m	Baden-Württemberg
Duroc	1 w, 3 m	Bayern
Belgische Landrasse	1 w, 1 m	Bayern
Hampshire	9 k. A.	Mecklenburg-Vorpommern
Wildschwein	4 k. A.	Bayern
Meishan	5 w, 2 m	Baden-Württemberg
Bunte Bentheimer	5 w, 1 m	Bayern

w = weiblich, m= männlich, k. A. = keine Angabe

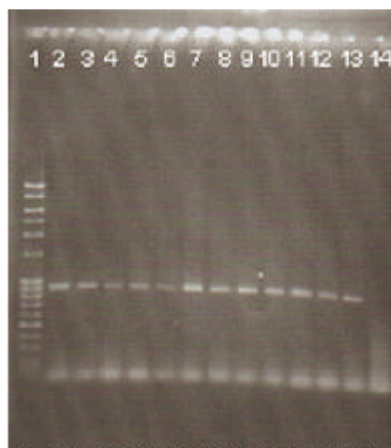
4.2. Amplifizierung des Prionproteingens durch PCR

Aus der PCR resultierte ein Amplifikat der DNA mit einer Größe von 894 bp. Der ORF jeder Sequenz bestand aus 774 Nucleotiden.

Abb.2

Agarosegel (1 %) der Amplifikate aus der PCR. Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit Aqua dest. anstatt mit Proben-DNA eingesetzt.

In den Spuren 2 bis 13 sind die Proben Lc 25 bis 36 (Leicoma) zu sehen. Spur 1 zeigt die 100bp DNA-Leiter und Spur 14 die Negativkontrolle.



- 1 - 100bp DNA-Leiter
- 2 - Lc 25
- 3 - Lc 26
- 4 - Lc 27
- 5 - Lc 28
- 6 - Lc 29
- 7 - Lc 30
- 8 - Lc 31
- 9 - Lc 32
- 10 - Lc 33
- 11 - Lc 34
- 12 - Lc 35
- 13 - Lc 36
- 14 - Negativkontrolle

4.3. Beweis der Einheitlichkeit durch Sequenzanalyse

Das Alignment der gewonnenen Sequenzen zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung aller Sequenzen mit der von Martin veröffentlichten Sequenz des porzinen Prionproteingens (Martin et al., 1995).

5. Diskussion

Bei Schaf, Maus sowie beim Mensch kommen im Prionproteingen Variationen vor, die die Empfänglichkeit für bestimmte Prionkrankheiten beeinflussen bzw. für die Resistenz gegenüber diesen Erkrankungen verantwortlich sind. Bei der Untersuchung der genetischen Variabilität der für die vorliegende Arbeit eingesetzten Schweinerassen konnte eine solche Variabilität im porzinen Prionproteingen nicht festgestellt werden. Die Untersuchung von 11 Schweinerassen ergab eine 100%ige Übereinstimmung der gewonnenen Sequenzen. Beim Sequenzvergleich mit der von Martin et al. (1995) publizierten Sequenz des porzinen Prionproteingens waren ebenfalls alle Sequenzen identisch.

Um dieses zunächst unerwartete Ergebnis zu überprüfen, wurde zusätzlich die Untersuchung mit Proben der genetisch entfernteren Schweinerasse Meishan (chinesisches Maskenschwein) durchgeführt. Die Sequenzanalyse dieser Proben ergab dasselbe Ergebnis wie bei den zunächst untersuchten Schweinerassen: die Sequenzen stimmen zu 100% mit den Sequenzen der anderen Rassen überein. Dies bedeutet, dass von den bisher untersuchten Tierarten das Schwein als einzige Tierart keine Variationen im codierenden Abschnitt des Prionproteingens aufzuweisen scheint.

Bei dem von Wells et al. (2003) in Großbritannien durchgeführten Fütterungsversuch wurden Schweine unterschiedlicher, aber im Vereinigten Königreich gängiger Rassen mit Gehirnmateriale BSE-infizierter Kühe gefüttert. Selbst 7 Jahre später waren weder klinisch noch histopathologisch Hinweise auf eine spongiforme Enzephalopathie zu erkennen. Da auf dem Fütterungsweg keines der Versuchsschweine mit BSE infiziert werden konnte, stellte sich die Frage, ob Schweine im Allgemeinen nicht empfänglich für BSE sind, oder ob dies nur für die in o.g. Versuch verwendeten Schweine gilt,

also ob es möglicherweise Schweinerassen gibt, die aufgrund ihres Genotyps für BSE empfänglich beziehungsweise dagegen resistent sind.

Die vorliegende Arbeit ergab keinerlei Unterschiede in der Sequenz des codierenden Bereichs des Prionproteingens verschiedener Schweinerassen. Daher komme ich zu der Schlussfolgerung, dass der o.g. Fütterungsversuch als allgemeingültig für die Tierart Schwein erachtet werden kann. Das bedeutet, dass das Ergebnis des Fütterungsversuchs nicht nur für die im Fütterungsversuch eingesetzten Schweine gilt, sondern für alle Schweine nach oraler Verabreichung des BSE-Erregers von einer Resistenz gegenüber diesem ausgegangen werden kann.

Wells et al. (2003) führten neben dem oralen auch einen parenteralen Infektionsversuch mit Schweinen durch, bei dem sich sieben Schweine als empfänglich für den BSE-Erreger zeigten und eine spongiforme Enzephalopathie entwickelten. Da dieser Infektionsmodus – den Schweinen wurde erregerhaltiges Material intrazerebral, intravenös und intraperitoneal verabreicht – jedoch extrem unnatürlich war und der orale Inokulationsversuch erfolglos verlief, ist im Feld kaum mit dem Auftreten einer spongi-formen Enzephalopathie (SSE) zu rechnen (<http://www.neurocenter-bern.ch/tse:eshtml>). Dafür spricht auch, dass trotz der bis Anfang 2001 in vielen Ländern noch praktizierten Tiermehlfütterung an Schweine, bisher keine auf dem Fütterungsweg entstandene SSE beobachtet werden konnte (Pohlenz, 2001). Laut Wells hätte es bis heute mehr als 1000 Fälle einer spongi-formen Enzephalopathie beim Schwein geben müssen, wenn diese Tierart ebenso wie das Rind auf alimentärem Weg für den BSE-Erreger empfänglich wäre (Wells et al., 2003). Die Möglichkeit, dass derart viele Krankheitsfälle mit anderen Krankheiten, die ebenfalls neurologische Symptome hervorrufen, wie z. B. Tollwut, Aujeszkysche Krankheit oder Teschen-Talfan-Disease, verwechselt, oder gar von Tierhaltern beziehungsweise Tierärzten übersehen worden sind, wird ebenfalls als extrem unwahrscheinlich eingestuft, zumal die klinischen Symptome einer spongi-formen Enzephalopathie eindeutig sind (Wells et al., 2003) und diese als Differentialdiagnosen zu nennenden Erkrankungen durch neuropathologische Untersuchungen von degenerativen Krankheiten leicht abzugrenzen sind (Pohlenz, 2001).

Es wird jedoch die Möglichkeit diskutiert, ob die Infektion bei Schweinen auf oralem Weg zwar stattgefunden hat, jedoch keine klinischen oder pathologischen Symptome erzeugte (Wells et al., 2003). Dies würde bedeuten, dass Infektiosität im Schwein vorhanden ist. Der Verdacht, Infektiosität könnte in verschiedenen „resistenten“ Spezies, wie z. B. dem Schwein, bestehen, wird durch Versuche mit Hamstern und Mäusen erhärtet. Mäuse, die mit Hamster-Scrapie infiziert wurden, entwickelten keine klinischen Symptome. Bei Übertragung von Gehirn- und Milzgewebe dieser Mäuse auf Hamster zeigten letztere jedoch neurologische Symptome (Race und Chesebro, 1998).

Falls Schweine sich tatsächlich auf oralem Weg mit dem BSE-Agens infiziert haben sollten, so wäre das Agens rezykliert und amplifiziert worden (Wells et al., 2003). Daraus hätte eigentlich, wie bei der Entstehung der BSE-Epidemie, eine SSE resultieren müssen. Da dies bisher nicht der Fall ist, kann die Hypothese einer inapparenten BSE-Infektion bei Schweinen als nicht zutreffend bezeichnet werden (Wells et al., 2003).

Da BSE nach heutigem Wissensstand keine natürlich SSE verursacht und der Fütterungsversuch von Wells et al. (2003) ebenfalls erfolglos war, bedeutet die im Rahmen dieser Studie festgestellte genetische Homogenität des Prionproteingens der bedeutendsten deutschen Schweinerassen und anderen nichtdeutschen Rassen wie Large White, Hampshire, Belgische Landrasse und Meishan, dass die Übertragung von BSE auf Schweine allgemein höchst unwahrscheinlich ist. Daher hat die genetische Homogenität des porzinen Prionproteingens große Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit und den Verbraucherschutz. Aufgrund des Ergebnisses der vorliegenden Arbeit kann folglich gesagt werden, dass das Risiko für den Mensch, durch den Verzehr von Schweinefleischprodukten mit dem BSE-Erreger in Kontakt zu kommen und sich mit diesem zu infizieren, sehr gering war und ist. Die Sorge der Verbraucher, dass nicht nur der Verzehr von Rindfleisch und Rindfleischprodukten, sondern auch der Genuss von Lebensmittel, die Gewebe von Schweinen enthalten, eine potentielle Gefahr der Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen darstellen könnte, kann demnach als unbegründet bezeichnet werden.

6. Zusammenfassung

Die Fragestellung dieser Studie zur Untersuchung der genetischen Variabilität des porzinen Prionproteingens war zum einen, ob Variationen im Prionproteingens des Schweins vorliegen. Zum anderen sollte weiterhin beurteilt werden, ob das Ergebnis des in Großbritannien von Wells et al. (2003) durchgeführten Fütterungsversuchs als allgemeingültig für die Tierart Schwein betrachtet werden kann und wie das Risiko einer Übertragung des BSE-Erregers vom Schwein auf den Mensch einzuschätzen ist.

Diese Studie schloss 66 Schweine 12 verschiedener Rassen ein. Neben den bekanntesten deutschen Rassen (Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein, Leicoma, Piétrain, Duroc, Schwäbisch Hällisches Schwein, Bunte Bentheimer) wurden auch Wildschweine, zwei englische Schweinerassen – Hampshire und Large White –, die Belgische Landrasse und das Meishan Schwein (chinesisches Maskenschwein) in diese Untersuchung miteinbezogen.

Als Untersuchungsmaterial wurden Blutproben verschiedener reinrassiger Schweine aus verschiedenen Gebieten Deutschlands verwendet. Bei den Wildschweinen kamen für die Untersuchung Leberproben zum Einsatz.

Aus den Blut- und Leberproben wurde DNA isoliert und diese dann mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) vervielfältigt. Die Primer für die PCR konnten der Publikation von Martin et al. (1995) entnommen werden. Die Primer für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO[®] Version 4.1. ausgesucht.

Es wurde der codierende Abschnitt des porzinen PrP-Gens mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach Gelelektrophorese aus 1%igem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt und schließlich sequenziert.

Die gewonnenen Sequenzen wurden mit der publizierten Sequenz (Martin et al., 1995) verglichen. Alle Sequenzen waren identisch und stimmten mit der von Martin et al. publizierten Sequenz überein.

Bei den für diese Studie untersuchten Schweinerassen liegt folglich keine genetische Variabilität des Prionproteingens vor. Das porcine Prionproteingens ist im Gegensatz zum ovinen, murinen und humanen Prionproteingens offensichtlich homogen.

7. Summary

Ortrun Lipp: Study on the genetic variability of the porcine prion protein gene

The aim of the study was to examine a possible variation of the prion protein gene of various pig breeds. Genetic variability of the prion protein gene in sheep corresponds to distinct susceptibilities of the various genotypes.

Limited inoculation experiments in pigs revealed a general susceptibility of pigs after intracerebral but not after oral inoculation.

Sixty six pigs from twelve different breeds were examined. These included the most common breeds in Germany (Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein, Leicoma, Pietrain, Duroc, Schwäbisch Hällisches Schwein, Bunte Bentheimer), as well as wild boars, two English breeds – Hampshire and Large White –, Belgische Landrasse and Chinese Meishan.

Blood samples were used for analysis, the wild boars were analysed by using liver samples.

DNA was isolated from the blood and liver samples and amplified by PCR (polymerase chain reaction). Primers for PCR were taken from the publication by Martin et al. (1995), and sequencing primers were designed with the help of the program OLIGO® version 4.1.

The coding region of the porcine prionprotein gene was amplified, purified and directly sequenced.

The sequences obtained were aligned to the published sequence (Martin et al., 1995), all sequences were found to be identical to the published sequence.

Among the examined pig breeds no genetic variability of the porcine prion protein gene was observed. In contrast to the ovine, murine and human prion protein gene the porcine prion protein gene appears homogeneous.

8. Literaturverzeichnis

- Aiken, J.M., Marsh, R.F. (1990):
The Search for Scrapie Agent Nucleic Acid. *Microbiological Reviews*. 54, 242-246.
- Akowitz, A., Sklaviadis, T., Manuelidis, E.E., Manuelidis, L. (1990):
Nuclease-resistant polyadenylated RNAs of significant size are detected by PCR in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Microbial Pathogenesis*. 9, 33-45.
- Arnold, M. Meek, C., Webb, C.R., Hoinville (2002):
Assessing the efficacy of a ram-genotyping programme to reduce susceptibility to scrapie in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*. 56, 227-249.
- Bahmanyar, S., Williams, E.S., Johnson, F.B., Young, S., Gadjusek, D.C. (1985):
Amyloid Plaques in Spongiform Encephalopathy of Mule Deer. *Journal of Comparative Pathology*. 95, 1-5.
- Baker, H., Ridley, R.M., Wells, G.A.H. (1993):
Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Veterinary Record*. 132, 403-406.
- Barlow, R., Middleton, D. (1990):
Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Veterinary Record* 126. 111-112.
- Beekes, M, Baldauf, E., Diringer, H. (1996):
Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Journal of General Virology* 77. 1925-1934.
- Belt, P.B.G.M., Muileman, I.H., Schreuder, B.E.C., Bos-de Ruijter, J.M, Gielkens, A.L.J., Smits, M.A. (1995):
Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 76, 509-517.
- Bossers, A., DE Vries, R., Smits, M.A. (2000):
Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *Journal of Virology*. 74, 1407-1414, 2000.

- Braig, H.R., Diringer, H. (1985):
Scrapie: a concept of a virus-induced amyloidosis of the brain. *EMBO Journal*. 4, 2309-2312.
- Bratberg, B., Ueland, K., Wells, G.A.H. (1995):
Feline spongiform encephalopathy in a cat in Norway. *The Veterinary Record*. 136, 444.
- Brotherston, J.G., Renwick, C.C., Stamp, J.T., Zlotnik, I., Pattison, I.H. (1968):
Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 78, 7-19.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. (1997a):
The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*. 390, 684-687.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., Kretzschmar, H. (1997b):
Prion Protein-deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity. *Experimental Neurology*. 146, 104-112.
- Brown, P., Galvez, S., Goldfarb, L.G., Nieto, A., Cartier, L., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C. (1992):
Familial Creutzfeld-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *Journal of Neurological Science*. 112, 65-67.
- Brown, T.A. (1996):
Gentechnologie für Einsteiger, 3. Auflage, Spektrumverlag.
- Bruce, M.E., McConnell, I., Fraser, H., Dickinson, A.G. (1991):
The disease characteristics of different strains of scrapie in *inbred* congenic mouse lines: implications for the agent and host control of pathogenesis. *Journal of General Virology*. 72, 595-603.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardie, 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.
- Budka, H., Hainfellner, J.A., Almer, G., Brocke, T., Windl, O., Kretzschmar, H.A., Hill, A., Collinge, J. (1997):
A New Austrian Family with Fatal Familial Insomnia: Brain Pathology without Detectable PrP^{res}. *Brain Pathology*. 7, 1267.
- Budka, H. (1998):
Iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit. *Wiener klinische Wochenschrift*. 110, 451-454.

- Budka, H. (2001a):
Portrait der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD). In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Budka, H. (2001b):
Portrait des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992):
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 356, 577-582.
- 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, 1339-1347.
- Buschmann, A., Groschup, M. (1998):
Übertragung der spongiformen Enzephalopathien unter natürlichen und experimentellen Bedingungen. In: Braun, U. BSE und andere spongiforme Enzephalopathien, 1. Auflage, Parey Verlag.
- 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. *Molecular and Cellular Biology*. 8, 5528-5540.
- Chapman, J., Ben-Israel, J., Goldhammer, Y., Korczyn, A.D. (1994):
The risk of developing Creutzfeld-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. *Neurology*. 44, 1683-1686.
- Cloucard, C., Beaudry, P., Elsen, J.M., Milan, D., Dussaucy, M., Bounneau, C., Schelcher, F., Chatelain, J., Launay, J.M., Laplanche, J.L. (1991):
Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 76, 2097-2101.
- Collinge, J., Palmer, M.S., Dryden, A.J. (1991):
Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeld-Jakob disease. *Lancet*. 337, 1441-1442.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C.L., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., Jefferys, J.G.R. (1994):
Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 370, 295-297.
- Creutzfeld, H.G. (1920):
Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift über die gesamte neurologische Psychiatrie*. 57, 1-18.

- Dahme, E., Schmahl, W. (1999):
Nervensystem. In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5.Auflage, Ferdinand Enke Verlag.
- Dahms, S., Hörnlimann, B., Wilesmith, J. (2001):
Die Ursache der BSE-Epidemie. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Dalsgaard, N.J. Prion Diseases. An Overview. *Apmis*. 110, 3-13, 2002.
- Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J. (1990a):
Preliminary evidence of the experimental transmissibility of bovine spongiform encephalopathy to cattle. *Veterinary Record*. 126, 112-113.
- Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J., Scott, A.C. (1990b):
Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *The Veterinary Record*. 127, 338.
- Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J., Scott, A.C. (1991):
Transmission studies of BSE in cattle, pigs and domestic fowl. In: Bradley, R. et al. (eds). *Subacute spongiform encephalopathies*. Commission of the EC. Kluwer Academic, Dordrecht, NL. 1991, pp. 25.
- Dawson, M., Hoinville, L.J., Hosie, B.D., Hunter, N. (1998):
Guidance of the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *The Veterinary Record*. 142, 623-625.
- DeArmond, S.J., Yang, S. L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D., Prusiner S.B. (1993):
Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90, 6449-6453.
- Denny, G.O., Wilesmith, J.W., Clements, R.A., Hueston, W.D. (1992):
Bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland : epidemiological observations 1988-1990. *The Veterinary record*. 130, 113-116.
- Detwiler, L. (2001):
Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie). In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Dickinson, A.G., Stamp, J.T., Renwick, C.C. (1974):
Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 84, 19-25.
- Diringer, H., Özel, M. (1995):
Übertragbare spongiforme Enzephalopathien – wodurch werden sie verursacht? *Spektrum der Wissenschaft*. 52-54.

- Diringer, H., Beekes, M., Özel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., Ironside, J.W. (1997):
Highly Infectious Purified Preparations of Disease-Specific Amyloid of Transmissible Spongiform Encephalopathies Are Not Devoid of Nucleic Acids of Viral Size. *Intervirology*. 40, 238-246.
- Doherr, M.G. Hunter, N. (2001):
Die Scrapie-Bekämpfung: international empfohlene Maßnahmen. In: Hörnli-mann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Done, J.T. (1990):
Spongiform encephalopathy in pigs. *The Veterinary Record*. 127, 484.
- Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Ferguson, N.M. (1997):
Analysis of the bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study : evidence for direct maternal transmission. *Applied Statistics*. 46, 321-344.
- Dormont, D. (2002):
Prions, BSE and Food. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 181-189.
- Drögemüller, C., Leeb, T., Distl, O. (2001):
PrP genotype frequencies in german breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *The Veterinary Record*. 149, 349-352.
- Foster, J., Hpoie, J., Fraser, H. (1993):
Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record*. 133, 339-341.
- Fraser, H., McConnell, I., Wells, G.A.H., Dawson, M. (1988):
Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Veterinary Record*. 123, 472.
- Gajdusek, D.C., Zigas V. (1957):
Degenerative Disease Of The Central Nervous System In New Guinea. *The New England Journal of Medicine*. 257, 974-978.
- Gajdusek, D.C. (1977):
Unconventional Viruses and the Origin and Disappearance of Kuru. *Science*. 197, 943-960.
- Goldfarb, L.G., Brown, P., Mitrova, E., Cervenakova, L., Goldin, L., Korc, A.D., Chapman, J., Galvez, S., Cartier, L., Rubenstein, R. (1991):
Creutzfeld-Jakob disease associated with the PRNP codon 200 Lys mutation: an analysis of 45 families. *European Journal of Epidemiology*. 7, 477-486.

Goldfarb, L.G., Petersen, R.B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A.C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W.W., Haltia, M., Wills, P.R., Hauw, J.J., McKeever, P.E., Monari, L., Schrank, B., Swergold, G.D., Autilio-Gambetti, L., Gajdusek, D.C., Lugaresi, E., Gambetti, P. (1992):

Fatal Familial Insomnia and Familial Creutzfeldt-Jakob Disease: Disease Phenotype Determined by a DNA Polymorphism. *Science*. 258, 806-808.

Goldgaber, D., Goldfarb, L.G., Brown, P., Asher, D.M., Brown, W.T., Lin, S., Teener, J.W., Feinstone, S.M., Rubenstein, R., Kascsak, R.J., Boellaard, J.W., Gajdusek, D.C. (1989):

Mutations in familial Creutzfeld-Jakob Disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's Syndrome. *Experimental Neurology*. 106, 204-206.

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. *Journal of general Virology*. 72, 2411-2417.

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. *Journal of General Virology*. 75, 989-995.

Groschup, M.H., Kuczius, T. (2001):

Die TSE-Erregerstämme : In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.

Gruffydd-Jones, T.J., Galloway, P.E., Pearson, G.R. (1991):

Feline spongiform encephalopathy. *Journal of Small Animal Practice*. 33, 471-476.

Hadlow, W.J. (1961):

The Pathology of Experimental Scrapie in the Dairy Goat. *Research in Veterinary Science*. 2, 289-314.

Hartsough, G.R., Burger, D. (1965):

Encephalopathy of mink. Epizootiologic and clinical observations. *Journal of Infectious Diseases*. 115, 387-392.

Heim, D. (1998):

Bekämpfungs- und Vorsorgemaßnahmen gegen die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). In: Braun, U. BSE und andere spongiforme Enzephalopathien, 1. Auflage, Parey Verlag.

Heinritzi, K. Tischvorlagen für die Propädeutikvorlesung WS 1999/2000

Herms, J.W. (2001):

Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrP^C als kupferbindendes Protein an der Synapse. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.

- Herwicker-Trautwein (2001):
Portrait der übertragbaren spongiformen Hirndegeneration der Katzen. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C.L., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., Lantos, P. (1997):
The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*. 389, 448-450.
- Hörnlimann, B., Guidon, D., Griot, C. (1994):
Risikoeinschätzung für die Einschleppung von BSE. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 101, 295-298.
- Hörnlimann, B. (2001a):
Portrait der BSE beim Rind. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Hörnlimann, B. (2001b):
Portrait der Kuru. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Hsiao, K., Prusiner, S.B. (1990):
Inherited human prion diseases. *Neurology*. 40, 1820-1827.
- Hunter, N., Foster, J.D., Dickinson, A.G., Hope, J. (1989):
Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the *Sip* gene in Cheviot sheep. *The Veterinary Record*. 124, 364-366.
- Hunter, N., Goldmann, W., Benson, G., Foster, J.D., Hope, J. (1993):
Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *Journal of general Virology*. 74, 1025-1031.
- 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. *Archives of Virology*. 141, 809-824.
- Hunter, N., Cairns, D., Foster, J.D., Smith, G., Goldmann, W., Donnelly, K. (1997):
Is scrapie solely a genetic disease? *Nature*. 386, 137.
- Hunter, N. (2001):
Der PrP-Genotyp als Marker für Scrapie-Empfänglichkeit. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Ikeda, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Muramatsu, Y., Grathwohl, D.K.U., Shingawa, M. (1995):
Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *Journal of General Virology*. 76, 2577-2581.

- Jakob, A.M. (1921):
Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befund (Spastische Pseudosklerose – Enzephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Deutsche Zeitung für Nervenheilkunde. 132-146.
- Kaaden, O.-R. (2002):
Viruskrankheiten der Tiere. In: Rolle / Mayr Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage, Ferdinand Enke Verlag.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C, James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1997):
Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94, 10069-10074.
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S.B., Riesner, D. (1992):
Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. Journal of General Virology. 73, 1025-1029.
- Kingsbury, D.T., Kasper, K.C., Stites, D.P., Watson, J.D., Hogan, R.N., Prusiner, S.B. (1983):
Genetic control of scrapie and Creutzfeld-Jakob Disease in mice. The Journal of Immunology. 131, 491-496.
- Kirkwood, J. K., Cunningham, A. A. (1994):
Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. The Veterinary Record. 135, 296-303.
- Kompoliti, K., Goetz, C.G., Gajdusek, D.C., Cubo, E. (1999):
Movement Disorders in Kuru. Movement Disorders. 14, 800-804.
- Kretzschmar, H. (2001):
Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Laplanche, J.L., Chatelain, J., Westaway, D., Thomans, S., Dussaucy, M., Brugere-Picoux, J., Launay, J.M. (1993):
PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics. 15, 30-37.
- Lasmézas, C., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D. (1996):
BSE transmission to macaques. Nature. 381, 743-744.

-
- Lasmézas, C., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., Dormont, D. (1997):
Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein. *Science*. 275, 402-405.
- Leggett, M.M., Dukes, J., Pirie, H.M. (1990):
A spongiform encephalopathy in a cat. *The Veterinary Record*. 127, 586-588.
- Lehmann, S., Milhavet, O., Mangé, A. (1999):
Trafficking of the cellular isoform of the prion protein *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 53, 39-46.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P. (1986):
Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration in thalamic nuclei. *The New England Journal of Medicine*. 315, 997-1003.
- Manuelidis, L., Sklaviadis, T., Akowitz, A., Fritch, W. (1995):
Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeld-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 5124-5128.
- Marsh, R.F., Bessen, R.A. (1993):
Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Developments in Biological Standardization*. 80, 111-118.
- Martin, T., Hughes, S., Hughes, K., Dawson, M. (1995):
Direct Sequencing of PCR amplified pig PrP genes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1270, 211-214.
- McArthur, A.J., Gillette, M.U., Prosser, R.A. (1991):
Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Research*. 565, 158-161.
- MacDiarmid, S.C. (1996):
Scrapie: the risk of its introduction and effects on trade. *Australian Veterinary Journal*. 73, 5, 161-164.
- Medori, R., Montagna, P., Tritschler, H.J., LeBlanc, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Lugaresi, E., Gambetti, P. (1992a):
Fatal familial insomnia: a second kindred with mutations of prion protein gene at codon 178. *Neurology*. 42, 669-670.
- Medori, R., Tritschler, H.J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H.S., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P., Tinuper, P., Avoni, P., Mochi, M., Baruzzi, A., Hauw, J.J., Ott, J., Lugaresi, E., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P. (1992b):
Fatal Familial Insomnia, A Prion Disease With A Mutation At Codon 178 Of The Prion Protein Gene. *The New England Journal of Medicine*. 326, 7, 444-449.

- Meiner, Z., Gabizon, R., Prusiner, S.B. (1997):
Familial Creutzfeld-Jakob disease. Codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine*. 76, 227-237.
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmist, B., Gilles, K., Mirinda, C., Groth, D., Prusiner, S.B., Riesner, D. (1991):
Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *Journal of General Virology*. 72, 37-49.
- Möstl, K., Möstl, E. (1998):
Mögliche Ursachen der spongiformen Enzephalopathien. In: Ueli Braun BSE und andere spongiforme Enzephalopathien, 1. Auflage, Parey Verlag
- Monari, L., Chen, S.G., Brown, P., Parchi, P., Petersen, R.B., Mikol, J., Gray, F., Cortelli, P., Montagna, P., Ghetti, B., Goldfarb, L.G., Gajdusek, D.C., Lugaresi, E., Gambetti, P., Autilio-gambetti, L. (1994):
Fatal familial insomnia and familial Creutzfeld-Jakob disease: Different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 2839-2842.
- Montagna, P., Cortelli, P., Avoni, P., Tinuper, P., Plazzi, G., Gallassi, R., Portaluppi, F., Julien, J., Vital, C., Delisie, M.B., Gambetti, P., Lugaresi, E. (1998):
Clinical Features of Fatal Familial Insomnia: Phenotypic Variability in Relation to a Polymorphism at Codon 129 of the Prion Protein Gene. *Brain Pathology*. 8, 515-520.
- Moore, R.C., Hope, J., McBride, P.A., McConnell, I., Selfridge, J., Melton, D.W., Manson, J.C. (1998):
Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nature Genetics*. 18, 118-125, 1998.
- Neibergs, H.L., Ryan, A.M., Womack, J.E., Spooner, R.L., Williams, J.L. (1994):
Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle. *Animal Genetics*. 25, 313-317.
- Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, J.T., Collinge, J. (1991):
Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeld-Jakob disease. *Nature*. 352, 340-342.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fleztterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1993):
Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90, 10962-10966.
- Parchi, P., Petersen, R.B., Chen, S.G., Autilio-Gambetti, L., Capellari, S., Monari, L., Cortelli, P., Montagna, P., Lugaresi, E., Gambetti, P. (1998):
Molecular Pathology of Fatal Familial Insomnia. *Brain Pathology*. 8, 539-548.

-
- Pattison, I.H., Hoare, M.N., Jebbett, J.N., Watson, W.A. (1972):
Spread of Scrapie to Sheep and Goats by Oral Dosing with Foetal Membranes from Scrapie-affected Sheep. *Veterinary Record*. 90, 465-468.
- Pohlenz, J. (2001):
Portrait der experimentellen Prionkrankheit beim Schwein. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Prusiner, S.B. (1982):
Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 216, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1991):
Molecular biology of prion diseases. *Science*. 252, 1515-1522, 1991
- Prusiner, S.B. (1998):
Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 13363-13383. Nobel Lecture.
- Prusiner, S.B. (2001):
Die Geschichte der Erforschung von Prionen. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Race, R., Chesebro, B. (1988):
Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature*. 392, 770.
- Race, R.E., Grahamn, K., Ernst, D., Caughey, B., Chesbro, B. (1990):
Analysis of linkage between scrapie incubation period and the prion protein gene in mice. *Journal of general Virology*. 71, 493-497.
- Ridley, R.M., Baker, H.F. (1995)
The myth of maternal transmission of spongiform encephalopath. *British Medical Journal*. 311, 1071-1075.
- Riesner, D. (2001):
Die verschiedenen Erregerhypothesen In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Robinson, M., Hadlow, W.J., Puff, T.P., Wells, G.A.H., Dawson, M., Marsh, R.F., Gorham, J.R. (1994):
Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*. 75, 2151-2155.
- Ryder, S.J., Hawkins, S.A.C., Dawson, M., Wells, G.A.H. (2000):
The Neuropathology of Experimental Bovine Spongiform Encephalopathy in the Pig. *Journal of Comparative Pathology*. 122, 131-143.

-
- Sabuncu, E., Petit, S., Le Dur, A., Lai, T.L., Vilotte, J.L., Laude, H., Vilette, D. (2003):
PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *Journal of Virology*. 77, 2696-2700.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1998):
Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nature Medicine*. 4, 1157-1165,.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):
Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schätzl, H.M. (2001):
Die Phylogenetik des PrP. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Schoon, H. A., Brunckhorst, D., Pohlenz, J. (1991):
Spongiforme Enzephalopathie beim Rothalsstrauss (*Struthio camelus*) - ein kasuistischer Beitrag. *Tierärztliche Praxis*. 19, 263-265.
- Schubert, R., Flachowsky, G. (1994):
Futterstoffe tierischer Herkunft. In: Abel, H., Flachowsky, G., Jeroch, H., Molnar, S. *Nutztierernährung*, 1. Auflage, Fischer Verlag.
- Stöcklin, W.H. (1967):
Kuru-the Laughing Death. Medizinische und ethnologische Aspekte einer rätselhaften Krankheit im Hochland Neuguineas. *Acta Tropica* 24, 3, 193-224.
- Sturzenegger, M. (2001):
Die Klinik der Prionkrankheit des Menschen. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung; 9. überarbeitete Auflage, Verlag M. & H. Schaper Alfeld-Hannover, (1999).
- Taylor, D. (1989):
Bovine spongiform encephalopathy and human health. *Veterinary Record*. 125, 413-415.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmind, S.J., Prusiner, S.B. (1995):
Prion Propagation in Mice Expressing Human and Chimeric PrP Transgenes Implicates the Interaction of Cellular PrP with another Protein. *Cell*. 83, 79-90.

-
- 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 Propagation Prion Diversity. *Science*. 274, 2079-2086.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., Manson, J.C. (1996):
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 380, 639-642.
- Tyler, K.L. (2003):
Creutzfeld-Jakob Disease. *The New England Journal of Medicine*. 348, 8, 681-682.
- Weissmann, C. (1991):
A unified theory of prion propagation. *Nature*. 352, 679-683.
- Wells, G., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R. (1987):
A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *The Veterinary Record*. 121, 419-420.
- Wells, G.A., McGill, I.S. (1992):
Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Research in Veterinary Science*. 53, 1-10.
- Wells, G., Dawson, M., Hawkins, S.A.C., Green, R.B., Dexter, I., Francis, M.E., Simmons, M.M., Austin, A.R., Horgan, M.W. (1994):
Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*. 135, 40-41.
- Wells, G., Hawkins, S.A.C., Austin, A.R., Ryder, S.J., Done, S.H., Green, R.B., Dexter, I., Dawson, M., Kimberlin, R. H. (2003):
Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Journal of General Virology*. 84, 1021-1031.
- Westaway, D., Goodman, P.A., Mirenda, C.A., McKinley, M.P., Carlson, G.A., Prusiner, S.B. (1987):
Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*. 51, 651-662.
- Westaway, D., Zuliani, V., Copper, C.M., DaCosta, M., Neumann, S., Jenny, A.L., Detwiler, L., Prusiner, S.B. (1994):
Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes and Development*. 8, 959-969.
- Wijeratne, W.V.S., Curnow, R.N. (1990):
A study of the inheritance of susceptibility to bovine spongiform encephalopathy. *The Veterinary Record*. 126, 5-8.

-
- Wilesmith, J.W., Wells, G.A.H., Cranwell, M.P., Ryan, J.V.B.M. (1988):
Bovine spongiforme encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary record.* 123, 638-644.
- Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Atkinson, M.J. (1991):
Bovine spongiforme encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The Veterinary Record.* 128, 199-203.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Poochiari, Hofman, A., Smith, P.G. (1996):
A new variant of Creutzfeld-Jakob Disease in the UK- *Lancet.* 347, 921-925.
- Will, R.G.(2001):
Portrait der neune Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Williams, E.S., Young, S. (1980):
Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Disease.* 16, 89-98.
- Williams, E.S., Young, S. (1982):
Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *Journal of Wildlife Diseases.* 18, 465-471.
- Williams, E. S. (2001):
Portrait der chronisch zehrenden Krankheit der Hirschartigen. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Wyatt, J.M., Pearson, G.R., Smerdon, T.N., Gruffydd-Jones, T.J., Wells, G.A.H., (1990):
Spongiform encephalopathy in a cat. *The Veterinary Record.* 126, 513.
- Wyatt, J.M., Pearson, G.R., Smerdon, T.N., Gruffydd-Jones, T.J., Wells, G.A.H., Wilesmith, J.W. (1991):
Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *The Veterinary Record.* 129, 233-236.
- Yamamoto, H., Ohsawa, H., Kato, Y., Nokura, K., Hashizume, Y. (1997):
Clinicopathological findings in a male case with Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease. *Brain Pathology.* 7, 1268.
- Zerr, I., Poser, S. (2001):
Die Epidemiologie und Risikofaktoren der Creutzfeld-Jakob-Krankheit. In: Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. *Prionen und Prionerkrankungen*, 1. Auflage, de Gruyter Verlag.
- Zerr, I., Poser, S. (2002):
Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. *APMIS.* 110, 88-98.

9. Anhang

9.1. Verzeichnis der verwendeten Geräte

- Thermomixer compact (Fa. Eppendorf)
- Zentrifugen (Z 233M, Fa. Hermle; 2K15, Fa. Sigma; Minispin, Fa. Eppendorf; Fa. Heraeus instruments)
- Thermocycler (GeneAmp PCRSystem 9700, Fa. PerkinElmer und Ciclone 25, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Gelkammern (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Powersupply (PowerPac 300 bzw. 3000, Fa. Biorad)
- UV-Illuminator (GelDoc 1000, Fa. Biorad und MakroVue, Fa. Pharmacia)
- Waage (Adventurer tm, Fa. Ohaus)
- Vakuum-Konzentrator (Eppendorf Concentrator 5301, Fa. Eppendorf)
- Photometer (Smart Spec TM3000, Fa. Biorad)

9.2. Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer

- Biocoll Separating Solution (Fa. Biochrom AG)
- Ethanol 100% (Fa. Riedel de Häen)
- Reddymix (Fa. Abgene)
- Agarose (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Ultrapur Wasser (Fa. Merck, Darmstadt)
- Isopropanol 100% (Fa. Sigma Chemical)
- Ethidiumbromidlösung 1% (Fa. Roth)
 - 25µl Ethidiumbromidlösung auf 500 ml Aqua dest.

- TAE-Puffer
 - 50x Stocklösung
 - 242g TRIS (Fa. Roth)
 - 57,1 ml Essigsäure 100% (Fa. Roth)
 - 37,2g Na₂EDTA₂H₂O (Fa. Roth)
 - ad. 1l Aqua dest
 - Mit Natronlauge bzw. Salzsäure (Fa. Merck) auf pH 8,5 einstellen und autoklavieren.
 - 100 ml Stocklösung auf 5 l Aqua dest

9.3. Verzeichnis der verwendeten Materialien

- Sterican[®] - Einwegkanülen (Fa. Braun, Melsungen)
- K⁺ - EDTA-Blutröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
- 15 ml Falcons (Fa. Nunc)
- 96-Lochplatten für PCR (Fa. Abgene)

9.4. Verzeichnis der verwendeten Programme

- Oligo, Version 4.1 (National Biosciences)
- Multianalyst, Version 1.1 (Fa. Biorad)
- Chromas, Version 1.45 (Conor McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Gold coast Campus, Southport, Queensland, Australia)
- Jellyfish, Version 1.5 (A Labvelocity Product)

9.5. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
°C	Grad Celsius
CJD	Creutzfeld-Jakob-Disease (engl.), Creutzfeld-Jakob-Krankheit
CWD	Chronic Wasting disease (engl.) Chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen
d	delta
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und Mitarbeiter/innen
EU	Europäische Union
fCJD	familiäre Creutzfeld-Jakob-Krankheit
FSE	feline spongiforme Enzephalopathie
FFI	Fatal Familiar Insomnia (engl.), Letale Familiäre Schlaflosigkeit
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
i. c.	intrazerebral
iCJD	iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
k. A.	keine Angabe
kD	Kilodalton
m	männlich
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
nvCJD	neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit
o. ä.	oder ähnliches

o. g.	oben genannt
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
pA	prolonged incubation allele
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction (engl.) Polymerase-Ketten-Reaktion
Prion	proteinaceous infectious particle
p. i.	post inoculationem
Prnp	Prionproteingen beim Tier
PRNP	Prionproteingen beim Menschen
Prnp ^{0/0} – Maus	Prnp-Knock-out-Maus, Prnp-Null-Maus
PrP	Prionprotein
PrP ^c	zelluläres (cellular) Prionprotein
PrP ^{Sc}	infektiöse Isoform des Prionproteins (Sc = Scrapie)
PrP-Gen	Prionproteingen
RNA	Ribonukleinsäure
sA	short incubation allele
sCJD	sporadische Creutzfeld-Jakob-Krankheit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sinc-Gen	Scrapie-incubation-Gen
Sip-Gen	scrapie-incubation-period-Gen
SOD	Superoxiddismutase
SSBP/1	Scrapie sheep brain pool 1
SSE	Suide Spongiforme Enzephalopathie
TME	transmissible mink encephalopathy (engl.); übertragbare Hirndegeneration der Nerze
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
V	Volt
w	weiblich
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Tuyen für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die Bereitstellung der Laborräume und Materialien und seine stets gewährte Unterstützung.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Karl Heinritzi und Dr. Matthias Ritzmann, die mich beim Auffinden der Schweinerassen unterstützten.

Großen Dank schulde ich Marion Kixmüller für die Entnahme aller Blutproben und die hervorragende und kollegiale Zusammenarbeit. Ihre tatkräftige Unterstützung und enorme Hilfsbereitschaft trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentralinstituts des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Niemeyer vom Schweinegesundheitsdienst, der mir bei der Suche nach Schweinerassen behilflich war, bei Dana Wenzel, die mir im Labor stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand und bei Claudia Memel für die Aufreinigung der Leberproben.

Beim Prionforschungsverbund Bayern möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit ganz herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen teilnehmenden Züchtern, die durch ihr gezeigtes Interesse diese Studie überhaupt ermöglichten.

Julia Franke möchte ich für den stetigen Zuspruch während der Dissertationsanfertigung danken.

Julia Schwarzer danke ich für das Korrekturlesen und die Verbesserungsvorschläge.

Meinen Eltern, die mich seit Beginn des Studiums und während der Doktorarbeit zu jeder Zeit unterstützt haben, möchte ich ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein persönlicher Dank gilt Patrick Rössler für seine Geduld und den gewährten Rückhalt sowohl während des Studiums als auch in der Zeit der Dissertationsanfertigung.

Lebenslauf

Name: Ortrun Margarete Lipp

Geburtstag: 27. Juli 1976

Geburtsort: Ellwangen a. d. Jagst

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Manfred Lipp,
Elke Lipp, geb. Taegener

Schulbildung: 1983 – 1987 Grundschule Rottenacker
1987 – 1990 Franz-von-Sales-Realschule
Obermarchtal
1990 – 1996 Theodor-Heuss-Gymnasium
Mühlacker; abgeschlossen mit der
Allgemeinen Hochschulreife am
25. Juni 1996

Akademische Ausbildung: 1996 – 2001 Studium der Veterinärmedizin an der
tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilian-Universität München;
abgeschlossen mit dem dritten
Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
am 19. Dezember 2001

Approbation als Tierärztin: 28. Januar 2002

Beginn der Dissertation: April 2002