

Aus dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN)
Dummerstorf

und dem Institut für Nutztierforschung und Technologie der Agrar- und
Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

„Vergleichende Analyse der TSE-assoziierten Genexpression in
ausgewählten Geweben von Tieren mit unterschiedlicher genetischer
Prädisposition für die Ausprägung von Scrapie beim Schaf“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor agriculturae (Dr. agr.)
an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0112-3

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr. Katrin Komolka
geb. am 21.02.1978 in Hoyerswerda
aus Rostock

Rostock 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Schwerin

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Schellander

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

3. Gutachter: Prof. Dr. M. Groschup

Friedrich-Löffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Riems

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Rostock, den 11.10.2008

Katrin Komolka

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
A Einleitung	1
B Literatur	3
1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathie	3
1.1 TSE-Erkrankungen des Menschen	3
1.2 TSE-Erkrankungen der Tiere	4
1.2.1 TSE beim landwirtschaftlichen Nutztier	4
1.2.2 TSE beim Schaf.....	5
2 Etiologie der Scrapie	6
2.1 Pathogenese der Scrapie.....	7
2.2 Infektionsweg	9
2.3 Faktoren der Scrapie-Ausprägung beim Schaf.....	11
2.3.1 Genetische Faktoren	12
2.3.1.1 <i>PRNP</i> -Varianten und Scrapie-Empfindlichkeit.....	12
2.3.1.2 Kartierte merkmalsbeeinflussende Genorte für Scrapie.....	13
2.3.2 Faktor Infektionsquelle.....	14
2.3.3 Physiologische Einflussfaktoren	15
3 „Expressionsprofiling“ Moderne Technologien zur Identifizierung funktionaler Kandidatengene	16
3.1 Microarray-Technologie.....	16
3.2 Echtzeit Reverse Transkriptase-PCR	18
C Material und Methoden	20
1 Versuchstiere und Gewebeproben.....	20
2 Methoden.....	21
2.1 Gewinnung von Nukleinsäuren	21
2.1.1 Isolierung genomischer DNA.....	21
2.1.2 RNA Isolierung	21
2.1.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA.....	21
2.1.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.1.2.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus fetthaltigem Gewebe.....	22
2.1.3	Quantifizierung und Qualitätsprüfung.....	23
2.2	Microarray-Hybridisierung	23
2.2.1	Erst- und Zweit-Strang-Synthese	23
2.2.2	Transkription und Labeling der cRNA.....	24
2.2.3	Fragmentierung und Reinigung der cRNA	25
2.2.4	Hybridisierung oviner cRNA mit dem „human 10k array“	25
2.2.5	Waschen der hybridisierten Arrays	26
2.3	Bilderfassung, -bearbeitung und -auswertung.....	26
2.3.1	Arraysan.....	27
2.3.2	Bildanalyse	27
2.3.3	Normalisierung.....	28
2.4	Echtzeit Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion	28
2.4.1	Reverse Transkription (RT).....	28
2.4.2	Echtzeit Polymerase Kettenreaktion	29
2.4.2.1	Primeroptimierung.....	29
2.4.2.2	LightCycler [®] -PCR Protokoll.....	29
2.4.3	Nutzung von „Housekeeping“-Genen bei gesunden Texelschafen in der Echtzeit RT-PCR.....	29
2.5	Vergleichende Sequenzanalyse	32
2.6	Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen.....	33
2.7	Statistische Auswertung	34
D	Ergebnisse	36
1	Heterologe Chip-Hybridisierung beim Schaf.....	36
1.1	Cross-Spezies-Hybridisierung oviner cRNA mit den Spezies <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> und <i>Rattus norvegicus</i>	36
1.2	Verifizierung der Sequenzspezifität zwischen Genen des „human 10k array“ nach heterologer Hybridisierung mit oviner cRNA	38
2	Vergleichende Hybridisierung ausgewählter Gewebe von gesunden, nicht infizierten Texelschafen mit differenter Scrapie-Empfindlichkeit (R1 vs. R5)	39
2.1	Expressionsprofil des Stammhirns	41
2.2	Expressionsprofil des Ileum (Peyer'sche Platten).....	41
2.3	Expressionsprofil des Jejunum.....	42

Inhaltsverzeichnis

2.4	Expressionsprofil des retropharyngealen Lymphknotes	42
2.5	Expressionsprofil der Leber	43
3	Funktionale Einordnung der different exprimierten Gene (R1 vs. R5) des retropharyngealen Lymphknotens nach Microarray-Analyse.....	43
3.1	Identifizierung physiologischer Prozesse mit signifikant erhöhter Anzahl different exprimierter Gene	43
3.2	Identifizierung der Stoffwechselwege mit signifikant erhöhter Anzahl different exprimierter Gene	46
4	Quantitative Bestimmung des Transkriptionsniveaus ausgewählter funktionaler Kandidatengene mit Echtzeit RT-PCR.....	51
4.1	Transkriptniveau immunrelevanter Gene im retropharyngealen Lymphknoten in den Risikoklassen R1 und R5	51
4.2	Transkriptniveau immunrelevanter Gene der Milz in den Risikoklassen R1 und R5	54
5	Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in ausgewählten funktionellen Kandidatengen.....	56
5.1	Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in <i>VCAMI</i>	56
5.2	Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in <i>HLA-DQA1</i>	59
5.3	Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in <i>SELL</i>	60
6	Frequenzanalyse der C403A- <i>VCAMI</i> -Genvariante in den unterschiedlichen Scrapie-Risikoklassen beim Texelschaf.....	60
E	Diskussion	62
F	Zusammenfassung	73
G	Thesen zur Dissertation	75
H	Literaturverzeichnis.....	78
I	Anhang	i
1	Geräte	xiv
2	Software.....	xvii
3	Chemikalien und Lösungen.....	xvii
3.1	Chemikalien (alphabetisch).....	xvii
3.2	Kits (alphabetisch).....	xix
3.3	Lösungen	xx
3.4	Verbrauchsmittel	xxii

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Scrapie-Präferenz beim Schaf, ausgedrückt in Risikoklassen in Abhängigkeit der *PRNP*-Genotypen (Aminosäure 136, 154, 171) in den verschiedenen Schafrassen (nach Dawson *et al.*, 1998)..... 13

Tabelle 2: Standardisierte Gewebeprobenentnahme von 7–8 Monate alten weiblichen Texelschafen aus der Schlachtung vom 09.01.2003. 20

Tabelle 3: Absorptions- und Emissionswerte der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FluoroLink™ Cy5-UTP und FluoroLink™ Cy3-UTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)..... 27

Tabelle 4: Primerbedingungen der verwendeten Primerpaare für die vergleichende Sequenzierung und Echtzeit RT-PCR in den Geweben Retropharyngeale Lymphknoten und Milz. 30

Tabelle 5: Primerbedingungen zur vergleichenden Sequenzierung des kodierender Bereiches der different exprimierten Gene *VCAMI*, *SELL* und *HLA-DQA1*. 33

Tabelle 6: Anzahl der auswertbaren Hybridisierungssignale von drei kommerziell verfügbaren Oligonukleotid-Arrays (MWG Biotech AG). 37

Tabelle 7: Darstellung zur funktionalen Abdeckung der Oligonukleotid-Arrays und Verteilung der annotierten Gene für die Spezies *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* in biologischen Prozessen der Gene Ontology (GO)-Annotation. 38

Tabelle 8: Homologie (in % Übereinstimmung) der sequenzierten cDNA bzw. DNA Konsens-Sequenzen des *Ovis aries* mit den Spezies *Homo sapiens* und *Bos taurus* ermittelt über BLASTN („cut-off“ E-Wert 1×10^{-10}). 39

Tabelle 9: Absolute und anteilige Anzahl auswertbarer Gene nach vergleichender Cross-Spezies-Hybridisierung ($n = 3$) des „human 10k arrays“ (MWG BIOTECH AG) mit gewebsspezifischen ovinen Cy5- bzw. Cy3-markierten cRNA-Sonden in den Geweben Stammhirn, Ileum (Peyer’sche Platten), Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten und Leber. 40

Tabelle 10: Darstellung physiologischer Prozesse unter Hervorhebung (grau unterlegt) der Prozesse mit signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhter Anzahl ($n \geq 5$) different exprimierter Gene des retropharyngealen Lymphknotens unter Nutzung des Programms GoMiner™..... 44

Tabelle 11: Darstellung der Stoffwechselwege mit signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhter Anzahl different exprimierter Gene ($n \geq 3$) unter Nutzung des Programms PathwayExplorer.	47
Tabelle 12: Der Endozytose zuzuordnende signifikant different exprimierte Gene zwischen Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen gesunden Texelschafen und deren mittleres relatives Transkriptionsniveau im retropharyngealen Lymphknoten nach heterologer Chip-Hybridisierung.	50
Tabelle 13: SNP-Detektion im ovinen 2076 bp EST (ES414810) mit Homologie zur <i>VCAMI</i> mRNA des <i>Bos taurus</i> nach vergleichender Pool-Sequenzierung aus den experimentellen Gruppen R1 vs. R5.	57
Tabelle 14: Darstellung der SNP-Detektion und der <i>PRNP</i> -assoziierten SNP im 2076 bp EST (ES414810) mit Homologie zur <i>VCAMI</i> mRNA des <i>Bos taurus</i> nach vergleichender Einzeltier-Sequenzierung der Texelschafe aus den experimentellen Gruppen R1 vs. R5.	58
Tabelle 15: Darstellung der SNP-Detektion im 1.075 bp Fragment des <i>HLA-DQA1</i> (ES672871) nach nach vergleichender Pool-Sequenzierung der Texelschafe (R1 vs. R5).	59
Tabelle 16: Frequenzanalyse im SNP C403A des <i>VCAMI</i> (ES414810) in Abhängigkeit der <i>PRNP</i> -bedingten Scrapie-Risikoklassen (Dawson <i>et al.</i> , 1998) mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse.	60
Tabelle 17: Identifizierung vergleichsweise höher exprimierter Gene in der Scrapie-Risikoklasse R1 nach heterologer Chip-Hybridisierung im retropharyngealen Lymphknoten.	i
Tabelle 18: Identifizierung vergleichsweise höher exprimierter Gene in der Scrapie-Risikoklasse R5 nach heterologer Chip-Hybridisierung im retropharyngealen Lymphknoten.	xii
Abbildung 1: Mögliche neuropathologische Mechanismen, die infolge einer Prionenerkrankung zur Neurodegeneration führen (modifiziert nach Hur <i>et al.</i> , 2002).	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der komplexen Zusammenhänge des Prionen-Infektionsweges beim Schaf in Anlehnung an van Keulen <i>et al.</i> (2002).	11
Abbildung 3: Mittels Echtzeit RT-PCR bestimmtes signifikant differentes mittleres Transkriptniveau ($n = 3$ Wiederholungen) des „Housekeeping“-Genes <i>GAPDH</i> in den	

Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 der Gewebe retropharyngeale Lymphknoten und Milz.	31
Abbildung 4: Mittleres Transkriptniveau (Echtzeit RT-PCR, n = 3 Wiederholungen) des „Housekeeping“-Genes „RNA polymerase II“ (<i>RPII</i>) der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 in den Geweben Milz und retropharyngealer Lymphknoten.	32
Abbildung 5: <i>VCAMI</i> -Genotypisierung (RFLP Analyse) an Position nt 376. Die Spaltung des 442 bp Fragments erfolgte über ScrFI-Enzymverdau (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main).	34
Abbildung 6: Auszug aus der Visualisierung der Hybridisierungsmuster von drei kommerziell verfügbaren Oligonukleotid-Arrays (MWG Biotech AG) mittels ImaGene™ (BioDiscovery Inc.).	36
Abbildung 7: Anzahl der Gene mit Hybridisierungssignal die den Auswertungskriterien (A) signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) zwischen R1 und R5, (B) zudem 2-fach „different exprimierte“ Gene und (C) FDR-Korrektur ($q \leq 0,05$) in den fünf untersuchten Geweben genügen.	41
Abbildung 8: Darstellung different exprimierter Gene, die dem Prozess „Reaktion auf Pathogene und Parasiten“ nach GO-Annotation zugeordnet werden können.	45
Abbildung 9: Komplementkaskade nach KEGG unter Hervorhebung (grün unterlegt) der im Vergleich R1 vs. R5 different exprimierten Gene nach heterologer Microarray-Hybridisierung.	48
Abbildung 10: Relative Transkriptionsniveaus different zwischen Scrapie-resistenten (positive Ordinate) und Scrapie-empfindlichen (negative Ordinate) gesunden Texelschafen exprimierter Gene der Stoffwechselwege „Komplement und Koagulation“ (weiße Balken), „NK-vermittelte Zelltoxizität“ (gestreifte Balken) und „T-Helferzellen-Differenzierung“ (schwarze Balken) im retropharyngealen Lymphknoten.	49
Abbildung 11: Relative Transkriptionsniveaus different zwischen Scrapie-resistenten (positive Ordinate) und Scrapie-empfindlichen (negative Ordinate) gesunden Texelschafen exprimierter Gene der Stoffwechselwege „Cadherin-vermittelte Zelladhäsion“, „Tight junction“ und „IL-3 Signalweg“ im retropharyngealen Lymphknoten.	51
Abbildung 12: Mittleres Transkriptniveau (n = 3 Wiederholungen) der Gene <i>CCL4</i> (A), <i>DF</i> (B), <i>GPXI</i> (C), <i>HLA-DQA1</i> (D), <i>SELL</i> (E) und <i>VCAMI</i> (F) in der gepoolten mRNA	

der Scrapie-Risikoklassen R1 (n = 4) und R5 (n = 4) mittels Echtzeit RT-PCR im retropharyngealen Lymphknoten.	53
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung des Transkriptniveaus (n = 3) der Gene <i>VCAMI</i> (A) und <i>SELL</i> (B) in den Geweben retropharyngeale Lymphknoten und Milz mittels Echtzeit RT-PCR.	55
Abbildung 14: Gemessene Transkriptraten (n = 3) der Gene <i>CCL4</i> (A), <i>DF</i> (B) und <i>TGFBI</i> (C) in der gepoolten mRNA der Scrapie-Risikoklassen R1 (n = 4) und R5 (n = 4) mittels Echtzeit RT-PCR der Milz.	55
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung des SNP T917C des EST (ES414810) mit Homologie zur <i>VCAMI</i> mRNA des <i>Bos taurus</i> über Einzeltier-Sequenzierung der Texelschafe der Scrapie-Risikoklasse R1 (Tier 2) und R5 (Tier 3).	57
Abbildung 16: Signale der Inflammation forcieren die Adhäsion und Diapedesis zirkulierender Lymphozyten zur Aktivierung.	68

Abkürzungsverzeichnis

A	Amplikon	doppelsträngiges Polymerase Kettenreaktion-Produkt
bp	Basenpaar	
BLASTN	engl. basic local alignment search tool nucleotide	
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	
BTA	Chromosom der Spezies <i>Bos taurus</i>	
CJD	engl. Creutzfeldt-Jakob-disease (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)	
Cy3-UTP	Cy3 Aminoallyl Uridintriphosphat	
Cy5-UTP	Cy5 Aminoallyl Uridintriphosphat	
cRNA	engl. copy ribonucleinacid (kopierte Ribonukleinsäure)	
CWD	engl. chronic wasting disease	
DC	Dendritische Zellen	
DD	engl. differential display	
DEFRA	engl. department for environment, food and rural affairs	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DNA	engl. deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)	
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate	
dsDNA	engl. double strand deoxyribonucleic acid (doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure)	
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	
ENS	Enterisches Nervensystem	
EST	engl. expressed sequence tag	
EU	Europäische Union	
E-Wert	Statistischer Erwartungswert	
fCJD	engl. familiar Creutzfeldt-Jakob-disease (familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)	
FDC	Folikular Dendritische Zellen	
FDR	engl. false discovery rate	
FFI	engl. fatal familial insomnia (Fatale Familiäre Insomnie)	
FRET	engl. fluorescence resonance energy transfer	
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie	

Abkürzungsverzeichnis

GALT	engl. gut associated lymphoid tissue (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
GenMAPP	engl. gen map annotator and pathway profiler
GO	engl. gene ontology
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HEV	engl. high endothelial cells (hohe Endothelzellen)
HSA	Chromosom der Spezies <i>Homo sapiens</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
iCJD	engl. iatrogenic Creutzfeldt-Jakob-disease (iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
KEGG	engl. Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LKV	Landeskontrollverband
LRS	engl. lymphoreticular system (lymphoretikuläres System)
LUX™	engl. light upon extension
MALT	engl. mucosa associated lymphoid tissue (Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
MGED	engl. microarray gene expression data society
MIAME	engl. minimal information about a microarray experiment
MMU	Chromosom der Spezies <i>Mus musculus</i>
MHC	engl. major histocompatibility complex
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid (Botenribonukleinsäure)
M-Zellen	engl. microfold cells
NCBI	engl. National center for biotechnology information
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
nt	Nukleotid
nvCJD	engl. new variant of Creutzfeldt-Jakob-disease (neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)
OAR	Chromosom der Spezies <i>Ovis aries</i>
ORF	engl. open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	engl. polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PNS	Peripheres Nervensystem

<i>p. i.</i>	engl. post inoculation (nach Beimpfung)
<i>PRNP</i>	Prionproteingen
<i>PrP^C</i>	engl. prionprotein cellular (zelluläre Form des Prionproteins)
<i>PrP^{Sc}</i>	engl. prionprotein scrapie (pathogene Form des Prionproteins)
QTL	engl. quantitative trait locus (merkmalsassoziierter Genort)
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	engl. ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPA	engl. RNase protection assay
RT	Reverse Transkription
s	Standardabweichung
sCJD	engl. sporadic Creutzfeldt-Jakob-disease (sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)
„ <i>sip</i> “-Gen	engl. scrapie incubation period-Gen
SNP	engl. single nucleotid polymorphism (Einzelbasenaustausch)
SO	Schwefelmonoxid
TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
<i>vs.</i>	Lat. <i>versus</i> (gegen)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren

A	Alanin
H	Histidin
R	Arginin
Q	Glutamin
V	Valin

A Einleitung

Anfang der 90er Jahre führte der epidemische Ausbruch der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) in Verbindung mit dem zeitgleichen Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) zur intensiven Untersuchung der Grundlagen dieser Erkrankungen. Die Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (TSE) umfasst eine Gruppe von Gehirnerkrankungen, die artübergreifend weltweit verbreitet sind und bei Mensch wie Tier tödlich verlaufen. Allgemeine pathologische Kennzeichen einer TSE-Erkrankung sind neuronaler Schwund mit resultierender Vakuolenbildung und Astrogliosis sowie die Plaquebildung im Gehirn über die dortige Akkumulation des pathogenen Prionproteins (PrP^{Sc}) (Prusiner, 1982). Das körpereigene Prionprotein (PrP^C) ist ein Glykophosphatidylinositol verankertes Glykoprotein der Zellmembran, das vor allem in den Neuronen aber auch in anderen Geweben und Leukozyten vorkommt. Seine genaue Funktion ist bis heute nicht bekannt (Aguzzi & Polymenidou, 2004). Jedoch verdichteten sich Hinweise einer neuroprotektive Funktion (Roucou & LeBlanc, 2005) sowie einer die Immunreaktion aktivierende Funktion im lymphatischen System (Isaacs *et al.*, 2006) aufgrund der antiapoptotischen und signalübertragenden Aktivität des PrP^C.

Die TSE-Erkrankung beim Schaf, allgemein als Scrapie bezeichnet, wurde erstmalig 1732 in England beschrieben (zitiert in McGowan, 1922). Aufgrund dieser ersten Beschreibung und der potentiellen Vektorfunktion innerhalb der unterschiedlichen TSE gilt Scrapie als die Urform der Prionenerkrankungen. Weltweit durchgeführte Untersuchungen von natürlich erkrankten und nicht erkrankten Tieren weisen auf einen rassenabhängigen Zusammenhang zwischen Prionprotein-Genotypen und der Scrapie-Empfindlichkeit hin (Goldmann *et al.*, 1991). Die Prionproteingene-Varianten (*PRNP*-Varianten) werden über Punktmutationen in den Codons der Aminosäuren in Position 136 (A/V), 154 (R/H) und 171 (Q/R bzw. Q/H) definiert. In weiteren Studien wurde jedoch gezeigt, dass die Polymorphismen im *PRNP* allein die hohe Varianz in der Inkubationszeit und Symptomatik von Scrapie nicht erklären. So wurden z. B. Interaktionen zwischen dem *PRNP*-Genotyp und dem über Mausmodelle charakterisierten Erregerstamm beobachtet (Goldmann *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden weitere merkmalsbeeinflussende Genorte (QTL) für die Scrapie-Empfindlichkeit beim Schaf (Moreno *et al.*, 2003) und der Maus (Stephenson *et al.*, 2000) kartiert. Weiterhin beschrieben Elsen *et al.* (1999) mehrere, das epidemiologische Geschehen signifikant beeinflussende Faktoren, wie das Altersprofil der Herde, der Gesundheitsstatus der Muttertiere oder der allgemeine Parasitenbefall innerhalb der Herde. Dies zeigt, dass genetische und

physiologische Faktoren die Empfindlichkeit, an Scrapie zu erkranken, beeinflussen. Die fehlende Penetranz zwischen der Ausprägung der Scrapie und den bisher beschriebenen Faktoren weist darauf hin, dass vermutlich weitere, bisher unbekannte Faktoren die Scrapie-Empfindlichkeit beeinflussen können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, mögliche physiologische Faktoren zu identifizieren, die mit einer differentiellen Scrapie-Empfindlichkeit assoziiert sind. Mittels vergleichender Expressionsanalyse von gesunden Schafen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition (*PRNP* Genotyp-Risikoklassen R1 vs. R5) für Scrapie werden Gewebe untersucht, die in den Erregertransport (Peyer'sche Platten des Ileum, Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten), die Ausprägung der Erkrankung (Stammhirn) bzw. in eine differente Stoffwechselaktivität der Tiere (Leber) involviert sind. Anhand des Vergleiches komplexer Expressionsmuster sollen physiologische Besonderheiten im Stoffwechsel zwischen gesunden Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition erfasst werden. Damit kann das patho-physiologischen Verständnis von Infektion und Ausprägung der TSE beim Schaf erweitert und gleichzeitig ein Beitrag zur Identifizierung funktioneller Kandidatengene geleistet werden. Diese können Anwendung in der markergestützten Selektion von Zuchttieren zur nachhaltigen Umsetzung gesetzlicher Verordnungen zur Bekämpfung der Scrapie finden.

B Literatur

1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathie

Die Transmissible Spongiforme Enzephalopathie umfasst eine Gruppe von progressiven neurodegenerativen Erkrankungen, welche sowohl beim Menschen als auch bei Tieren auftreten. Die bisher einmalige Biologie der übertragenden, weitläufig als Prion (Kurzform für „proteinaceous infectious agent“) bezeichneten Agens (Prusiner, 1982; Legname *et al.*, 2004) und deren epizootische Ausbreitung, insbesondere auf den Menschen, rückten Prionenerkrankungen in den Mittelpunkt umfangreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Bereits 1936 wiesen Cuielle & Chelle auf die mögliche Übertragbarkeit der verschiedenen Krankheitsformen, beginnend mit der Scrapie beim Schaf, hin (zitiert in Hörnlimann, 2001).

1.1 TSE-Erkrankungen des Menschen

Innerhalb der Prionenerkrankungen des Menschen können erworbene (infektiöse), spontane und erbliche Ursachen unterschieden werden. Die Begrifflichkeit Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) wurde auf Grundlage der Fallbeschreibungen von Creutzfeldt (1920) und Jakob (1921) eingeführt (zitiert in Poser, 2002). Bis heute sind die iatrogene (iCJD), sporadische (sCJD), familiäre (fCJD) und seit 1996 eine neue Variante (nvCJD) der Erkrankung bekannt (Will *et al.*, 1996). Die Unterscheidung vierer molekular unterschiedlicher Prionenstämme innerhalb der CJD erfolgt auf Grundlage der Symptomatik und diagnostisch *post mortem* (Collinge, 2005). Ebenso wie die fCJD sind das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) ausschließlich hereditär bedingte Prionenerkrankungen des Menschen (Lugaresi *et al.*, 1986). Sie basieren auf Insertions- und Punktmutationen, lokalisiert im „open reading frame“ (ORF) des humanen *PRNP* auf Chromosom 20 (Kretzschmar, 1999). Die Kuru, eine Prionenerkrankung der Eingeborenen des Fore-Stammes auf Papua-Neuguinea, wurde durch Kannibalismus übertragen. Langfristige Untersuchungen dieser Krankheit geben Aufschluss über die Epidemiologie, Pathologie und Symptomatik der Prionenerkrankungen (Goldfarb, 2002). Bereits 1956 wurde der Fokus auf epidemiologische, neuropathologische und klinische Gemeinsamkeiten zwischen Kuru und Scrapie gelegt (Hadlow, 1956).

1.2 TSE-Erkrankungen der Tiere

Bisher beschränken sich die Prionenerkrankungen der Tiere auf die Klasse der Säugetiere, jedoch konnte das körpereigene Prionprotein auch bei Beuteltieren (Windl *et al.*, 1995), Vögeln (Harris *et al.*, 1993) und Reptilien (Strumbo *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. Ohne gesicherte Erkenntnisse bezüglich der Übertragbarkeit gibt es neben den allgemein anerkannten TSE der Tiere bereits Berichte über spongiforme Enzephalopathien bei einigen in Gefangenschaft lebenden Antilopenarten (Kirkwood & Cunningham, 1994) und beim Rothalsstrauß (Schoon *et al.*, 1991). Bei bestimmten Tierarten wie Schwein, Pferd und Hund konnte bislang keine TSE-Erkrankung durch orale Infektion ausgelöst werden, obwohl der Nachweis der Infektiosität erbracht wurde (Wells *et al.*, 2003).

Anerkannte übertragbare spongiforme Enzephalopathien sind die selten auftretende Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) der Haus- und vereinzelter Wildkatzen (Aldhous, 1990) und die seit über 50 Jahren bekannte Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) der Zuchtnerze in Großbritannien, USA und Russland (Barlow, 1972). Die „chronic wasting disease“ (CWD) wildlebender Hirsche und Elche in den Staaten Colorado, Wyoming und Montana (USA) aber auch einiger in Gefangenschaft lebender Hirscharten wurde bereits vor 1980 als ansteckendes „wasting syndrome“ der Hirsche beschrieben (Williams, 2005).

1.2.1 TSE beim landwirtschaftlichen Nutztier

Die Gefahren einer epizootischen Übertragung beim landwirtschaftlichen Nutztier ergeben sich durch den Kontakt zwischen den Spezies, z. B. in Betrieben der Tierzucht und Haltung und durch den nationalen sowie internationalen Tierhandel. In der Gruppe der Prionenerkrankungen kommt somit den landwirtschaftlichen Nutztieren, als eine der Nahrungsgrundlagen des Menschen, eine gesonderte Stellung zu. Der steigende Bedarf an Wildfleisch in der Ernährung führte bei den unter Kapitel B 1.2 bereits beschriebenen Hirscharten und Straußenvögeln zu Haltungsverfahren, welche ebenfalls eine Übertragungsquelle der infektiösen Prionenerkrankungen für den Menschen bilden könnten.

Die epidemische Ausbreitung der TSE bei Nutztieren steht im engen Zusammenhang mit BSE, welche sich 1986 von England ausgehend über Gesamteuropa und weitere Kontinente ausdehnte. Die allgemeinen Kennzeichen einer neurodegenerativen Erkrankung, welche sich in Bewegungs- und Verhaltensänderungen äußern und somit einen erschwerten Umgang mit den betroffenen Tieren nach sich ziehen, führten u. a. zur Bezeichnung „mad cow disease“. Die Ursache für die rapide Ausbreitung fanden Wissenschaftler in der Umstellung des Herstellungsverfahrens für Fleisch- und Knochenmehl von Rindern und Schafen, welches als

proteinreiche Ergänzung in der Hochleistungstierhaltung Verwendung fand. In den späten 70er Jahren war die Temperatur zur Sterilisation von Tiermehl gesenkt und die Verwendung von Hydrokarbon eingestellt worden. Diese Bedingungen gaben dem mutmaßlichen Erreger die Möglichkeit zu überleben und auf die mit Tiermehl gefütterten Nutztiere überzugehen (Wilesmith *et al.*, 1991). Weitere Hypothesen beruhen auf der seltenen, spontan auftretenden Umwandlung vom PrP^C zum PrP^{Sc} innerhalb des Rindes.

Ebenfalls in den späten 70er Jahren traten erstmals neuartige TSE-Erkrankungen bei der Haus- und Wildkatze (Kapitel B 1.2) sowie Zootieren auf, welche die Infektion über kontaminiertes Futter untermauern (Kirkwood *et al.*, 1990). Des Weiteren konnte der Nachweis eines gemeinsamen BSE-Prionenstammes innerhalb dieser neuartigen Erkrankungen, ebenso wie bei der nvCJD erbracht werden (Collinge *et al.*, 1996).

Durch das Ausfuhrverbot englischer Schafe und Rinder sowie das Verfütterungsverbot von Tiermehl seit 1988 wurde die Epidemie drastisch eingeschränkt. Dies konnte die Ausbreitung der Prionenerkrankungen über frühere Exporte des lebenden Tierbestandes und Fleischerzeugnisse auf das europäische Festland, wie z. B. Schweiz, Portugal und Deutschland, nicht verhindern. Deshalb wurde 2001 die EU-Verordnung EG 999/2001 erhoben, die den Verkehr und Umgang mit tierischen Produkten von Schaf und Rind strengstens überwacht und reguliert. In Deutschland wird bei der Schlachtung von Rindern (ab 24 Monate, seit 27.06.2006 ab 30 Monate) ein obligatorischer TSE-Test basierend auf einem Immunoassay für PrP^{Sc} im Stammhirn und/oder Obex durchgeführt. Seit dem 01.01.2001 wurden in Deutschland 16.205.518 Rinder auf BSE getestet. Im Rahmen dieser Kontrollen wurden im Zeitraum 26.11.2000 bis 15.10.2007 409 BSE-Fälle amtlich bestätigt (<http://www.bmelv.de>).

1.2.2 TSE beim Schaf

Die Scrapie-Erkrankung beim Schaf wurde 1732 erstmalig beschrieben (zitiert in McGowan, 1922). Trotz der sehr frühen Berichte einer Scrapie-ähnlichen Erkrankung bei englischen Tieren wird von einer Einschleppung aus Spanien über die Merino-Schafrasse ausgegangen (Greig, 1940). Insbesondere nach dem 2. Weltkrieg breitete sich die Erkrankung über den internationalen Schafhandel weltweit aus (Detwiler & Baylis, 2003). Dabei bilden Australien und Neuseeland eine Ausnahme, da dort seit 1952 keine TSE-Fälle auftraten. Im Zusammenhang mit der langjährigen wissenschaftlichen Untersuchung der Scrapie wird diese als die Urform der TSE-Erkrankungen bezeichnet. Ebenso wie in der Rinderhaltung gilt für die Haltung von Schafen und Ziegen die EU-Verordnung EG 999/2001. In Deutschland

werden Schafe, die älter als 18 Monate sind, während der Schlachtung stichprobenartig auf PrP^{Sc} im Stammhirn getestet (Anzahl geprüfter Tiere: 2004 85.307 Tiere, 2005 48.490 Tiere, 2006 48.727 Tiere). Von 1990 bis 2006 wurden beim kleinen Wiederkäuer Schaf und Ziege 148 Scrapie-Fälle amtlich erhoben. Im Jahr 2007 wurden bis zum 15.10.2007 35.724 Schafe getestet und 12 Scrapie-Fälle amtlich gemeldet (<http://www.bmelv.de>).

2 Etiologie der Scrapie

Scrapie ist durch Symptome einer neurodegenerativen Erkrankung gekennzeichnet, wodurch eine Differentialdiagnose deutlich erschwert ist. Die meisten infizierten Tiere sterben in einem Alter von 2 bis 4 Jahren, es wurden aber auch ältere erkrankte Muttertiere (7–12 Jahre) beobachtet (Detwiler & Baylis, 2003). Die Symptome sind vielfältig und variieren je nach Alter, Rasse, *PRNP*-Genotyp, allgemeinem Gesundheitszustand, Erregerstamm und dem Stadium der Erkrankung sehr stark (Hopp *et al.*, 2001). Die häufigsten Symptome sind Pruritus in Verbindung mit Hinterhand-Ataxie, Hyperästhesie, Gewichtsverlust und Ängstlichkeit. Der Schweregrad der Ataxie ist tierindividuell verschieden und besonders nach Stress z. B. durch Handhabung der Tiere stärker ausgeprägt (Houston & Gravenor, 2003). Auf den neuronal bedingten starken Juckreiz reagieren die erkrankten Tiere mit Scheuerbewegungen an Gegenständen (engl. scrape) sowie einem typischen G nubbern der Lippen. Dieses Verhalten, das der Erkrankung seinen Namen gab, führt zu Vliesverlusten an Flanke, Rumpf, Hals und Kopf. Die Klinik kann durch weitere Symptome wie Tremor, Ödeme im Lippenbereich, Speichelabsonderung, Schwermelken in Verbindung mit verringerter Milchleistung bis hin zum Erblinden und Kollabieren des Tieres erweitert werden. Dabei ist zu beachten, dass die genannten Symptome einzeln oder in Kombination miteinander sowie in variablen Ausprägungsstufen auftreten können (Heim *et al.*, 2002). Es wird zwischen einer progressiven Form (Symptomausprägung < 1 Woche) und einer chronischen Form (Symptomausprägung > 3 Monate) unterschieden. Ebenfalls wurden atypische Verlaufsformen aufgezeichnet. Die Gefahr der Scrapie-Erkrankung liegt in vereinzelt auftretenden Tieren, die weder symptomatisch auffällig sind, noch im weiteren Krankheitsverlauf klinische Anzeichen aufweisen. In diesen preklinischen Scrapie-Fällen erfolgte die PrP^{Sc}-Detektion über histopathologische und immunohistochemische Nachweisverfahren. Andererseits wurden infizierte Schafe mit klinischen Symptomen beobachtet, ohne den Nachweis des PrP^{Sc} erbringen zu können (Detwiler & Baylis, 2003).

Daher sind die klinischen Beobachtungen und labordiagnostischen Methoden immer im Zusammenhang zu bewerten.

2.1 Pathogenese der Scrapie

Bereits 1966 wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem Scrapie-Erreger um ein pathogenes Protein handeln könnte, welches sich durch Eigenreplikation ohne den Einfluss von Nukleinsäure vermehrt (Alper *et al.*, 1967; Griffith, 1967). Prusiner (1982) gelang es ein 27–30 kDa Glykoprotein mit spezifischen Eigenschaften aus dem Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Hamster zu isolieren, woraufhin er das Prionprotein-Modell aufstellte. Über Antikörperexperimente konnte in infizierten und nicht-infizierten Geweben der Nachweis einer körpereigenen Form des Prionproteins erbracht werden. Es wird durch das *PRNP* kodiert, wobei die Isoformen PrP^C und PrP^{Sc} durch die selbe mRNA kodiert werden (Oesch *et al.*, 1985). Parallel bestehen weitere Modelle zur infektiösen Agens in Form eines Virus oder Virino, die abseits der „protein-only-hypothesis“ stehen (Dickinson & Outram, 1988; Narang, 2002).

Das Auftreten von PrP^{Sc} in unterschiedlichen Geweben ist mit der Infektiösität des Gewebes hoch korreliert (McKinley *et al.*, 1983). Dies ermöglicht die Beobachtung des Pathogens auf seinem Weg im Organismus. Mögliche pathologische Mechanismen infolge einer Prioneninfektion sind in Abbildung 1 zusammengefasst. Die Akkumulation des PrP^{Sc} insbesondere im Stammhirn des infizierten Tieres ist co-lokalisiert mit dem Auftreten aktivierter Mikroglia, die sich über die Astrogliose für den Aufbau von Narbengewebe und folgender Neurodegeneration verantwortlich zeigen (Unterberger *et al.*, 2005). Der neuronale Zelltod kann über Nekrose und/oder Apoptose hervorgerufen werden. Nekrose ist gekennzeichnet durch den plötzlichen Zelltod aufgrund von Verletzungen der neuronalen Zelle und tritt begleitend bei inflammatorischen Prozessen auf. Morphologische Merkmale der Apoptose, wie verdichtetes Chromatin, dunkles Zytoplasma, Membranbläschen und Kernfragmentierung, konnten in Zellexperimenten während einer Scrapie-Infektion nachgewiesen werden (Giese *et al.*, 1995). Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Mechanismen letztendlich zum Zelltod führen, und welche Rolle das Prion in der zellulären und/oder pathologischen Form einnimmt. Die „loss of function“-Hypothese geht von einer apoptoseprotektiven Aufgabe des PrP^C aus, dessen Funktion durch die Umformung in die pathogene Form verloren geht. Die „gain of function“-Hypothese hingegen geht von neurotoxischen Prozessen, direkt oder indirekt ausgelöst durch das PrP^{Sc}, und daraus

resultierender Mikrogliaaktivierung aus (Weissmann *et al.*, 2001). Beide Hypothesen schließen sich gegenseitig nicht aus sodass diese Effekte gemeinsam zum Verlust der Nervenzellen führen könnten.

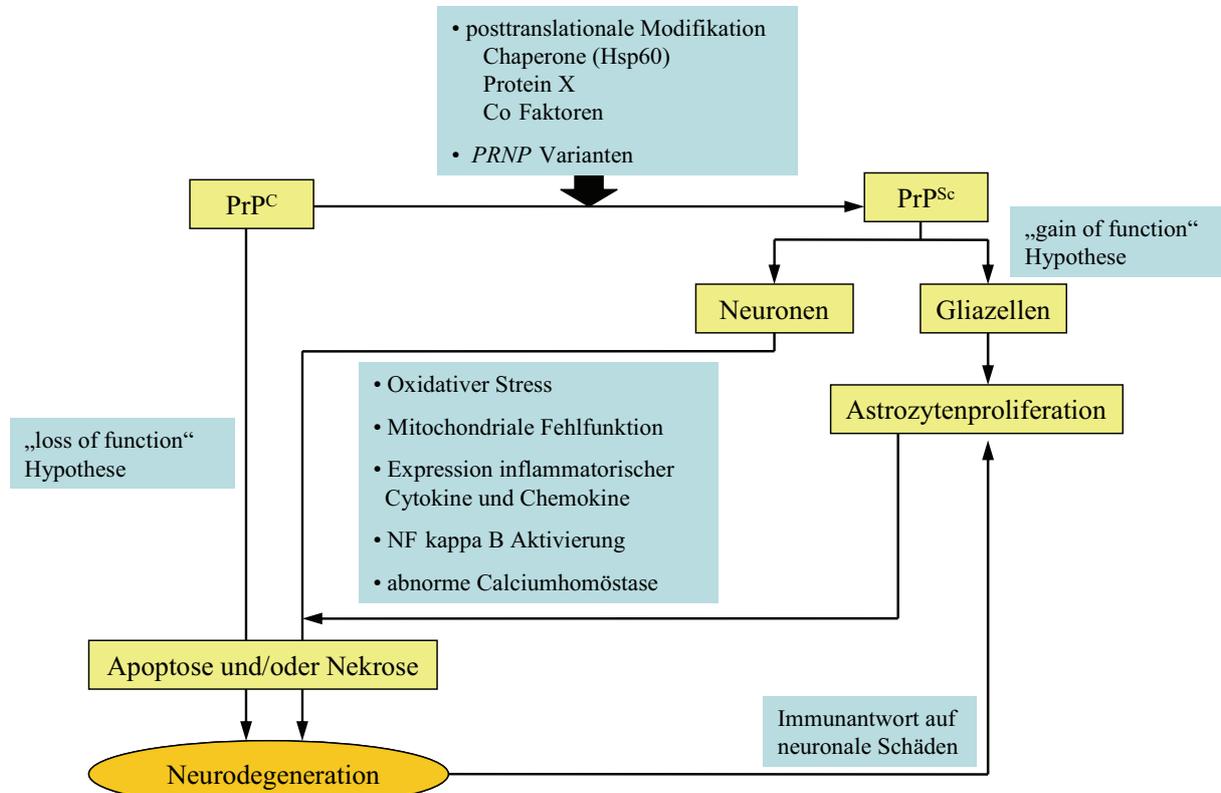


Abbildung 1: Mögliche neuropathologische Mechanismen, die infolge einer Prionenerkrankung zur Neurodegeneration führen (modifiziert nach Hur *et al.*, 2002).

Prionenerkrankungen zeigen allgemein vergleichbare histopathologische Kennzeichen im zentralen Nervensystem (ZNS). Das klassische Läsionsprofil im Gehirn wird durch die Vakuolenbildung infolge der spongiformen Degeneration unterschiedlicher Bereiche der grauen Substanz (*Substantia grisea*) hervorgerufen. Der neuronale Zelltod führt zu einer erhöhten Astrozytenproliferation, welche das Immunsystem des ZNS zum Abbau der abgestorbenen Zellen nutzt. Der Abbau der Neuronen wird durch Ablagerungen unlöslicher Plaque, bestehend aus Fibrillen des PrP^{Sc} , begleitet. Der Grad dieser spongiformen Vakuolenbildung ist tierindividuell sehr verschieden, wobei die Astrozytenvermehrung mit dem Grad der neuronalen Verluste korreliert (Kretschmar, 1999). Mikroglia, die Immuneffektorzellen des ZNS, produzieren SO- und NO-Radikale, welche als Auslöser des oxidativen Stresses und des neuronalen Zelltodes wirken (Hur *et al.*, 2002; Unterberger *et al.*,

2005). Diese Stoffwechselveränderungen konnten durch den Anstieg Glialzellen-abgeleiteter zytotoxischer Cytokine an prioninfizierten Tieren wie z. B. „tumor necrosis faktor“ (*TNF*), „Interleukin 1 α “ (*IL1A*) und „Interleukin 1 β “ (*IL1B*) nachgewiesen werden (Campbell *et al.*, 1994).

2.2 Infektionsweg

Es wird davon ausgegangen, dass die natürlich auftretende Scrapie beim Schaf durch die orale Aufnahme des Erregers hervorgerufen wird. Der Infektionsweg des Pathogens lässt sich in vier Infektionsphasen einteilen (van Keulen *et al.*, 2002). Der Eintritt des Pathogens in den Organismus über das Mucosa-assoziierte lymphatische System (MALT) bzw. das Darm-assoziierte lymphatische System (GALT) und dessen Ausbreitung und Akkumulation im lymphoretikulären System (LRS) wird von der Neuroinvasion und der Etablierung der Prionen im Stammhirn unterschieden. Die Neuroinvasion lässt sich wiederum in die Abschnitte der peripheren und der zentralen Neuroinvasion untergliedern. Die komplexen Zusammenhänge innerhalb des Prioneninfektionsweges sind zusammenfassend in Anlehnung an Van Keulen *et al.* (2002) in Abbildung 2 dargestellt.

Wie das PrP^{Sc} in den Organismus eindringt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird in unterschiedlichen Ansätzen diskutiert. In natürlichen Infektionsversuchen an Mäusen und Schafen wurde nachgewiesen, dass das PrP^{Sc} im Anfangsstadium der Infektion nach der Passage des MALT in den Peyer'schen Platten des Ileum innerhalb des GALT akkumuliert (van Keulen *et al.*, 1999; Hur *et al.*, 2002). Andererseits zeigten Untersuchungen von Jeffrey *et al.* (2006), dass sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} mit den Nahrungsbestandteilen im Darm des Schafes verdaut werden. Abhängig vom Erregerstamm muss es zusätzliche Eintrittswege des PrP^{Sc} geben, da die PrP^{Sc}-Anfärbung in den Peyer'schen Platten durch *de novo* gebildete PrP^{Sc} hervorgerufen wird (Jeffrey *et al.*, 2006). Für den Übergang des Pathogens vom Magen-Darm-Trakt in die Peyer'schen Platten scheinen die M-Zellen (engl. microfold cells) der Epithelwand eine Transportfunktion zu übernehmen (Heppner *et al.*, 2001). Weiterhin sind dendritische Zellen (DZ) durch die Ausbildung von Dendriten zwischen den Epithelzellen in der Lage, PrP^{Sc} aufzunehmen und in den Organismus zu überführen (Huang *et al.*, 2002). Die Peyer'schen Platten stehen in direktem Kontakt zum lymphatischen System und dienen mit Hilfe unterschiedlicher Zellen des Immunsystems als Schnittstelle zwischen dem gastrointestinalen Trakt und dem Lymphsystem. Dabei ist die Anzahl der Peyer'schen Platten

und nicht die Menge der darin enthaltenen Mucosa-assoziierten Lymphozyten und M-Zellen mit der Infektionsempfindlichkeit positiv korreliert (Prinz *et al.*, 2003).

Die B-Lymphozyten nehmen während der lymphatischen Invasion eine zentrale Position ein. Die Reifung verschiedener Zellen des Immunsystems sowie der M-Zellen der Mucosa wird über den Lymphotoxin- β -Signalweg der B-Lymphozyten gesteuert. Bei Mäusen konnte durch den „Knock-out“ der B-Lymphozyten gezeigt werden, dass entwickelte und aktivierte B-Lymphozyten für die lymphatische Invasion eine essentielle Rolle spielen, die sich jedoch im neuroinvasiven Abschnitt der Infektion verliert (Klein *et al.*, 1998). Weiterhin wirken in der frühen Phase der Scrapie-Infektion die immunologisch aktiven Makrophagen abwehrend, während sie in der späten Phase ebenfalls im Verdacht stehen, PrP^{Sc} zu transportieren (Beringue *et al.*, 2000).

Die „Dominostein“-Theorie beruht auf dem Nachweis, dass der Infektionsweg und die Scrapie-Übertragung der PrP^{Sc} über Zell-Zell-Kommunikation an das PrP^C gebunden ist (Brandner *et al.*, 1996). Innerhalb des Lymphsystems breitet sich das Pathogen über die *PRNP*-exprimierenden Zellen im gesamten Organismus aus. Über die mesenterischen Lymphknoten können die PrP^{Sc} in das lymphatische System, welches nicht dem GALT zuzuordnen ist, streuen. Allgemein nutzen die Prionen das LRS zur Eigenreplikation und Akkumulation, was eine Invasion des peripheren Nervensystems (PNS) nach sich zieht. Ein weiterer Weg des PrP^{Sc} führt über das MALT durch den direkten Kontakt der Tonsillen mit dem LRS. Trotz des sehr kurzen Kontaktes mit dem Pathogen konnte in Tonsillenbiopsien von nvCJD-Patienten der PrP^{Sc}-Nachweis erbracht werden (Hill *et al.*, 1999). Auf diese Weise kann über die Nutzung der retropharyngealen Lymphknoten der intestinale Infektionsweg vollständig umgangen werden (van Keulen *et al.*, 1999). Interessanterweise konnte der Nachweis einer PrP^{Sc}-Akkumulation in den Tonsillen und retropharyngealen Lymphknoten von Lämmern erbracht werden, die experimentell über Magensonden infiziert wurden (Heggebo *et al.*, 2003). Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Prionen sich neben der Lymphflüssigkeit ebenso über den Blutkreislauf ausbreiten können.

Der Übergang der PrP^{Sc} vom Lymphsystem zum PNS ist noch nicht eindeutig geklärt. Der submucosale myenterische Plexus des enterischen Nervensystems (ENS) ist eng mit den Peyer'schen Platten verbunden. Ebenso ist das Modell eines M-Zellen- und Peyer'schen

Platten-unabhängigen Infektionsweges direkt zum ENS über den epithelialen Transport möglich (Ghosh, 2004). Vom ENS aus können sich die Prionen über den Zell-Zell-Kontakt, z. B. über die Satelliten Zellen entlang der Nervenfasern ausbreiten. Der parasympathische Weg führt über den dorsalen Motor Nukleus des *Nervus vagus* in die Medulla oblongata des Stammhirns. Hingegen führt der Weg der sympathischen Nervenfasern über den *Nervus splanchnicus* zur intermediolateralen Säule in den Thoraxsegmenten des Rückenmarks (van Keulen *et al.*, 2002). Das einmal in das ZNS gelangte PrP^{Sc} kann sich sowohl absteigend als auch aufsteigend entlang der Nervenfasern ausbreiten und im Stammhirn aufgrund der Neuronendegeneration (Kapitel B 2.1) das beschriebene Läsionsprofil hervorrufen.

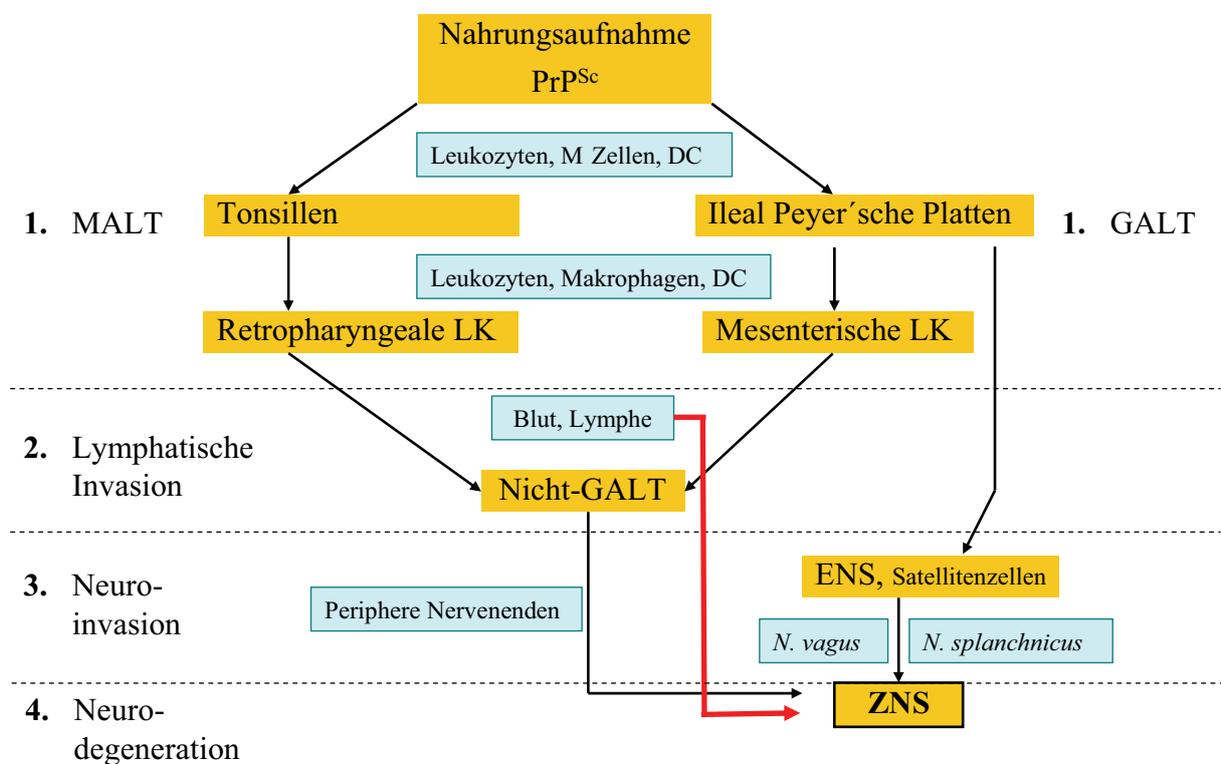


Abbildung 2: Schematische Darstellung der komplexen Zusammenhänge des Prionen-Infektionsweges beim Schaf in Anlehnung an van Keulen *et al.* (2002).

(Abkürzungen: MALT, engl. mucosa associated lymphoid tissue; GALT, engl. gut associated lymphoid tissue; LK, Lymphknoten; DC, Dendritische Zellen; ENS, Enterisches Nervensystem; *N.*, lat. *nervus*)

2.3 Faktoren der Scrapie-Ausprägung beim Schaf

Die breite Varianz in der Inkubationszeit von wenigen Wochen bis zu mehreren Jahren liegt nicht nur im unterschiedlichen Eintritt des Erregers, sondern auch in dessen Stamm begründet. Mit Hilfe des Mausmodells konnten bisher über 20 Scrapie-Stämme anhand des Glykolysemusters und weiterer Parameter identifiziert werden (Bruce *et al.*, 1994; Bruce *et*

al., 2002). Ein wesentlicher Faktor für die Ausbreitung des Erregers und den Ablauf der Pathogenese stellt der Genotyp im *PRNP* des Wirttieres dar.

2.3.1 Genetische Faktoren

2.3.1.1 *PRNP*-Varianten und Scrapie-Empfindlichkeit

Bereits vor der Entdeckung des *PRNP* als kodierendes Gen des PrP^C zeigte sich bei einem Infektionsversuch am Schaf, dass es eine genetische Komponente geben muss, die die Inkubationszeit beeinflusst. Für die Kontrolle über eine kurze bzw. lange Inkubationszeit wurde das „*sip*“-Gen (engl. scrapie incubation period) mit zwei Allelen identifiziert (Dickinson, 1976). Mit der Kodierung des *PRNP* konnte gezeigt werden, dass dieses mit dem „*sip*“-Gen übereinstimmt. Die Erforschung des *PRNP* in unterschiedlichen Spezies erbrachte eine Vielzahl von Polymorphismen, welche mit der Inkubationszeit und Empfindlichkeit bezüglich einer Scrapie-Erkrankung assoziiert sind. Beim Schaf wird das PrP^C durch 256 Aminosäuren im ORF des Exon 3 kodiert, wobei die höchste Anzahl an Polymorphismen ebenfalls im ORF detektiert wurde (Geldermann *et al.*, 2003). Ein kausaler Zusammenhang mit der Scrapie-Empfindlichkeit wurde in den Polymorphismen im Codon 136 mit den Aminosäuren Alanin (A) oder Valin (V), im Codon 154 mit Arginin (R) oder Histidin (H) und im Codon 171 mit Arginin (R), Glutamin (Q) oder Histidin (H) nachgewiesen. Aufgrund vergleichender Untersuchungen von natürlich erkrankten und nicht erkrankten Tieren wurden die *PRNP*-Genotypen rassenspezifisch bezüglich ihrer Scrapie-Empfindlichkeit in die Risikoklassen R1 (sehr resistent), R2 (resistent), R3 (wenig resistent), R4 (anfällig) und R5 (sehr anfällig) eingeteilt (Tabelle 1). Seit 2003 wurde diese Einteilung aufgrund erweiterter wissenschaftlicher Erkenntnisse mit Modifikationen in die Genotypenklassen G1 bis G5 übernommen. Diese Klassifikation findet in der Schafhaltungspraxis und Wissenschaft weltweit Anwendung (DEFRA, 2003), wobei beim Texelschaf bisher 17 Haplotypen im *PRNP*-Genotyp (Codon 136, 154, 171) weltweit erfasst wurden (Kutzer *et al.*, 2002).

Der *PRNP*-Genotyp zeigt seinen Einfluss nicht nur in der Inkubationszeit, sondern auch im Verlauf des Infektionsweges. Dabei unterscheiden sich die Haplotypen ARR und VRQ lediglich in zwei Aminosäuren, was jedoch eine grundlegende Veränderung in ihrem Phänotyp zwischen resistent und empfindlich gegenüber einer Scrapie-Erkrankung nach sich zieht. Beim Schaf konnte in einem experimentellen Infektionsversuch bei Tieren des Genotypes ARQ/ARQ und ARR/VRQ der Nachweis des PrP^{Sc} im ZNS aber nicht im LRS erbracht werden (Langeveld *et al.*, 2006).

Tabelle 1: Scrapie-Präferenz beim Schaf, ausgedrückt in Risikoklassen in Abhängigkeit der *PRNP*-Genotypen (Aminosäure 136, 154, 171) in den verschiedenen Schafrassen (nach Dawson *et al.*, 1998). (Abkürzungen: R1, sehr resistent; R2, resistent; R3, wenig resistent; R4, anfällig; R5, sehr anfällig; A, Alanin; R, Arginin; H, Histidin; Q, Glutamin; V, Valin)

Risiko-klasse	Suffolk, Hampshire, u.a.	Charollais, Blue du Maine	Blueface Leicester	Blackface, Dalesbreed, Cheviot u.a.	Texel, Lleyn
R1	ARR	ARR/ARR	ARR/ARR	ARR/ARR	ARR/ARR
R2	-	-	ARR/AHQ AHQ/AHQ	ARR/AHQ AHQ/AHQ	ARR/AHQ AHQ/AHQ
R3	ARQ ARH AHH	ARR/ARQ	ARR/ARQ ARQ/AHQ	ARR/ARQ ARQ/AHQ	ARR/ARQ ARR/ARH ARQ/AHQ AHQ/ARH
R3	-	ARQ/ARQ ARR/VRQ	ARQ/ARQ	ARR/VRQ AHQ/VRQ ARQ/ARQ	ARH/ARH ARQ/ARH ARQ/ARQ ARR/VRQ AHQ/VRQ
R5	AQQ AQH	ARQ/VRQ VRQ/VRQ	-	ARQ/VRQ VRQ/VRQ	ARQ/VRQ ARH/VRQ VRQ/VRQ

In einem weiteren Versuch mit natürlich erkrankten Schafen konnte das PrP^{Sc} im LRS 10–24 Monate *p. i.* in Tieren des *PRNP*-Genotyps ARQ/VRQ und ARH/VRQ nachgewiesen werden. Andererseits zeigten die VRQ/VRQ-Tiere in diesem Versuch bereits 2–3 Monate *p. i.* PrP^{Sc}-Akkumulation im LRS (Ersdal *et al.*, 2005). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass der *PRNP*-Genotyp Einfluss auf die lymphatische Invasion innerhalb des Prioneninfektionsweges ausübt.

Weitere Erklärungsansätze des genetischen Einflusses ergeben sich aus den Beobachtungen einer veränderten PrP^C-Faltung aufgrund der Genotyp abhängigen veränderten biochemischen Eigenschaften des Proteins, welche teilweise für die Resistenz gegenüber einer Scrapie-Erkrankung verantwortlich sind (Rezaei *et al.*, 2002).

2.3.1.2 Kartierte merkmalsbeeinflussende Genorte für Scrapie

Merkmalsbeeinflussende Genorte (engl. quantitative trait loci, QTL) werden mit Hilfe genomweiter genetischer Marker und deren Rekombinationsraten zumeist am Mausmodell ermittelt. Die QTL-Analysen der unterschiedlichen Prionenerkrankungen zeigen zusätzlich zum *PRNP*-Locus TSE-assoziierte Genorte. Scrapie-assoziierte Kopplungsanalysen an der

Maus (*Mus musculus*, MMU) detektierten signifikante QTL auf den autosomalen Chromosomen MMU 2, MMU 5, MMU 7, MMU 9, MMU 11 und MMU 12 (Stephenson *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001). Moreno *et al.* (2002) wiesen in einer weiteren QTL-Analyse geschlechtsspezifische Effekte nach. Unterschiede in den einzelnen Studien ergeben sich aus dem experimentellen Aufbau und der Verwendung unterschiedlicher Maus-adaptierter Scrapie-Stämme. Übereinstimmend konnte in allen drei Studien auf MMU 7 ein Scrapie-QTL detektiert werden. Innerhalb dieses QTL befinden sich Gene wie „apolipoprotein E“ (*APOE*), „transforming growth factor, beta“ (*TGFb*) und „nerve growth factor“ (*NGF*), welche bereits im Zusammenhang mit einer TSE-Erkrankung publiziert wurden (Moreno *et al.*, 2003).

Die bisher einzige Analyse der Scrapie-QTL am Schaf (*Ovis aries*, OAR) wies einen QTL auf OAR 18 zwischen den Markern TGLA122 und MCMA26 auf der Chromosomenbande 18q24 aus (Moreno *et al.*, 2002). Der telomere Bereich des Chromosoms OAR 18 wurde hochauflösend in einer „Radiation Hybrid“-Karte dargestellt und bildet die Basis für die weitergehende Bestimmung positioneller Kandidatengene für eine differente Scrapie-Empfindlichkeit (Laurent *et al.*, 2007). Der Vergleich der Genome von Maus und Schaf zeigt, dass die Chromosomenbande 18q24 mit kleinen Segmenten von MMU 2 und MMU 12 übereinstimmt, in denen bereits Scrapie-QTL kartiert wurden (Moreno *et al.*, 2002). In Hinblick auf allgemeine genetisch beeinflusste Mechanismen der Prionenerkrankungen sind Parallelen in der QTL-Analyse von Bedeutung. So wurden z. B. BSE-QTL der Maus auf MMU 2 und MMU 11 (Lloyd *et al.*, 2002) bzw. beim Rind auf BTA 10, welches wiederum homolog zum MMU 9 ist, kartiert (Hernandez-Sanchez *et al.*, 2002). Gene innerhalb der QTL-Bereiche auf den Chromosomen stellen positionelle Kandidatengene einer differenten Scrapie-Empfindlichkeit dar.

2.3.2 Faktor Infektionsquelle

Wie in Kapitel B 2.2 beschrieben, führt der natürliche Infektionsweg der Prionen überwiegend über die Nahrungsaufnahme des Pathogens in den Magen-Darm-Trakt. Dabei spielt der *PRNP*-Genotyp des Wirttieres eine wesentliche Rolle. Weiterhin können die Tiere über Scarifizierung der Haut infiziert werden, ein Vorgang, der ebenfalls als natürlicher Infektionsmechanismus gilt und erfolgreich am Mausmodell demonstriert wurde (Taylor *et al.*, 1996). Hierbei erfolgt die Aufnahme des Erregers nach einer Verletzung über die Haut ohne Einbezug der Gewebe des Magen-Darm-Traktes, jedoch mit Hilfe der neutrophilen Granulozyten (Gossner *et al.*, 2006). Als dritte natürliche Infektionsquelle ist die Übertragung über die Bindehaut bereits infizierter Tiere denkbar (Haralambiev *et al.*, 1973). Die

Kontamination der Umwelt der Tiere insbesondere Weiden, Ställe und Futter mit dem Pathogen, führt zu einer jahrelangen Verseuchung und wiederkehrenden Neuinfektionen (Brown & Gajdusek, 1991). Neben den drei Formen der horizontalen Infektion und Ausbreitung steht die vertikale Transmission der PrP^{Sc} über die Plazenta und das Fruchtwasser im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen (Andreoletti *et al.*, 2002). Insbesondere zeigen nachweisbare Wechselwirkungen zwischen dem *PRNP*-Genotyp des Muttertieres und der Föten Einfluss auf die Infektiösität der Plazenta im langjährigen Verlauf einer Scrapie-Infektion (Race *et al.*, 1998).

Durch die verschiedenen Eintrittsmöglichkeiten des PrP^{Sc} ergeben sich unterschiedliche Infektionswege, die in direktem Zusammenhang mit der Inkubationszeit oder auch der Infektionsabwehr stehen. In tierexperimentellen Ansätzen wurden die unterschiedlichsten Probanden erfolgreich über intraperitoneale, intracerebrale, intramuskuläre, intraoculare und intravenöse Injektion mit Scrapie infiziert. An dem häufig verwendeten und am besten untersuchten Mausmodell lassen sich definierte Inkubationszeiten in Abhängigkeit von der Infektionsmethode reproduzieren. Dies bestätigt wiederum den festgelegten Infektionsweg der pathogenen Prionen in Abhängigkeit von der Eintrittsstelle der PrP^{Sc}. Neben dem Eintrittspunkt des Pathogens hat auch dessen Prionenstamm Einfluss auf die Ausprägung der Scrapie (Goldmann *et al.*, 1994; Langeveld *et al.*, 2006). Scrapie-Stämme werden über Maus-Bioassays charakterisiert, sodass bisher 20 Scrapie-Stämme der Maus definiert werden konnten (Bruce *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 2002). Über diese Methoden wurden bisher fünf Stämme der klassischen Scrapie beim Schaf identifiziert, wobei in Deutschland über biochemische Methoden mindestens zwei Scrapie-Stämme nachgewiesen wurden, welche sich von BSE beim Schaf und der atypischen Scrapie unterscheiden (Gretzschel *et al.*, 2005).

2.3.3 Physiologische Einflussfaktoren

Die epidemischen Beobachtungen der Scrapie-Ausbrüche in natürlich erkrankten Schafherden führten zur Erkenntnis, dass auch physiologische Faktoren die Prionenerkrankung beeinflussen. So wird die Epidemiologie der Scrapie innerhalb einer Herde maßgeblich durch das Herdenmanagement beeinflusst, da hiervon der allgemeine Gesundheitsstatus der Schafe abhängt. Es konnte gezeigt werden, dass in gesunden Herden eine wesentlich größere Anzahl an Tieren des empfindlichen *PRNP*-Genotyps aus gesundheitlichen Gründen aus der Herde gemerzt werden, als solche mit resistentem Genotyp (Chase-Topping *et al.*, 2005). Dies weist auf einen allgemein schwächeren Gesundheitsstatus der Scrapie-empfindlichen Schafe hin. Weiterhin entscheidet das Weideflächenmanagement über den Infektionsdruck, z. B.

hervorgerufen durch Nematoden und Heumilben, der auf das Individuum einwirkt. Verschiedene Studien belegen, dass diese Pathogene als Vektor der Scrapie-Erkrankung fungieren können (Wisniewski *et al.*, 1996; Gruner *et al.*, 2004). In der Untersuchung natürlich Scrapie-infizierter Schafe war das Durchschnittsalter beim Auftreten der ersten Krankheitssymptome bei Tieren, die zuvor mit Nematoden infiziert wurden, deutlich geringer als in der Vergleichsgruppe (Elsen *et al.*, 1999). Die dazugehörigen Mechanismen sind noch unklar. Die einzelnen Einflussfaktoren der Scrapie stehen im Wechselspiel miteinander und sollten nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Das Zusammenwirken von genetischem Hintergrund, Infektionsweg, Prionenstamm und physiologischen Faktoren bestimmt, ob ein Tier an Scrapie erkrankt und wie sich die Inkubationszeit, der Krankheitsverlauf und die Symptomatik entwickeln.

3 „Expressionsprofiling“ Moderne Technologien zur Identifizierung funktionaler Kandidatengene

3.1 Microarray-Technologie

Es besteht eine Korrelation zwischen der Transkription und der Menge an Protein, die ein Organismus für die unterschiedlichsten Stoffwechselfvorgänge benötigt. In der Molekularbiologie existieren verschiedene Verfahren zur Bestimmung des mRNA-Niveaus, wie *in situ*-Hybridisierung (ISH), Northern Blot, RNase Protection Assay (RPA), Differential Display (DD) und Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)-Techniken. Diese Methoden unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Sensitivität als auch in Bezug auf den Umfang der zu untersuchenden Proben (Bustin, 2002). Mit der Microarray-Technologie ist es dagegen möglich, simultan eine hochsensitive Messung der Transkriptmenge von mehreren tausend Genen vorzunehmen. Die Stärke der Microarray-Technologie liegt in der beständig steigenden Anzahl der zeitgleich zu untersuchenden Transkripte, sodass man durch diese Weiterentwicklung von einem holistischem oder offenem Versuchsansatz reden kann. Die Analyse der Transkription zu einem bestimmten Zeitpunkt beschränkt sich nicht mehr auf eine begrenzte und subjektiv selektierte Anzahl von Transkripten, sondern wird auf das verfügbare Transkriptom des jeweiligen Organismus erweitert.

Die Verwendung der Microarrays kam in den frühen 90er Jahren des 20. Jahrhunderts auf, als es gelang, Peptide an Silikonchips zu synthetisieren (Fodor *et al.*, 1991). Die Übertragung auf

die DNA-Ebene erfolgte aufgrund der hohen Spezifität zwischen der an Membranen gebundenen Einzelstrang-DNA und RNA (Gillespie & Spiegelman, 1965), verbunden mit der Technik der Photolithographie und der Oligonukleotid-Synthese (Anonymus, 1996). Die qualitative Analyse der mRNA sowie die semi-quantitative näherungsweise Messung der mRNA erlauben es, Schlussfolgerungen über den molekularen Zustand einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt zu ziehen. Aus diesen Erkenntnissen heraus wird das Verständnis für die biologischen Mechanismen der entsprechenden Fragestellung erhöht. In der Anfangsphase fanden im Wesentlichen zwei Arten von Microarrays gleichwertig Verwendung - Oligonukleotid-Arrays (Lockhart *et al.*, 1996; Lockhart & Winzler, 2000) und cDNA-Arrays (Duggan *et al.*, 1999). Heute sind cDNA-Arrays durch das bioinformatisch einfachere Design von Oligonukleotid-Arrays nahezu vollständig abgelöst (Elvidge, 2006). Die innerbetrieblich selbst entwickelbaren, relativ preiswerten Microarrays können an die jeweilige Fragestellung angepasst werden. Sie haben außerdem den Vorteil, dass die Sonden sequenzspezifisch aus dem gesamten Genom gezielt ausgewählt werden können, wodurch sich Kreuzhybridisierungen minimieren lassen. Ihre Nachteile liegen in der langen Optimierungszeit des Arrays und der teuren Erstsanschaffung des Array-Spotting Equipment. Kommerziell verfügbare Microarrays sind weniger flexibel, jedoch fand bereits eine Weiterentwicklung der Array-Vielfalt in Hinsicht auf die unterschiedlichen biologischen Fragestellungen z. B. über „tissue Microarrays“, „SNP Microarrays“ oder die Analyse regulatorischer Sequenzen der DNA über „ChIP Microarrays“ statt (Mockler *et al.*, 2005; Chaudhuri, 2005).

Ein weiteres wesentliches Unterteilungsmerkmal der Microarray-Technologie ist die Fluoreszenzmarkierung der mRNA-Probe. In einem Einfarben-Experiment erfolgt die Markierung indirekt über biotinylierte dNTP als Anker für den Fluoreszenzfarbstoff, während in einem Zwei-Farben-Experiment direkt oder indirekt, alternativ Cy3-UTP und Cy5-UTP während der cRNA-Synthese eingebaut werden (Garosi *et al.*, 2005). Das Ergebnis der Hybridisierung der fixierten DNA auf dem Array mit der fluoreszenzmarkierten cRNA wird über einen Microarray-Scanner und dazugehörige Software aufgenommen. Die hohe Anzahl parallel analysierter Gene erforderte zudem eine neue Form der Datenanalyse. Die bioinformatischen Ansätze umfassen allgemein die computergestützte Qualitätskontrolle (Bildanalyse), die Kalibrierung der Messdaten (Normalisierung), die neuartige, an die Datensätze angepasste, statistische Analyse und schlussendlich die Interpretation der

Ergebnisse z. B. über funktionelle Zuordnung (Hariharan, 2003; Leung & Cavalieri, 2003). Die wachsende Anzahl verfügbarer Methoden und dazugehöriger Optionen, angepasst an das jeweilige experimentelle Design, spiegelt sich in der Vielzahl nicht miteinander vergleichbarer Microarray-basierter Untersuchungen wider. Erste Schritte zur Konsolidierung der Microarray-Technologie sind von der „Microarray gene expression data society“ (MGED) über die Veröffentlichung der Richtlinien „Minimal information about a microarray experiment“ (MIAME) gemacht (Brazma *et al.*, 2001).

3.2 Echtzeit Reverse Transkriptase-PCR

Die semi-quantitative Methode der Microarray-Hybridisierung gibt einen Überblick über das Expressionsniveau tausender Gene, die zeitgleich unter standardisierten Bedingungen analysiert wurden. Die Messung der absoluten Transkriptmenge einzelner Gene bedarf einer anderen Technologie. Durch die Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) können kurze und spezifische Abschnitte der DNA kopiert und amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1985). Für das zu vervielfältigende DNA-Fragment werden zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) gesucht, die eine komplementäre Sequenz zur Matrix bilden und deren 5'-Ende die Produktlänge begrenzt. Die DNA-Polymerase braucht einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA, um einen Startpunkt zu finden. Die zu amplifizierende DNA wird bei einem bestimmten Ionenmilieu, mit Primern, Nukleotidtriphosphaten (dNTP) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase, ein rekombinantes und modifiziertes Enzym des Bakterium *Thermus aquaticus*) innerhalb kurzer Zeit mit exponentiell ansteigender Kopienzahl repliziert. Dabei verläuft die Reaktion in sich wiederholenden Schritten von Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Primerverlängerung (Extension).

Darauf aufbauend hat sich die Methode der Echtzeit RT-PCR entwickelt (Higuchi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Die Weiterentwicklung besteht darin, dass als Template nicht DNA, sondern cRNA verwendet wird. Hierfür wird die mRNA mit einem Poly(dT)-Primer gekennzeichnet und dem Umschreibungsprozess durch eine Reverse Transkriptase unterzogen. Die Ausbeute der Reversen Transkription hängt im Wesentlichen von der Qualität bzw. Aktivität der verwendeten Reversen Transkriptase ab. Der Vergleich gebräuchlicher Reversen Transkriptasen hat gezeigt, dass mit der SuperScript II die höhere Ausbeute zu erzielen ist (Stahlberg *et al.*, 2004). Während der Echtzeit-PCR der cRNA werden analog zu der Amplifikation Fluoreszenz-Reporter eingebettet, deren generiertes

Fluoreszenzsignal den Ertrag des Amplikons bis hin zum Sättigungsbereich widerspiegelt. Bis heute ist dies die einzige Möglichkeit der Transkriptmengen-Detektion in der Echtzeit RT-PCR.

Es werden drei chemische Gruppen der Fluoreszenzfarbstoffe aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen unterschieden sogenannte interkalierende Farbstoffe, FRET Farbstoffe und LUX™ Primer (Wong & Medrano, 2005; Kubista *et al.*, 2006). Zu den interkalierenden Farbstoffen gehören Ethidiumbromid, SYBR Green I und die unsymmetrischen Cyanine BEBO, BETO und BOXTO. Die Gruppe der „Fluorescence resonance energy transfer“, kurz FRET Farbstoffe, umfasst die „Molecular beacons“, Taqman-Sonden, Hybridisierungs-Sonden, Scorpions-Sonden und Light Cycler-Sonden, deren Prinzipien auf der Anwesenheit von Reporter-Fluoreszenzfarbstoffen und Quencher-Fluoreszenzfarbstoffen beruhen. Als drittes finden „Light upon extension“, kurz LUX™ Primer, die zugleich Fluoreszenz- und Quencher-Einheiten enthalten, Verwendung. Für die absolute Quantifizierung werden in nicht-kompetitiven Ansätzen synthetische RNA Moleküle, so genannte „Spikes“, innerhalb der cRNA-Probe verwendet. Im kompetitiven Ansatz wird ein interner Standard in Form einer Verdünnungsserie mit bekannter Kopienzahl des Amplikons eingesetzt. Über den Vergleich der bekannten Konzentration der „Spikes“ oder Standards mit der Probe kann die absolute Kopienzahl je eingesetzter cRNA-Menge berechnet werden (Bustin, 2000).

C Material und Methoden

1 Versuchstiere und Gewebeproben

Die Identifizierung und Auswahl von Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition bezüglich der Ausprägung von Scrapie beim Schaf erfolgte anhand der *PRNP*-Genotypen klassifiziert nach Dawson *et al.* (1998) (Tabelle 1). Mittels der „Taq cycle“-Sequenzierungsmethode (Goldmann *et al.*, 1991) mit dem DNA-Sequenzierautomaten Modell 310C (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden 115 weibliche Tiere der Rasse Texel der Herde eines Betriebes in Mecklenburg-Vorpommern typisiert. Je vier Tiere des Genotyps ARR/ARR (Risikoklasse R1) und drei Tiere bzw. ein Tier des Genotyps VRQ/ARQ bzw. VRQ/VRQ (Risikoklasse R5) wurden im Alter von 7–8 Monaten zeitgleich unter standardisierten Bedingungen (Fütterungszustand, Alter, Gesundheitsstatus) geschlachtet. Insgesamt wurden sechs Gewebe (Tabelle 2), die eine Bedeutung im mutmaßlichen Infektionsweg bzw. für den Stoffwechsel haben, in definierten Bereichen entnommen. Sie wurden in Stickstoff schock gefroren, mit Mörser und Pistel zu Gewebepuder verarbeitet und bis zur Nukleinsäure-Isolierung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2: Standardisierte Gewebeprobenentnahme von 7–8 Monate alten weiblichen Texelschafen aus der Schlachtung vom 09.01.2003.

Bereich	Gewebeprobe	Beschreibung
Magen-Darm-Trakt:	Jejunum	-
	Ileum (Peyer'sche Platten)	Darmwand (nicht nur Schleimhaut) aus dem Bereich der Peyer'schen Platten
Schädel:	retropharyngeale Lymphknoten	dorsal auf dem Pharynxdach oder caudal der Parotis-Oberfläche gelegen
	Stammhirn	Pons bzw. Medulla oblongata
Organe:	Milz	Probe aus dem Organkörper
	Leber	Probe aus dem Organkörper

2 Methoden

2.1 Gewinnung von Nukleinsäuren

2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach gebräuchlicher Laborpraxis (Sambrook & Maniatis, 1989). Demnach wurden 30 mg Gewebepuder mit 700 µl Tris-Puffer und 20 µl Proteinase K für 12 h bei 55 °C inkubiert. Die Trennung der Phasen erfolgte mit 700 µl Phenol (pH 8,0) und anschließender Zentrifugation (4 °C, 14.000 rpm, 3 min) in der Beckmann Kühlzentrifuge CL GS-6R. Die obere farblose Phase wurde mit 700 µl PCI (1:1) und durch Zentrifugation (4 °C, 12.000 rpm, 2 min) wiederholt aufgetrennt. Die Fällung der genomischen DNA innerhalb der farblosen Phase erfolgte über die Zugabe von 70 µl Na-Acetat (3 M, pH 6,0) und 700 µl Ethanol (99,8 %). Die ausgefällte DNA wurde in 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 100 µl 1 x TE Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Lösung des Sediments wurde durch Inkubation (65 °C, 5 min) erleichtert und für 2 d bei 4 °C fortgeführt.

2.1.2 RNA Isolierung

2.1.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus den genannten Geweben wurden der RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) sowie DEPC behandeltes Wasser, RNase-freie Reagenzien und RNase-freie Gefäße verwendet. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 50 mg Gewebepuder mit 1,5 ml RLT Lysispuffer im „Ultra Turrax T25 basic“ (11.000–24.000 rpm) homogenisiert. Der Überstand des Lysates wurde nach Zentrifugation (14.000 rpm, 30 min) in der Eppendorf Zentrifuge 5417C sofort in 1,5 ml Ethanol (70 %) überführt und durchmischt. Die Trennung der Gesamt-RNA aus dem Lysat erfolgte über die RNeasy[®]-Zentriersäule und Zentrifugation (10.000 rpm, 30 sec). Die an die Silicat-Gel-Membran gebundene RNA wurde in mehreren Waschschritten mit 700 µl RW1 Waschpuffer und anschließendem 500 µl RPE Waschpuffer gereinigt. Die Zentrifugenschritte wurden 30 sec bei 10.000 rpm durchgeführt, wobei ein abschließender Zentrifugenschritt von 2 min bei 14.000 rpm sicherstellte, dass kein Alkohol übertragen wurde. Die Eluation erfolgte mit 2 x 50 µl 0,01 M Tris-Lösung (pH 7,5)

direkt auf der Säulenmembran und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Die Gesamt-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol

Eine höhere RNA-Ausbeute erzielt man durch einen stärkeren Aufschluss der Zellen mit Trizol. Alternativ wurden daher entsprechend Angaben des Herstellers 50 mg Gewebepuder in 1 ml gekühltem TRI[®] Reagent (Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim) gelöst und unter Verwendung von einer Omnifix[®] Einmalspritze (50 ml) mit einer Sterican[®] Einmalinjektionskanüle (Roth, Karlsruhe) geschert. Durch die Durchmischung mit 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation (4 °C, 12.000 rpm, 15 min) bilden sich drei Phasen aus. Die obere, farblose Phase wurde wiederholt mit 500 µl Phenol/Chloroform (5:1) gemischt und unter den Bedingungen 4 °C, 12.000 rpm, 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Lysat erneut mit 500 µl Chloroform behandelt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm, 30 min). Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol (80 %) gewaschen, zentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm, 10 min) und vom Alkohol bereinigt. Die DNase-Verdauung erfolgte nach Lösung des Pellets in 37 µl DEPC behandeltem Wasser mit DNase I (Qiagen, Hilden) für 1 h bei 37 °C. Die erneute Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers über RNeasy[®]-Zentriersäule des RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden). Die Eluation erfolgte 2 x mit 30 µl DEPC behandeltem Wasser im 1,5 ml Sammelreaktionsgefäß, welches 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert wurde. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.2.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus fetthaltigem Gewebe

Für fetthaltiges Gewebe, wie dem Stammhirn, wurde das RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden) mit einer Phenol/Guanidin basierten Zell-Lyse nach Angaben des Herstellers verwendet: 80 mg Gewebepuder wurden mit 1 ml QIAzol[®] Lysis Reagent im „Ultra Turrax T25 basic“ (11.000–24.000 rpm) homogenisiert und mit 200 µl Chloroform durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation und Phasenbildung analog zu Kapitel C 2.1.2.2. Die obere, farblose Phase wurde mit 600 µl Ethanol (70 %) vermischt und in der RNeasy[®]-Zentriersäule des RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden) durch Zentrifugation (10.000 rpm, 20 sec) aufgetrennt. Nach einem Reinigungsschritt schloss sich die DNase I-Verdauung (Qiagen, Hilden) für 15 min bei Raumtemperatur direkt auf der Säulenmembran an. Die Verdauung wurde durch mehrere

Waschschritte beendet. Die Eluation erfolgt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 2 x 30 µl 0,01 M Tris-Lösung (pH 7,5) bei 10.000 rpm für 1 min. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Quantifizierung und Qualitätsprüfung

Die Quantität der DNA und RNA wurde über eine spektrophotometrische Messung mit dem Nano Drop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Wilmington, Delaware USA) bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Verhältniswert zwischen den Wellenlängen λ 260/280 gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäuren und liegt im Idealfall für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0. Der Absorptionswert für „reine“ Nukleinsäuren wird durch den ratio λ 260/230 angegeben und sollte höher als der ratio λ 260/280 sein. Als Qualitätskriterium für die im Rahmen dieser Arbeit isolierte RNA bzw. DNA galten Verhältniswerte zwischen 1,8 und 2,2, wobei sich die Mehrheit der Messwerte um den Idealwert bewegte.

Auf einem Agarose-Gel wurden sowohl DNA als auch RNA auf Degenerationserscheinungen überprüft. Die DNA ergab auf einem 1,5 M Agarose-Gel eine scharfe Bande, während die RNA auf dem 2,2 M Formaldehyd-Gel deutlich in eine 18 S- und eine 28 S-Bande auftrennte.

2.2 Microarray-Hybridisierung

Für das „Expressionsprofiling“ an fünf ausgewählten Geweben (Ileum im Bereich der Peyer'schen Platten, Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten, Stammhirn und Leber) wurde die Microarray-Technik ausgewählt. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht kommerziell verfügbaren Microarrays des Schafes wurde eine heterologe Chip-Hybridisierung mit Oligonukleotid-Arrays durchgeführt. Hierfür standen der „human 10k array“, „rat 10k array“ und „mouse 10k array“ der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) zur Verfügung. Für die vergleichende Analyse kamen alternativ markierte RNA-Pools der beiden experimentellen Gruppen R1 und R5 zur Anwendung. Die Chip-Hybridisierung wurde für die zu bearbeitende Frage modifiziert und etabliert. Es kamen verschiedene Kit-Systeme nach Empfehlung des Herstellers auf Grundlage des Protokolls MWG Diagnosis (2002) zur Anwendung.

2.2.1 Erst- und Zweit-Strang-Synthese

Mit dem „cDNA Synthesis System“ (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Erst-Strang-Synthese durchgeführt. Für die Primeranlagerung wurden 15 µg der Gesamt-RNA in 19 µl

RNase freiem Wasser mit 2 μ l Oligo[(dT)₂₄T7promotor]₆₅ Primer (100 μ M) 10 min bei 70 °C im „PCR express thermal cycler“ (Hybaid, Ashford, UK) inkubiert. Dieses Gerät wurde in allen weiteren Inkubationsschritten verwendet. Im Folgenden wurde der Ansatz mit einem 19 μ l-Mastermix, bestehend aus nachstehenden Komponenten, durch auf- und abpipettieren vermischt und für 60 min bei 42 °C inkubiert.

Mastermix:	5 x Reverse Transkriptase Puffer	8 μ l
	0,1 M DDT	4 μ l
	AMV Reverse Transkriptase	2 μ l
	RNase Inhibitor 25U/ μ l	1 μ l
	dNTP Mix (10 mM je Nukleotid)	4 μ l

Die anschließende Zweit-Strang-Synthese der cDNA erfolgte unter Zugabe eines 110 μ l-Reaktionsgemisches, das sich wie folgt zusammensetzt:

Reaktionsmix:	5 x Zweitstrang-Puffer	30 μ l
	dNTP Mix (10 mM je Nukleotid)	1,5 μ l
	Enzym-Mix (DNA Polymerase I, <i>E. coli</i> Ligase, RNase H)	6,5 μ l
	RNase freies Wasser	72 μ l

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 16 °C. Zur Erstellung „glatter Enden“ der dsDNA aus der Zweit-Strang-Reaktion wurden 20 μ l T4 DNA Polymerase (20 U) hinzugefügt und unter gleichen Temperaturbedingungen für 5 min inkubiert. Diese Reaktion wurde mit 17 μ l EDTA (0,2 M, pH 8,0) gestoppt und vorhandene RNA mit 1,5 μ l RNase I (15 U) durch Inkubation (37 °C, 30 min) abgebaut. Einer Proteinkontamination wurde durch 5 μ l Proteinase K (3 U) bei gleichen Inkubationsbedingungen entgegengewirkt. Die entstandene doppelsträngige DNA wurde mit dem „High Pure RNA Tissue Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) bei Raumtemperatur gereinigt und auf ihre Konzentration überprüft.

2.2.2 Transkription und Labeling der cRNA

In der folgenden *in vitro* Transkription wurde die doppelsträngige DNA wiederum in cRNA umgeschrieben. Hierbei wurden zusätzlich fluoreszenzmarkierte FluoroLink Cy3-UTP oder alternativ FluoroLink Cy5-UTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung des MEGAscript™ T5 Kit (Ambion, Austin, USA) nach Empfehlung des Herstellers in die

cRNA eingebettet. Das vorgegebene Protokoll MWG diagnosis (2002) wurde entsprechend der Ergebnisse von Vorversuchen und dem gewählten experimentellen Design angepasst und optimiert. Hierfür wurden 500 ng dsDNA im Vakuum-Konzentrator (Progen Scientific Ltd, Mexborough, South Yorkshire, UK) getrocknet. Das eingekühlte Reaktionsgemisch, bestehend aus 6 µl ATP/CTP/GTP-Stammlösung (75 mM), 2 µl U-nukleotide Stammlösung (50 mM), 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl DEPC behandeltem Wasser, wurde vorsichtig mit der getrocknete dsDNA gemischt. Die gelöste dsDNA wurde mit 5 µl Cy5-UTP (5 mM) und 4 µl T7 Enzym-Mix oder alternativ mit 5 µl Cy3-UTP (5 mM) und 4 µl T7 Enzym-Mix über Inkubation (37 °C, 16 h) im Wasserbad fluoreszenzmarkiert. Die markierte kopierte RNA (cRNA) wurde in abgedunkelter Umgebung bei Raumtemperatur ebenfalls mit dem „High Pure RNA Tissue Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) gereinigt (Kapitel C 2.2.1). Die Eluation der cRNA erfolgte mit 40 µl Eluationspuffer, welcher zweimal durch dieselbe „High Pure“ Filter Säule gegeben wurde.

2.2.3 Fragmentierung und Reinigung der cRNA

Die markierte cRNA benötigt für ihre Hybridisierung als Sonde auf den MWG DNA Array eine optimale Länge von 35 bp bis 200 bp. Nach Angaben des Herstellers wurden jeweils 15 µg der Cy3- bzw. Cy5-markierten cRNA in 48 µl DEPC behandeltem Wasser zusammenpipettiert und mit 12 µl 5 x Fragmentationspuffer vorsichtig gemischt. Die Fragmentation erfolgte über Inkubation (94 °C, 15 min) mit einem anschließenden Temperatursturz auf Eis. Die Reinigung und Aufkonzentrierung der cRNA erfolgte über „Mikrocon YM-10 concentrators“ (Millipore™, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die cRNA im Vakuum-Konzentrator (Progen Scientific Ltd, Mexborough, South Yorkshire, UK) bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.4 Hybridisierung oviner cRNA mit dem „human 10k array“

Da, wie unter Kapitel C 2.2 beschrieben, zum Zeitpunkt der Experimente keine DNA-Chips für die Spezies *Ovis aries* zur Verfügung standen, wurde die heterologe Chip-Hybridisierung mit dem „human 10k array“ von MWG Diagnosis (Ebersberg) durchgeführt. Der „human 10k array“ detektiert mit 10.368 Spots 9.984 genspezifische Oligonukleotid-Sonden (9.850 Gene, 30 Replikas, 104 *Arabidopsis* Kontrollen) mit einer Länge von 50 mer, die auf einem Glasobjektträger fixiert sind.

Für die Hybridisierung wurde 1 ml Hybridisierungspuffer jeweils frisch aus folgenden Chemikalien angefertigt.

Hybridisierungspuffer:	1 M Na-Phosphat (pH 8,0)	50 µl
	99,8 % Formamid	500 µl
	20 x SSC	300 µl
	50 x Denhardts Lösung	100 µl
	10 % SDS	50 µl

Die getrocknete cRNA wurde in 35 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert und für 3 min bei 94 °C erhitzt und sofort für maximal 3 min auf Eis gebracht. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix an zentrifugiert und mit Hilfe des „PAN array finder“ (MWG Biotech AG, Ebersberg) ohne Blasenbildung auf die gespottete Fläche des Objektträgers pipettiert. Zum Schutz der Hybridisierungsreaktion erfolgte ein Abdecken des Objektträgers mit einem Deckglas und eine Abdichtung mit Vulkanisierungsflüssigkeit. Die Reaktion verlief für 16 h bei 42 °C im abgedunkelten Wasserbad.

2.2.5 Waschen der hybridisierten Arrays

Zur Entfernung nicht gebundener RNA-Proben und überschüssiger Hybridisierungslösung wurden die hybridisierten Arrays für je 5 min in 200 ml Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS), Waschpuffer 2 (1 x SSC) und Waschpuffer 3 (0,5 x SSC) bei 32 °C gewaschen. Zuvor wurden Vulkanisierungsflüssigkeit und Deckglas vorsichtig entfernt. Die Trocknung erfolgte im 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß mit Deckel durch Zentrifugation (2 min, 1.600 rpm) in der Heraeus Labofuge 400 (Heraeus Instruments, Düsseldorf) mit „Swing out“-Rotor. Die getrockneten Arrays wurden bis zum Scan-Vorgang bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

2.3 Bilderfassung, -bearbeitung und -auswertung

Der Auswertungsprozess lässt sich allgemeingültig in folgende Stadien einteilen.

- a) Aufnahme der Hybridisierungssignale über ein konfokales Lasermikroskop (-scanner)
- b) Umwandlung digitaler Daten in numerische Daten über die Bildanalyse
- c) Filtern der Daten, um verlässlich detektierte Signale von Artefakten zu trennen
- d) Normalisierung der Signalintensitäten innerhalb jedes Arrays und zwischen den Arrays

2.3.1 Arrayscan

Die DNA-RNA-Hybridisierungsreaktion der konkurrierenden alternativ fluoreszenzmarkierten cRNA-Proben wurde vom 428 Array Scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara) mit einem konfokalen Laserscanner aufgenommen. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes (Tabelle 3) werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren detektierbare Lichtsignale. Die resultierenden Fluoreszenzsignale des DNA-Arrays im spezifischen Emissionsbereich wurden aufgenommen und in ein entsprechendes Falschfarbenbild umgewandelt.

Tabelle 3: Absorptions- und Emissionswerte der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FluoroLink™ Cy5-UTP und FluoroLink™ Cy3-UTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Farbstoff	λ max. Absorption [nm]	λ max. Emission [nm]
Cy5	651	674
Cy3	552	565

2.3.2 Bildanalyse

Für die Bildanalyse stand die Software ImaGene™ 5 (BioDiscovery Inc., Los Angeles) zur Verfügung. In einem ersten Schritt wurde die Adressierung der Spots („gridding“) und die Segmentation zur Abgrenzung einzelner Regionen auf dem Array vorgenommen. Nach Umwandlung des Farbwertes in einen Dezimalwert der Intensität und der Unterscheidung von Signal- und Hintergrundwerten erfolgt die Berechnung der tatsächlichen Intensität der Pixel, welche ein Oligonukleotid-Spot umfasst. Umfangreiche Informationen zu jedem Spot, die Rohdaten, wurden in tabellarischer Form ausgegeben, wobei eine Klassifizierung der Spotqualität vorgenommen wurde. Dies umfasst folgende Klassen: 0 gute Spotqualität, 1 fehlerhafte Spots, 2 leere Spots (keine Sonde), 3 schwache Spots (Signal < 2 s des Hintergrundes), 4 negative Spots (Signal < Hintergrund).

Mittels des Serviceprogrammes MAVI Pro 2.6.0 (MWG Biotech AG, Ebersberg) wurden die Spoteinzelmesswerte mehrerer Einstellungen der Photovervielfacherröhre zu einem Spotmittelwert des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes zusammengefasst. Diese Signalintensitäten wurden um den lokalen Hintergrund bereinigt und geben eine relative Angabe über die Menge des Transkriptes. Sie repräsentieren somit die relative Expression eines Gens. Dabei beträgt die minimale Signalintensität 150. Geringere Intensitäten werden als „nicht exprimiert“ definiert und aus dem Datensatz ausgeschlossen.

2.3.3 Normalisierung

Die Normalisierung dient der Glättung der Variation innerhalb eines Arrays und ihren Wiederholungen ($n = 3$). In einem Zwei-Farben-Hybridisierungsexperiment ist zusätzlich die Angleichung der beiden Farbstoffe innerhalb eines Arrays notwendig. Zur Auswertung der Oligonukleotid-Arrays wurde von MWG Biotech AG (Ebersberg) die Software GeneSight 3.5 (BioDiscovery Inc., Los Angeles) empfohlen. Die numerischen Daten der Cy3- und Cy5-markierten Spots wurden über einen Filter aufgrund der Qualität des Messsignals (Kapitel C 2.3.2) arrangiert und Fehlzeiten (Klasse 1, 2, 3, 4) aus dem Datensatz ausgesondert. Zur Korrektur von Intensitätsunterschieden aufgrund unterschiedlicher Farbstoffeigenschaften wurde eine Normalisierung der Intensitäten innerhalb eines Array durchgeführt. Die zusammengehörigen Signalwerte jedes Chips wurden über die LOWESS-Funktion (engl. locally weighted regression) normalisiert (Cleveland & Devlin, 1988). Das Verhältnis der experimentellen Gruppe R5 und der Gruppe R1 zueinander wird als Intensitäten-Ratio (\log_2) ausgedrückt:

$$\text{Ratio} = \log_2 (\text{Intensität Cy3-RNA-Sonde} / \text{Intensität Cy5-RNA-Sonde})$$

2.4 Echtzeit Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion

2.4.1 Reverse Transkription (RT)

Die zur RNA komplementäre cDNA wurde in Abhängigkeit von der Menge der isolierten RNA aus 2 μg Gesamt-RNA mit der SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) synthetisiert. Nach Empfehlung des Herstellers wurde für die Primeranlagerung die entsprechende Menge Gesamt-RNA in 6 μl autoklaviertes Wasser aufgenommen und mit 2 μl PolyT₁₂-Primer (50 pmol/ μl) 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgte für 50 min bei 42 °C unter Zugabe von 12 μl Reaktionsmix mit folgenden Komponenten.

Reaktionsmix:	0,1 M DTT	2 μl
	5 x Erst-Strang Puffer	4 μl
	10 mM ATP	1 μl
	10 mM GTP	1 μl
	10 mM CTP	1 μl
	10 mM TTP	1 μl
	RNasin	1 μl
	SS TM II Reverse Transcriptase	1 μl

Die Reverse Transkriptase wurde anschließend 15 min bei 75 °C inaktiviert. Es wird davon ausgegangen, dass bei diesem Umschreibungsprozess eine Konzentration von 100 ng/µl im 20 µl Ansatz besteht. Für die Inkubationsschritte wurde der „PCR express thermal cycler“ (Hybaid, Ashford, UK) verwendet. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 20 °C eingefroren.

2.4.2 Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

2.4.2.1 Primeroptimierung

Unter Nutzung des Programms Primer3 v.0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) wurden sequenzspezifische Primerpaare, abhängig von der Sequenzverfügbarkeit, homolog vom *Ovis aries* und alternativ heterolog vom *Bos taurus* abgeleitet. Die Synthese der Primer erfolgte durch Sigma Aldrich Chemicals (Steinheim). Zur Überprüfung der heterologen Primerpaare und zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurden sowohl die heterologen als auch die homologen Primerpaare bei drei Annealing-Temperaturen getestet (vorgegebene Temperatur Sigma Aldrich Chemicals ± 2 °C) und das Amplikon bezüglich eines eindeutigen Produktes sowie Amplikon-Länge auf einem Ethidiumbromidgel kontrolliert.

2.4.2.2 LightCycler[®]-PCR Protokoll

Für die Echtzeit PCR wurde das Protokoll des LightCycler[®] FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Empfehlung des Herstellers unter Verwendung der optimalen Annealing-Temperatur des jeweiligen Primerpaares (Tabelle 4) durchgeführt. Vor der Messung der Anzahl der Transkripte wurde die Schmelztemperatur des genspezifischen Produktes über die Messpunktbestimmung ermittelt. Diese wurde im Amplifikationszyklus der Transkriptmessung entsprechend eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte über 45 Zyklen und schloss mit einer Schmelzkurvenanalyse ab.

2.4.3 Nutzung von „Housekeeping“-Genen bei gesunden Texelschafen in der Echtzeit RT-PCR

Zur Verringerung systemischer Fehler innerhalb der Echtzeit RT-PCR wurde eine interne Normalisierung des Transkriptniveaus über ein „Housekeeping“-Gen einbezogen. In einem ersten Ansatz wurde das in der wissenschaftlichen Praxis häufig genutzte Gen „glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“ (*GAPDH*) in Betracht gezogen.

Tabelle 4: Primerbedingungen der verwendeten Primerpaare für die vergleichende Sequenzierung und Echtzeit RT-PCR in den Geweben Retropharyngeale Lymphknoten und Milz. (Abkürzungen: for, engl. forward Vorwärts-Primer; rev, engl. reverse Rückwärts-Primer; ID, Identifizierung; AT, Annealing-Temperatur; FT, Fluoreszenzmessung-Temperatur; A, Amplikongöße in Basenpaaren; *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *CLDN8*, „claudin 8“; *CR2*, „complement component receptor 2“; *CSF2*, „colony stimulating factor 2“; *DF*, „D component of complement“; *GNAI2*, „guanine nucleotide binding protein, α inhibiting activity polypeptide 2“; *GAPDH*, „glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“; *GPXI*, „glutathione peroxidase 1“; *HLA-DQA1*, „major histocompatibility complex, II, DQ α 1“; *IRF2*, „interferon regulatory factor 2“; *RPII*, „RNA polymerase II“; *PSME1*, „proteasome activator subunit 1“; *SELL*, „selectin L“; *TGFB1*, „transforming growth factor, β 1“; *VCAMI*, „vascular cell adhesion molecule 1“)

Locus	Array ID [<i>H. sapiens</i>]	Homologe ID [<i>B. taurus</i> , <i>O. aries</i>]	AT [°C]	FT [°C]	A [bp]	Sequenz 5'→3'
<i>CCL4</i> for <i>CCL4</i> rev	NM 002984	CN823667	63	84	158	tgactgtcctgtcctcctc gaggctgctggtctcgtagt
<i>CLDN8</i> for <i>CLDN8</i> rev	NM 012132	BF231401	63	86	166	aggcagccagaggactga accacgaggccagtgatg
<i>CR2</i> for <i>CR2</i> rev	NM 001877	NM 001009724	59	84	180	atgatcaagggacagcctc tgccctcaaaataatcca
<i>CSF2</i> for <i>CSF2</i> rev	NM 000758	NM 001009805	63	88	172	ctgctgtgtgatggatgaa gggcagtgttctttagtagg
<i>DF</i> for <i>DF</i> rev	NM 001928	CN824103	61	92	177	tagcagagcagtggtgatg ggctgtggtcgatagtctctg
<i>GNAI2</i> for <i>GNAI2</i> rev	NM 002070	CO202210	61	89	164	cctgtctccattctggttt acattggactcgggttgg
<i>GAPDH</i> for <i>GAPDH</i> rev	-	AF035421	61	88	139	gattgtcagcaatgcctcct agggccatccacagtttct
<i>GPXI</i> for <i>GPXI</i> rev	NM 000581	CD287239	63	86	155	cctggctgtactcggcttc ccttctgccattcacctc
<i>HLA-DQA1</i> for <i>HLA-DQA1</i> rev	L34093	CN823456	61	88	181	tgagattccagcccctatgt ggcagagcaccttccttcc
<i>IRF2</i> for <i>IRF2</i> rev	NM 002199	NM 001009740	59	82	182	gaaactgggccatccataca ctcagacatgggcagcctc
<i>RPII</i> for <i>RPII</i> rev	-	XM 876181	57	86	139	cagcccagctcaccagagt ggcgatgtgggtgagtattt
<i>PSME1</i> for <i>PSME1</i> rev	NM 006263	CF116986	59	82	172	aagccaagtggtgatgtgtc ggatcaggcactgggatgt
<i>SELL</i> for <i>SELL</i> rev	NM 000655	NM 174182	61	82	150	gggtgggaaccaacaatc cttctggcaggcatcatc
<i>TGFB1</i> for <i>TGFB1</i> rev	NM 000660	NM 001009400	61	89	171	gactgtccacctgcaagacc cgcggtactgtttaaagg
<i>VCAMI</i> for <i>VCAMI</i> rev	NM 001078	XM 614390	59	84	151	ccagatagacagccctctgaa ctccacctggattccctttt

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, zeigte der retropharyngeale Lymphknoten ein hohes durchschnittliches Transkriptniveau von 67.480 ± 3.160 Kopien/10 ng Gesamt-RNA, aber auch einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den gesunden Texelschafen der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5. Ebenso unterschieden sich die Transkriptmengen im Vergleich der experimentellen Gruppen in der Milz hoch signifikant ($p \leq 0,0002$) voneinander. Das durchschnittlichen Transkriptniveau der Scrapie-Risikoklasse R1 betrug 9.440 ± 560 Kopien/10 ng Gesamt-RNA bzw. 4.160 ± 420 Kopien/10 ng Gesamt-RNA in der Scrapie-Risikoklasse R5.

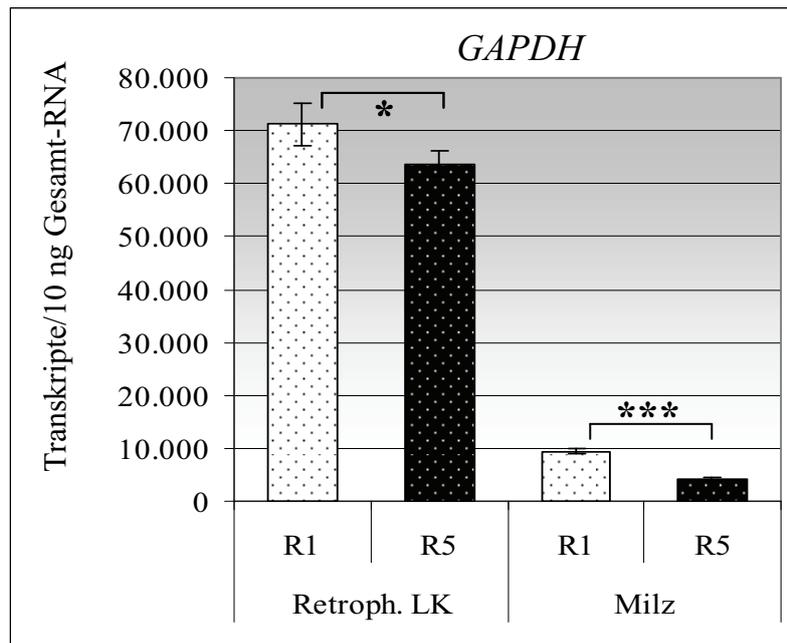


Abbildung 3: Mittels Echtzeit RT-PCR bestimmtes signifikant differentes mittleres Transkriptniveau ($n = 3$ Wiederholungen) des „Housekeeping“-Genes *GAPDH* in den Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 der Gewebe retropharyngeale Lymphknoten und Milz. (Abkürzung: R1, Scrapie-Risikoklasse; R5, Scrapie-Risikoklasse; Retroph. LK, retropharyngeale Lymphknoten; *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$)

Das „Housekeeping“-Gen „RNA polymerase II“ (*RPII*) hingegen zeigte in beiden Geweben eine konstante Transkriptrate in den Risikoklassen R1 und R5 bei den nicht-infizierten Tieren. Das Transkriptniveau wurde mit 5.270 ± 190 Kopien/10 ng Gesamt-RNA im retropharyngealen Lymphknoten bzw. 29.420 ± 130 Kopien/10 ng Gesamt-RNA in der Milz ausgewiesen (Abbildung 4).

Das mittlere Transkriptniveau der untersuchten Gene der Echtzeit RT-PCR wurde innerhalb jedes Laufes faktoriell um das Housekeeping-Gen *RPII* in den Geweben retropharyngeale Lymphknoten und Milz bereinigt.

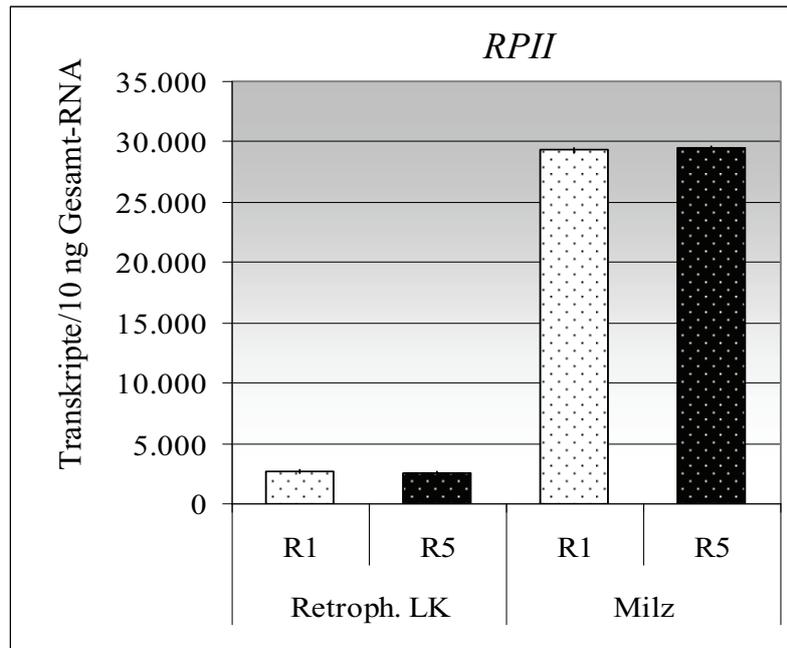


Abbildung 4: Mittleres Transkriptniveau (Echtzeit RT-PCR, n = 3 Wiederholungen) des „Housekeeping“-Genes „RNA polymerase II“ (*RPII*) der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 in den Geweben Milz und retropharyngealer Lymphknoten. (Abkürzung R1, Scrapie-Risikoklasse; R5, Scrapie-Risikoklasse; Retroph. LK, retropharyngeale Lymphknoten)

2.5 Vergleichende Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, Schwalbach) können aufgereinigte PCR-Produkte direkt in ihrem variablen Temperaturprofil (Tabelle 4, Tabelle 5) sequenziert werden. Die enzymatische Synthese eines komplementären DNA-Stranges erfolgte mit dem ABI PRISM® BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt) im „PCR express thermal cycler“ (Hybaid, Ashford, UK). Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden je 100 bp Matrizenlänge 5 ng Amplikon in 8 µl Reaktionsvolumen verwendet. Die Synthese des Matrizenstranges erfolgte in einer PCR-Reaktion mit 10 µl Mastermix, 1,5 µl Cycle Sequencing Mix und je 0,5 µl sequenzspezifischem Vorwärts-Primer (10 U) bzw. Rückwärts-Primer (10 U) unter den Zyklusbedingungen: Initialdenaturierung 1 min/96 °C, 25 Zyklen: Denaturierung 30 s/96 °C, Annealing: 30 s/variable Primertemperatur, Extension: 4 min/60 °C und einer abschließenden Kühlung auf 6 °C.

Die Rohdaten wurden mit der „Sequencing Analysis Software Version 3.0“ (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt) visualisiert. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software „Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.0.5.2.“ (Copyright© 1997-2005 Tom Hall, Department of Mikrobiologie, North Carolina State University).

Tabelle 5: Primerbedingungen zur vergleichenden Sequenzierung des kodierender Bereiches der different exprimierten Gene *VCAMI*, *SELL* und *HLA-DQA1*.

(Abkürzungen: for, engl. forward Vorwärts-Primer; rev, engl. reverse Rückwärts-Primer; ID, Identifizierung; AT, Annealing-Temperatur; A, Amplikongröße in Basenpaaren; *HLA-DQA1*, „major histocompatibility complex, II, DQ α 1“; *SELL*, „selectin L“; *VCAMI*, „vascular cell adhesion molecule 1“)

Locus	Array ID [<i>H. sapiens</i>]	Homolog ID [<i>B. taurus</i> , <i>O. aries</i>]	AT [°C]	A [bp]	Primer Sequenz 5'→3'
<i>VCAMI</i> for <i>VCAMI</i> rev	NM 001078	XM 614390	62,0	2075	tggatggtgttttagtttctca gacctgtcatgttgcttt
<i>SELL</i> for <i>SELL</i> rev	NM 000655	NM 174182	65,0	1164	tacgaaaggacggagcaaag tgtagaagatgccaccagca
<i>HLA-DQA1</i> for <i>HLA-DQA1</i> rev	L34093	CN823456	62,0	1075	gcaactgctgagaccacctt gggtcattggtggattaggt

2.6 Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen

In dieser Studie unterscheidet die Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) zwei Allele in Position nt 376 im „vascular cell adhesion molecule 1“ (*VCAMI*, ID: BV723473) in Assoziation mit der Scrapie-Risikoklasse (R1 vs. R5) in den acht Texelschafen (siehe Kapitel C 2.6). Die genomische DNA von 90 *PRNP*-genotypisierten Texel-Böcken des Landeskontrollverbandes (LKV) Mecklenburg-Vorpommern wurde in einer Frequenzanalyse ebenfalls auf diesen Polymorphismus in Assoziation zur Risikoklasse (R1, R2, R3, R4 und R5) untersucht. Die Amplifikation des Fragmentes (442 bp) erfolgte mit dem Vorwärts-Primer 5'-GCAACATGCAACCCTTTGT-3' und dem Rückwärts-Primer 5' CGAGAAGGTCACCTCCAAGC-3'. Diese wurden von der ovinen Sequenz als Ergebnis einer „nested PCR“ abgeleitet. Das PCR-Reaktionsgemisch enthielt 20 ng genomische DNA, 5 pmol je Primer, 8 mM je dNTP, 0,05 U *Taq* DNA Polymerase and 1 x Puffer für *Taq* DNA Polymerase. Die Amplifikation erfolgte innerhalb eines Standard-PCR-Zyklus mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C. Das entstandene Fragment enthält zwei Restriktionsschnittstellen des Enzyms ScrFI (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) mit der Kennung CC[^]NGG. Bei einem Nukleotidaustausch von C zu A in der Position nt 376 wurde eine der zwei Schnittstellen zerstört. Der Enzymverdau erfolgte durch Inkubation (37 °C/16 h) des Fragmentes mit ScrFI und anschließender DNA-Gelelektrophorese (3,5 %

Agarose-Gel) mit Ethidiumbromidfärbung bei 75 V in 1 x TBE Puffer. Die Produkte der ScrFI-Verdauung sind unter ultraviolettem Licht sichtbar (Abbildung 5).

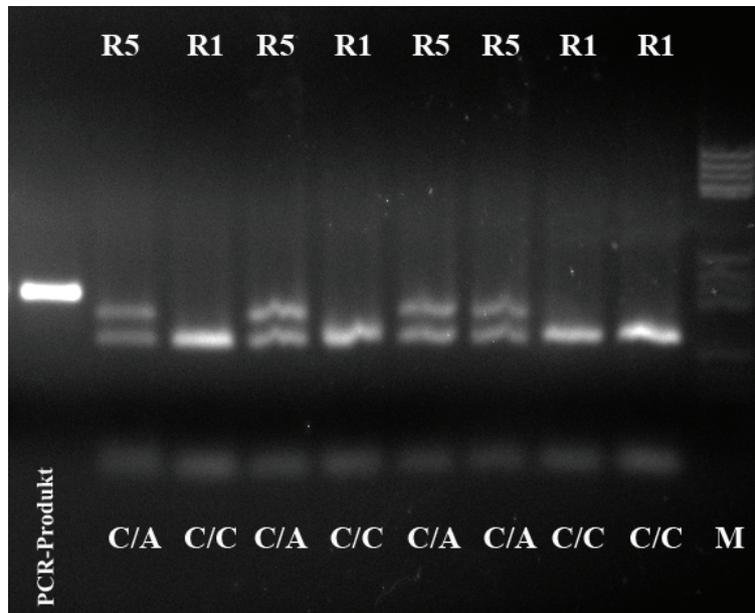


Abbildung 5: *VCAMI*-Genotypisierung (RFLP Analyse) an Position nt 376. Die Spaltung des 442 bp Fragments erfolgte über ScrFI-Enzymverdau (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main). Abbildung der Fragmente über Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung. (Abkürzungen: M, PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker; C/C, homolog Cytosin; C/A, heterolog Cytosin und Adenin; R1, Scrapie-Risikoklasse; R5 Scrapie-Risikoklasse)

2.7 Statistische Auswertung

Für die vergleichende heterologe Microarray-Analyse wurden zur statistischen Absicherung folgende Schwellenwerte angesetzt. In Anlehnung an publizierte Verfahrensweisen und unter Berücksichtigung von Ergebnissen zur Validierung Array-basierter Expressionsprofile (Rajeevan *et al.*, 2001) wurden solche Gene als „different exprimiert“ definiert, die sich im mittleren Transkriptionsniveau im zweiseitigen t-Test ($p \leq 0,05$) signifikant mindestens um den Faktor 2 von der jeweiligen Vergleichsgruppe unterschieden. Die statistische Analyse erfolgte mit der frei verfügbaren Software TIGR MultiExperiment Viewer 3.1 (The Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org/software/>). Zusätzlich wurde die Anzahl „falsch positiver“ Werte durch die Schätzung der „false discovery rate“ (FDR, $q \leq 0,05$) mit der Software QVALUE minimiert (Storey & Tibshirani, 2003).

Mit Hilfe der frei verfügbaren Programme GoMiner™ (Zeeberg *et al.*, 2003) und PathwayExplorer (Mlecnik *et al.*, 2005) erfolgte eine Zuordnung der different exprimierten Gene in bestehende physiologische Prozesse und Stoffwechselwege. Das signifikant

konzentrierte Auftreten different exprimierter Gene innerhalb eines Stoffwechselweges wurde mittels Fisher's Exact Test ($p \leq 0,05$) geprüft.

Die mittleren Transkriptraten (Anzahl Kopien/10 ng Gesamt-RNA, n = 3 Wiederholungen) der Echtzeit RT-PCR Messung wurden über die LightCycler[®] Software (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt und mittels zweiseitigem t-Test ($p \leq 0,05$) über die PROC TTEST-Prozedur (Base SAS[®] Version 9.1.3, SAS Institute Inc., 2006) auf signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen geprüft. Das relative Transkriptionsniveau zwischen den experimentellen Gruppen R1 und R5 wurde als $\text{ratio} = \frac{R1}{R5}$ (Anzahl Kopien/10 ng Gesamt-RNA) / R5 (Anzahl Kopien/10 ng Gesamt-RNA) ausgewiesen.

Die Frequenzanalyse der 90 Texel-Böcke erfolgte über den Vergleich der beobachteten und nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) erwarteten Genotyp-Häufigkeiten für den SNP C403A-*VCAMI* mit dem χ^2 -Test. Für die Frequenzanalyse und den χ^2 -Test des SNP C403A-*VCAMI* mit den Scrapie-Risikoklassen R1 bis R5 wurde die PROC FREQ-Prozedur des Programmpaket Base SAS[®] Version 9.1.3 verwendet (SAS Institute Inc., 2006).

D Ergebnisse

1 Heterologe Chip-Hybridisierung beim Schaf

1.1 Cross-Spezies-Hybridisierung oviner cRNA mit den Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*

Die parallele Hybridisierung alternativ markierter Cy3- bzw. Cy5-cRNA-Sonden oviner Leber mit verschiedenen kommerziell verfügbaren Microarrays (MWG Biotech AG, Ebersberg) diente der Selektion eines geeigneten Oligonukleotid-Arrays für die Cross-Spezies-Hybridisierung (Abbildung 6).

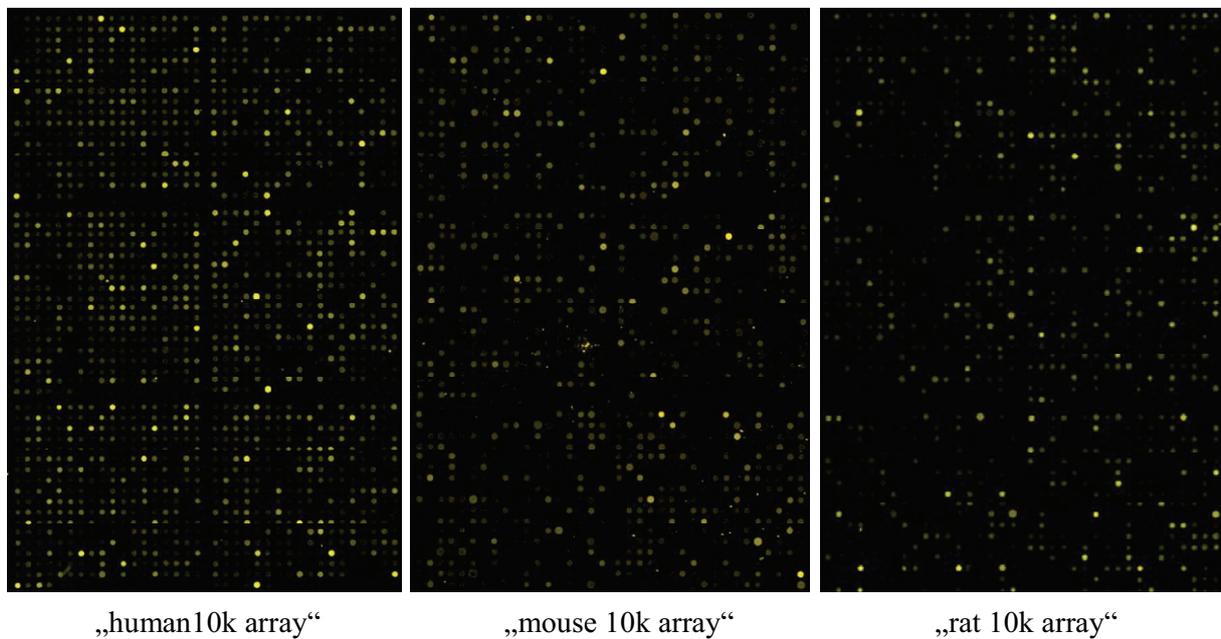


Abbildung 6: Auszug aus der Visualisierung der Hybridisierungsmuster von drei kommerziell verfügbaren Oligonukleotid-Arrays (MWG Biotech AG) mittels ImaGene™ (BioDiscovery Inc.). Falschfarbenbild der Fluoreszenzsignale nach vergleichender Cross-Spezies-Hybridisierung des „human 10k array“, „mouse 10k array“ und „rat 10k array“ mit ovinen alternativ markierten Cy3- bzw. Cy5-cRNA-Sonden der Leber.

Nach Maßgabe der größten Anzahl detektierter Hybridisierungssignale wurde der informativste Microarray für die heterologe Hybridisierung in diesem Versuchsansatz ausgewählt. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der getesteten Microarrays „human 10k array“, „rat 10k array“ und „mouse 10k array“ zusammengefasst. Mit 75 % Hybridisierungssignalen von etwa 10.000 Oligonukleotiden zeigte der „human 10k array“ die größte Anzahl

auswertbarer Gene. Die Spezies Ratte und Maus wiesen 52–54 % Hybridisierungssignale der 10.000 Oligonukleotide nach heterologer Hybridisierung mit oviner cRNA der Leber auf. Die funktionelle Zuordnung der Gesamtmatrix auf den Arrays der einzelnen Spezies ist bei Mensch und Maus mit 9.804 bzw. 9.600 verfügbaren Genannotationen sehr hoch. Die Annotation des „rat 10k array“ fiel mit 56 % Matrixgenen mit bekannter Funktion vergleichsweise gering aus.

Tabelle 6: Anzahl der auswertbaren Hybridisierungssignale von drei kommerziell verfügbaren Oligonukleotid-Arrays (MWG Biotech AG).

Ergebnisse des Zwei-Farben-Experiment nach vergleichender Cross-Spezies-Hybridisierung mit ovinen cRNA-Sonden der Leber sowie verfügbarer Genannotation der Oligonukleotide auf dem entsprechendem „10k array“.

MWG Biotech AG-Arrays	auswertbare Hybridisierungssignale	Gen-annotation
„human 10k array“	7.530	9.804
„rat 10k array“	5.428	5.644
„mouse 10k array“	5.226	9.600

Der Informationsgehalt des zu analysierenden Transkriptoms mittels der Chip-Hybridisierung wird durch die Matrix der Oligonukleotid-Arrays und die verfügbare Annotation dieser Gene bestimmt. Die Genannotation der mittels Microarray detektierbaren Transkripte der drei Spezies gestaltete sich sehr unterschiedlich. Innerhalb der Kategorie der „Biologischen Prozesse“ der hierarchischen GO-Annotation wurden alle Ebenen innerhalb einer Spezies von den Microarrays abgedeckt (Tabelle 7). Die allgemein geringere Genannotation des „rattus 10k array“ zeigte sich hier erwartungsgemäß in gleichem Ausmaß wie bei den auswertbaren Hybridisierungssignalen. Im Vergleich der gleichrangigen Annotation von Mensch und Maus (Tabelle 6) des Gesamtarrays wies die Genannotation bezüglich der „Biologischen Prozesse“ dieser Spezies deutliche Unterschiede auf. Durchschnittlich war die Annotation in der Spezies *Homo sapiens* um ca. 30 % ausgeprägter als in der Spezies *Mus musculus*. In den Kategorien „Prozessregulation“ und „Reizreaktion“ zeigte die Maus eine Differenz von nahezu 50 % in der Genannotation zum Menschen (Tabelle 7). Zufällig ausgewählte Gene bzw. Spots mit Hybridisierungssignal des „human 10k array“ nach heterologer Hybridisierung mit oviner cRNA wurden ausgewählt und auf Sequenzspezifität, d. h. Identität der humanen mit der ovinen Sequenz überprüft.

Tabelle 7: Darstellung zur funktionalen Abdeckung der Oligonukleotid-Arrays und Verteilung der annotierten Gene für die Spezies *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* in biologischen Prozessen der Gene Ontology (GO)-Annotation.

GO Biologischer Prozess	Anzahl Gene mit GO-Annotation für biologische Prozesse		
	8.045 „human 10k array“	3.824 „rat 10k array“	6.524 „mouse 10k array“
Physiologische Prozesse	6.608	3.131	5.193
Zelltod	313	131	194
Extrazelluläre Strukturen	19	13	17
Homöostase	61	53	59
Transport	1.248	833	1.071
Zelluläre Prozesse	4.274	2.267	3.346
Metabolismus	4.489	1.911	3.417
Prozessregulation	244	107	137
Reizreaktion	942	383	557

1.2 Verifizierung der Sequenzspezifität zwischen Genen des „human 10k array“ nach heterologer Hybridisierung mit oviner cRNA

Die Überprüfung der Sequenzspezifität der erhaltenen Hybridisierungssignale zwischen humaner Matrix und oviner Sonde wurde über die Sequenzierung spezifischer oviner PCR-Produkte durchgeführt. Der Nachweis der Spezifität erfolgte über den Nukleotidabgleich der ovinen Genprodukte der Texelschafe zu den Datenbanksequenzen von NCBI über BLASTN („cut-off“ E-Wert 1×10^{-10}). Die ovinen Sequenzen der ausgewählten Gene wiesen im Vergleich mit den humanen Sequenzen Homologien von 85-94 % sowie im Vergleich zu den Sequenzen des näher verwandten *Bos taurus* eine Homologie von 89-98 % auf (Tabelle 8). Die ovinen Sequenzen der untersuchten Texelschafe wurden in der NCBI-Datenbank unter der Gen-Bank Identifizierung, ersichtlich in Tabelle 8, veröffentlicht.

Der Oligonukleotid-Array „human 10k array“ wies eine vergleichsweise hohe Anzahl von Hybridisierungssignalen in Verbindung mit einer hohen funktionellen Abdeckung insbesondere der „Biologischen Prozesse“ nach GO-Annotation auf. Im Zusammenhang mit der nachgewiesenen hohen Sequenzspezifität wurde der Array der Spezies *Homo sapiens* für die Analyse der PRNP-bedingten physiologischen Unterschiede einer differentiellen Scrapie-Empfindlichkeit auf Transkriptebene ausgewählt.

Tabelle 8: Homologie (in % Übereinstimmung) der sequenzierten cDNA bzw. DNA Konsens-Sequenzen des *Ovis aries* mit den Spezies *Homo sapiens* und *Bos taurus* ermittelt über BLASTN („cut-off“ E-Wert 1×10^{-10}).

Die Primerpaare und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4 vermerkt. (Abkürzungen: Genbank ID, Identifizierung der ovinen Sequenz; A, Amplikonlänge, Größe des PCR-Produktes in Basenbaaren; *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *B. taurus*, *Bos taurus*)

Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	Ovine Genbank ID	A [bp]	Übereinstimmung [%] der ovinen Sequenz zu	
			<i>H. sapiens</i>	<i>B. taurus</i>
Chemokine (C-C motif) ligand 4	BV723472	660	85	92
Claudin 8	ES414806	169	85	94
Complement component receptor 2	ES414803	182	88	95
Colony stimulating factor 2	ES414804	182	91	89
D component of complement	BV723471	264	93	97
Guanine nucleotide binding protein, α inhibiting activity polypeptide 2	ES414802	166	88	96
Glutathione peroxidase 1	BV723474	410	89	93
Major histocompatibility complex II, DQ α 1	ES414809	175	89	96
Interferon regulatory factor 2	ES414800	142	89	94
Proteasome activator subunit 1 (PA28 α)	ES414801	176	94	97
Selectin L	ES414807	152	88	98
Transforming growth factor, β	ES414805	173	91	-
Vascular cell adhesion molecule 1	ES414808	151	87	94

2 Vergleichende Hybridisierung ausgewählter Gewebe von gesunden, nicht infizierten Texelschafen mit differenter Scrapie-Empfindlichkeit (R1 vs. R5)

Die Auswahl der Gewebe, welche in das vergleichende „Expressionsprofiling“ einbezogen wurden, richtete sich nach verschiedenen Aspekten einer möglichen differentiellen Scrapie-Empfindlichkeit. An erster Stelle wurde das Stammhirn als Zielorgan der Scrapie-Erkrankung untersucht. Der potentielle Einfluss einzelner Gewebe auf den Infektionsweg wurde mit einer Auswahl von Organen des Magen-Darm-Traktes (Jejunum, Ileum im Bereich der Peyer’schen Platten) und des lymphatischen Systems (retropharyngeale Lymphknoten) betrachtet. Weiterhin wurde zur Analyse eines unterschiedlichen Stoffwechsels, als möglichen Scrapie-Empfindlichkeit modifizierenden Faktor, die Leber in die Microarray-Analyse einbezogen.

Die Anzahl von Genen mit auswertbaren Hybridisierungssignalen ($n = 3$) bewegte sich im Bereich von 75 % bis 91 % der Gene des humanen Oligonukleotid-Arrays in den untersuchten Geweben Stammhirn, retropharyngeale Lymphknoten, Ileum (Peyer'sche Platten), Jejunum und Leber nach Cross-Spezies-Hybridisierung mit oviner cRNA (Tabelle 6). Dies ermöglichte, unter Berücksichtigung der gewebespezifischen Unterschiede, eine Analyse des Schaf-Transkriptoms mit Hilfe der genomweiten Abdeckung des humanen Oligonukleotid-Arrays.

Tabelle 9: Absolute und anteilige Anzahl auswertbarer Gene nach vergleichender Cross-Spezies-Hybridisierung ($n = 3$) des „human 10k arrays“ (MWG BIOTECH AG) mit gewebspezifischen ovinen Cy5- bzw. Cy3-markierten cRNA-Sonden in den Geweben Stammhirn, Ileum (Peyer'sche Platten), Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten und Leber.

Gewebe	Auswertbare Gene	Anteil an 9.850 Gen-Spots
Stammhirn	7.656	78%
Ileum (Peyer'sche Platten)	7.426	75%
Jejunum	8.423	86%
retropharyngeale Lymphknoten	9.000	91%
Leber	7.425	75%

Es wurden die Gene als „different exprimiert“ definiert, die zwischen den Vergleichsgruppen R1 und R5 mindestens um den Schwellenwert eines 2-fach unterschiedlichen mittleren Transkriptniveaus charakterisierten und deren Ratio-Werte im zweiseitigen t-Test ($p \leq 0,05$) und nach der FDR-Korrektur ($q \leq 0,05$) einen signifikanten Unterschied aufwiesen. Die zusammenfassende Darstellung der Anzahl an Genen mit Hybridisierungssignal nach heterologer Chip-Hybridisierung, die in den einzelnen Geweben dieser Studie die definierten Auswertungskriterien erfüllten, erfolgt in Abbildung 7. Dabei wird deutlich, wie sich die Anwendung von Schwellenwerten auf die Anzahl der als signifikant „different exprimierten“ Gene auswirkt. Aufgrund der Cross-Spezies-Hybridisierung zwischen oviner cRNA-Sonde und humaner DNA-Matrix war eine stringente Auswertung ($p \leq 0,05$; $-1 \geq \text{ratio} (\log_2) \leq 1$; $q \leq 0,05$) notwendig. Dies führte dazu, dass faktisch nur ein Gewebe die gewählten Kriterien erfüllte und „different exprimiert“ Gene auswies. Nachfolgend werden die Ergebnisse für die einzelnen Gewebe beschrieben.

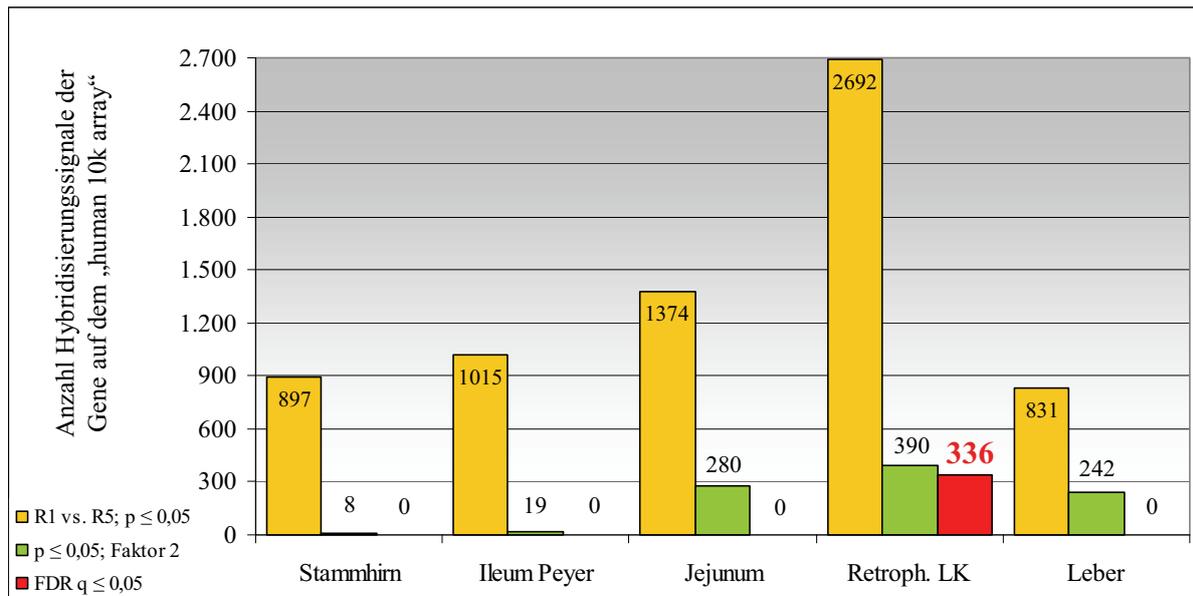


Abbildung 7: Anzahl der Gene mit Hybridisierungssignal die den Auswertungskriterien (A) signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) zwischen R1 und R5, (B) zudem 2-fach „different exprimierte“ Gene und (C) FDR-Korrektur ($q \leq 0,05$) in den fünf untersuchten Geweben genügen. Cross-Spezies-Hybridisierung der alternativ markierte ovinen cRNA von Texelschafen der Risikoklasse R1 bzw. R5 der Gewebe Stammhirn, Ileum im Bereich der Peyer’schen Platten, Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten und Leber mit dem „human 10k array“. (Abkürzungen: Retroph. LK, retropharyngeale Lymphknoten, FDR, „false discovery rate“)

2.1 Expressionsprofil des Stammhirns

Gesunde Texelschafe mit Scrapie-resistentem (ARR/ARR) und Scrapie-empfindlichem (VRQ/VRQ, VRQ/ARQ) *PRNP*-Genotyp zeigten keine signifikanten ($q \leq 0,05$) Unterschiede in ihrer Genexpression.

Von 7.656 auswertbaren Gen-Hybridisierungssignalen im Stammhirn konnten 897 Gene als signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) zwischen Risikoklasse R1 und R5 ausgewiesen werden (Abbildung 7). Dabei waren 495 Gene höher in Klasse R1 und 402 Gene höher in Klasse R5 exprimiert. Von diesen erfüllten acht Gene den Schwellenwert, nach Maßgabe, dass die Genexpression zwischen den Risikoklassen mindestens um den Faktor 2 differiert. Unter Berücksichtigung möglicher „falsch positiver“ Ergebnisse bei multiplen Tests wurden keine signifikant „different exprimierten“ Gene nach einer FDR-Korrektur ($q \leq 0,05$) ausgewiesen.

2.2 Expressionsprofil des Ileum (Peyer’sche Platten)

Dieses Gewebe des Magen-Darm-Traktes und mutmaßliche Eintrittsforte des PrP^{Sc} wies keine Unterschiede in der Genexpression zwischen gesunden Texelschafen der Risikoklasse R1 und

R5 auf (FDR, $q \leq 0,05$). Als Ergebnis der heterologen Hybridisierung oviner cRNA des Ileum im Bereich der Peyer'sche Platten mit dem „human 10k array“ konnten von 7.426 Hybridisierungssignalen 1.015 Gene als signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlich zwischen den Scrapie-Risikoklassen R1 (607 Gene) und R5 (408 Gene) definiert werden (Abbildung 7). Das Kriterium der mindestens 2-fachen Differenz im Expressionsniveau zwischen den untersuchten Genotypengruppen erfüllten 13 Gene in der Klasse R1 und sechs Gene in der Klasse R5.

2.3 Expressionsprofil des Jejunum

Als weiteren Abschnitt des Magen-Darm-Traktes konnten im Jejunum von gesunden, nicht infizierten Texelschafen beider Scrapie-Risikoklassen keine Genexpressionsunterschiede nachgewiesen werden (FDR, $q \leq 0,05$).

Im „Expressionsprofiling“ des Gewebes Jejunum wurden 1.374 Gen-Hybridisierungssignale mit einer signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlichen Expression zwischen Scrapie-resistenten (R1, 612 Gene) und Scrapie-empfindlichen (R5, 762 Gene) Texelschafen detektiert (Abbildung 7). Hiervon waren 183 Gene in Risikoklasse R1 und 97 Gene in der Risikoklasse R5 mindestens 2-fach höher exprimiert.

2.4 Expressionsprofil des retropharyngealen Lymphknoten

Die retropharyngealen Lymphknoten als Teil des lymphatischen Systems und potentiellen Infektionsweges der Prionen wiesen bei gesunden Tieren ein differentes Expressionsprofil zwischen der sehr resistenten und der sehr anfälligen Scrapie-Risikoklasse auf.

Zugleich zeigte dieses Gewebe die höchste gewebsspezifische Expressionsaktivität auf dem „human 10k array“ mit 9.000 auswertbaren Gen-Hybridisierungssignalen. Hiervon waren 2.692 Gene nach dem zweiseitigen t-Test signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlich zwischen R1 und R5, wovon 390 Gene eine mindestens 2-fach unterschiedliche Genexpression zwischen den Risikoklassen aufwiesen. Von diesen konnten nach der FDR ($q \leq 0,05$) für multiple Tests 336 Gene als „different exprimiert“ identifiziert werden (Abbildung 7). Der Großteil dieser different exprimierten Gene ($n = 291$, entspricht 86,6 %) zeigte eine vergleichsweise höhere Expression in der Scrapie-resistenten Risikoklasse R1 (siehe Anhang, Tabelle 17). Hingegen wiesen 45 Gene (entspricht 13,4 %) im Vergleich der experimentellen Gruppen eine höhere Expression in der Risikoklasse R5 auf (siehe Anhang, Tabelle 18).

2.5 Expressionsprofil der Leber

In der stoffwechselaktiven Leber wiesen gesunde Texelschafe im Vergleich der Genotypengruppen R1 (ARR/ARR) mit R5 (VRQ/VRQ, VRQ/ARQ) keine signifikanten Unterschiede im Genexpressionsprofil nach heterologer Chip-Hybridisierung auf (FDR, $q \leq 0,05$).

Die Detektion von 7.425 auswertbaren Gen-Hybridisierungssignalen oviner cRNA der Leber stimmen mit dem Ergebnis des Speziesvergleichs (Tabelle 6) unter Verwendung kommerzieller Oligonukleotid-Arrays der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) überein. Signifikante Expressionsunterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen R1 und R5 zeigen insgesamt 831 Gene (Abbildung 7). Hiervon fallen 297 Gene mit einer vergleichsweise höheren Expression der Risikoklasse R1 und 534 Gene der Risikoklasse R5 zu. Den Schwellenwert der mindestens 2-fach unterschiedlichen Expression nach heterologer Chip-Hybridisierung überschreiten in der Klasse R1 104 Gene bzw. in der Klasse R5 138 Gene.

3 Funktionale Einordnung der different exprimierten Gene (R1 vs. R5) des retropharyngealen Lymphknotens nach Microarray-Analyse

3.1 Identifizierung physiologischer Prozesse mit signifikant erhöhter Anzahl different exprimierter Gene

Nach Maßgabe der gewählten Kriterien konnten in den fünf untersuchten Geweben allein im retropharyngealen Lymphknoten signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Texelschafen der Risikoklassen R1 und R5 beobachtet werden. Von den 336 als „different exprimiert“ definierten Genen konnten 252 Gene aufgrund ihrer bekannten Funktion beim Menschen physiologischen Prozessen zugeordnet werden. Die hierarchische Struktur der Annotation über GO erlaubt die parallele Gruppierung der einzelnen Gene in unterschiedlichste Kategorien anhand ihrer vielfältigen Funktionen. Die gewählte „large scale“-Technologie in diesem offenen Ansatz erlaubt grundsätzliche Aussagen über eine Vielzahl physiologischer Prozesse, die durch eine entsprechende Anzahl an Genen auf dem verwendeten Oligonukleotid-Array repräsentativ vertreten sind. In Tabelle 10 sind die physiologischen Prozesse der hierarchischen Ebenen 1 bis 3 der GO-Annotation mit der Anzahl auswertbarer Gene des retropharyngealen Lymphknotens sowie der Anzahl different exprimierter Gene (R1 vs. R5) nach heterologer Chip-Hybridisierung dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung physiologischer Prozesse unter Hervorhebung (grau unterlegt) der Prozesse mit signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhter Anzahl ($n \geq 5$) different exprimierter Gene des retropharyngealen Lymphknotens unter Nutzung des Programms GoMiner™. (Abkürzungen: Gesamt Gene, Anzahl der Gene auf dem "human 10k array" mit auswertbarem Signal und verfügbarer GO-Annotation; sign. Gene, Anzahl signifikant ($q \leq 0,05$) different exprimierte Gene des retropharyngealen Lymphknotens; p-Wert, Irrtumswahrscheinlichkeit nach Fisher's exact Test).

Physiologische Prozesse (GO Annotation)			Gesamt Gene	sign. Gene	p-Wert
Ebene 1	Ebene 2	Ebene 3			
Zelluläre physiologische Prozesse			5618	208	0,29
Alterung und Tod			473	14	0,82
Biogenese/Aufbau extrazelluläre Struktur			73	4	0,27
Homöostase			154	8	0,20
Lokalisation/Transport			1515	55	0,52
Metabolismus			4250	156	0,43
Physiologische Prozesse des Organismus			1417	61	0,08
	Neurophysiologische Prozesse		554	21	0,45
	Immunantwort		568	29	0,04
	Zellaktivierung		116	5	0,41
	Muskelkontraktion		116	5	0,41
	Blutkreislauf		94	7	0,05
	Reproduktive physiologische Prozesse		60	2	0,65
	Umgestaltung der Knochen		48	1	0,83
	Regulierung der Körperflüssigkeiten		97	5	0,28
	Verdauung		46	2	0,50
	Exkretion		35	1	0,73
	Respiratorischer Gasaustausch		26	4	0,01
Prozessregulierung			2089	78	0,40
Reaktion auf einen Reiz			1544	60	0,29
	Reaktion auf einen externen Reiz		1020	42	0,21
	Stressreaktion		904	41	0,07
		Reaktion auf Pathogene und Parasiten	413	25	0,01
		Reaktion auf DNA-Schäden	195	5	0,84
		Wundreaktion	350	16	0,20
		Oxidative Stress Antwort	75	3	0,52
		Reaktion auf Entkräftung	12	1	0,36
		Proteinfaltungskontrolle	44	2	0,48
		Hypoxie Reaktion	22	2	0,19
	Reaktion auf einen biotischen Reiz		776	38	0,03
		Abwehrreaktion	651	32	0,05
		Reaktion auf einen externen biotischen Reiz	420	26	0,01
		Anti-Inflamations Antwort	4	1	0,14
	Reaktion auf einen endogenen Reiz		221	5	0,91
Rhythmische Prozesse			53	3	0,30

Auf der Basis aller annotierten Gene auf dem „human 10k array“ innerhalb jeder Kategorie und der Anzahl different exprimierter Gene konnten mittels Fisher's exact Test physiologische Prozesse mit einer signifikant erhöhten Anzahl different exprimerter Gene

identifiziert werden ($p \leq 0,05$). Dabei wurde deutlich, dass insbesondere physiologische Prozesse der „Immunantwort“ (29 Gene), der „Reaktion auf einen biotischen Reiz“ (38 Gene) und der „Reaktion auf Pathogene oder Parasiten“ (25 Gene) eine signifikant erhöhte Anzahl different exprimierter Gene aufweisen. Diese stehen funktional in engem Zusammenhang mit dem Blutkreislauf. Im physiologischen Prozess „Blutkreislauf“ konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl von sieben different exprimierten Genen nachgewiesen werden. Das vergleichende Expressionsprofil der Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen gesunden Texelschafe im retropharyngealen Lymphknoten beschreibt über die signifikant unterschiedlich regulierte Transkription eine Vielzahl physiologischer Prozesse zwischen den Risikoklassen R1 und R5. Innerhalb dieser komplexen Zusammenhänge des Organismus sind Prozesse der Immunantwort durch die signifikant erhöhte Anzahl der Gene in diesem Gewebe von großem Interesse. In Abbildung 8 sind die relativen mittleren Transkriptniveaus der Gene des Prozesses „Reaktion auf Pathogene und Parasiten“ dargestellt.

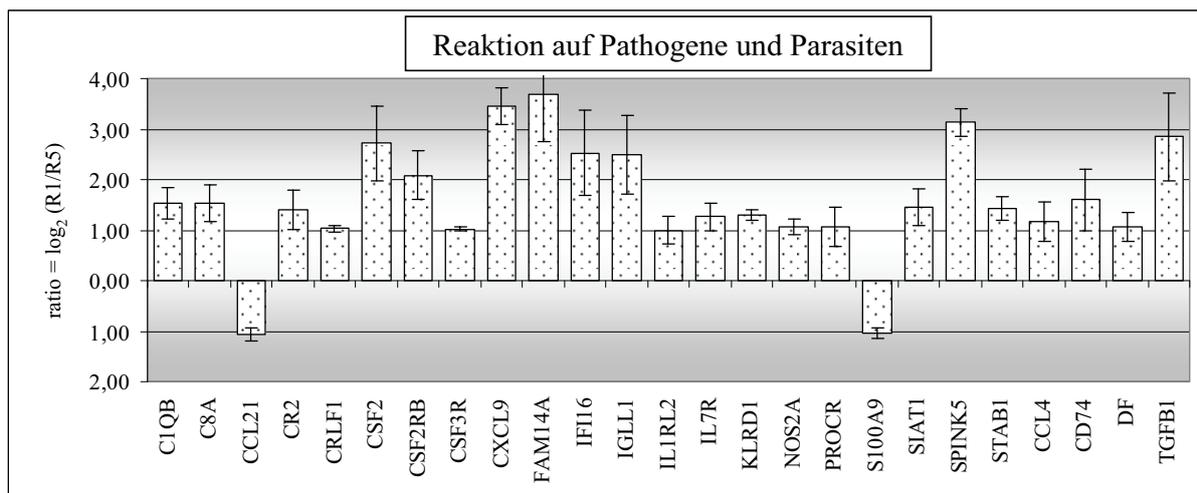


Abbildung 8: Darstellung different exprimierter Gene, die dem Prozess „Reaktion auf Pathogene und Parasiten“ nach GO-Annotation zugeordnet werden können.

Es ist das relative Transkriptniveau zwischen gesunden Texelschafen der Scrapie-Risikoklasse R1 (positive Ordinate) und R5 (negative Ordinate) im retropharyngealen Lymphknoten abgetragen. (Abkürzungen: *CIQB*, „complement component 1“; *C8A*, „complement component 8“; *CCL21*, „chemokine (C-C motif) ligand 21“; *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *CD74*, „invariant polypeptide of MHC II antigen“; *CR2*, „complement component receptor 2“; *CRLF1*, „cytokine receptor-like factor 1“; *CSF2*, „colony stimulating factor 2“; *CSF2RB*, „colony stimulating factor 2 receptor“; *CSF3R*, „colony stimulating factor 3 receptor“; *CXCL9*, „chemokine (C-X-C motif) ligand 9“; *DF*, „D component of complement“; *FAM14A*, „family with sequence similarity 14, member A“; *IFI16*, „interferon, gamma-inducible protein 16“; *IGLL1*, „immunoglobulin lambda-like polypeptide 1“; *IL1RL2*, „interleukin-1 receptor L2“; *IL7R*, „Interleukin 7 receptor“; *KLRD1*, „killer cell lectin-like receptor D1“; *NOS2A*, „nitric oxide synthase 2A“; *PROCR*, „endothelialprotein C receptor“; *S100A9*, „S100 calcium binding protein A9“; *SIAT1*, „sialyltransferase 1“; *STAB5*, „stabilin 1“; *SPINK5*, „serine protease inhibitor, Kazal type, 5“; *TGFBI*, „transforming growth factor, $\beta 1$ “)

Es wird deutlich, dass diese in der Scrapie-Risikoklasse R1 im Vergleich zur Scrapie-Risikoklasse R5 stärker exprimiert wurden. 23 der 25 different exprimierten Gene zeigten in der Risikoklasse R1 ein höheres Transkriptniveau als in der Risikoklasse R5. Diese Tendenz spiegelte sich im Prozess der „Immunantwort“, mit 25 von 29 Genen, die im Vergleich R1 vs. R5 in der Scrapie-Risikoklasse R1 stärker exprimiert wurden, wider. Folglich wiesen die Scrapie-empfindlichen *PRNP*-Genotypen (R5) eine vergleichsweise geringe Expression immunrelevanter Gene auf. Ebenso zeigten in dem physiologischen Prozess des „Blutkreislaufes“ die sieben Gene „diaphorase“ (*DIA1*), „erythrocyte membrane protein band 4,1“ (*EPB41*), „nuclear factor, erythroid-derived 2“ (*NFE2*), „neuropeptide Y“ (*NPY*), „guanine-nucleotide binding protein 2“ (*GNAI2*), „renin binding protein“ (*RENBP*) und „sorcin“ (*SRI*) im Vergleich R1 vs. R5 eine höhere Transkription in der Scrapie-resistenten Gruppe (R1) (siehe Anhang, Tabelle 17).

3.2 Identifizierung der Stoffwechselwege mit signifikant erhöhter Anzahl different exprimierter Gene

Mit dem Ziel der weiteren funktionellen Einordnung der different exprimierten Gene wurden zusätzlich zu den physiologischen Prozessen Stoffwechselwege mit signifikant erhöhter Anzahl different exprimierter Gene ermittelt. Mit Hilfe der Stoffwechselwege könnten geeignete Expressionsmarker, die charakteristisch für differente Stoffwechsellagen zwischen Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen Texelschafen sind, identifiziert werden. Von den 336 different zwischen gesunden Tieren der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 exprimierten Gene des retropharyngealen Lymphknotens konnten 165 Gene bekannten Stoffwechselwegen zugeordnet werden. In Tabelle 11 sind die Stoffwechselwege dargestellt, die auf Grundlage des Verhältnisses aller annotierten Gene auf dem „human 10k array“ zu den different exprimierten Genen des jeweiligen Stoffwechselweges eine signifikant erhöhte Anzahl different exprimierte Gene aufwiesen (Fisher's exact Test, $p \leq 0,05$). Wie durch die vorangegangenen Ergebnisse (Kapitel D 3.1) zu erwarten war, traten Stoffwechselwege der Immunantwort in den Vordergrund. Des Weiteren wiesen Stoffwechselwege der Zellkommunikation und Signaltransduktion sowie der für die Prionenzirkulation bedeutsamen Endozytose eine erhöhte Anzahl different exprimierter Gene auf. Der allgemeine Prozess der Immunantwort umfasste die Stoffwechselwege: „Natürliche Killerzellen (NK)-vermittelte Zytotoxizität“, „T-Helferzellen Differenzierung“, „Komplementsystem“ und „Humorale Immunantwort“.

Tabelle 11: Darstellung der Stoffwechselwege mit signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhter Anzahl different exprimierter Gene ($n \geq 3$) unter Nutzung des Programms PathwayExplorer.

(Abkürzungen: Gesamt Gene, Anzahl der Gene auf dem "human 10k array" mit auswertbarem Hybridisierungssignal und verfügbarer Annotation in den Stoffwechselwegen; sign. Gene, Anzahl signifikant ($p \leq 0,05$) different exprimierter Gene des retropharyngealen Lymphknotens in den entsprechenden Stoffwechselwegen; IL-3, Interleukin 3; NK, Natürliche Killerzellen)

Daten-bank	Kategorie	Stoffwechselweg	Gesamt Gene	sign. Gene	p-Wert
GenMAPP	Biologischer Prozess	Endozytose	66	6	0,04
BioCarta	Cytokine/Chemokine	IL-3 Signalweg	9	4	0,00
GenMAPP	Immunsystem	Humorale Immunantwort	107	10	0,01
KEGG	Immunsystem	Komplement und Koagulationskaskade	54	6	0,01
KEGG	Immunsystem	NK-vermittelte Zytotoxizität	67	6	0,04
BioCarta	Immunsystem	Komplementsystem	13	3	0,01
Pathways	Immunsystem	T-Helferzellen-Differenzierung	116	9	0,03
KEGG	Kohlenhydrat Metabolismus	O-Glycan Biosynthese	21	3	0,04
KEGG	Lipid Metabolismus	Androgen und Östrogen Metabolismus	19	3	0,03
GenMAPP	Molekulare Funktion	Enzymhemmungsaktivität	116	9	0,03
KEGG	Zellkommunikation	Cadherin-vermittelte Zelladhäsion	38	4	0,05
KEGG	Zellkommunikation	Tight junction	74	6	0,05

In Abbildung 9 ist die Komplementkaskade mit allen beteiligten Genen (KEGG Stoffwechselweg) und den signifikant different exprimierten Genen des retropharyngealen Lymphknotens (grün hervorgehoben) dieser Studie skizziert. Sowohl der durch den Antigen-Antikörper-Komplex aktivierte klassische als auch der antigenunabhängige alternative Weg sind durch die different zwischen den Scrapie-Risikoklassen (R1 vs. R5) exprimierten Gene „complement component 1“ (*CIQB*) bzw. „D component of complement“ (*DF*) beeinflusst. Diese Gene zeigten im Vergleich R1 vs. R5 in der Scrapie-resistenten Klasse ein höheres mittleres Expressionsniveau. Beide Wege führen über die zentrale C3-Konvertase zum Membran-Attack-Komplex, an dessen Ausbildung das in der Risikoklasse R1 im Vergleich zu R5 höher exprimierte Gen „complement component 8“ (*C8A*) beteiligt ist. Innerhalb der Komplementkaskade aktivieren Spaltprodukte der C3-Konvertase über die Bindung an den „complement component receptor 2“ (*CR2*) reife B-Lymphozyten. Das kodierende Gen dieses B-Lymphozyten-Rezeptors wurde in gesunden Tieren der Scrapie-resistenten Gruppe (R1) signifikant höher exprimiert als in der Risikoklasse R5.

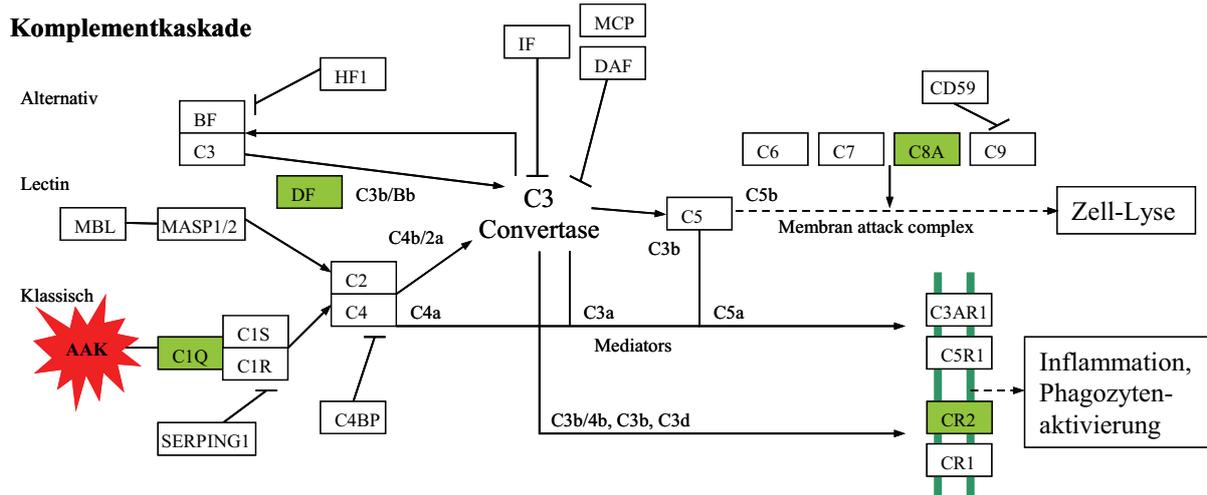


Abbildung 9: Komplementkaskade nach KEGG unter Hervorhebung (grün unterlegt) der im Vergleich R1 vs. R5 different exprimierte Gene nach heterologer Microarray-Hybridisierung. (Abkürzung: AAK, Antigen-Antikörper-Komplex, *C1QB*, „complement component 1“; *C8A* „complement component 8“; *CR2*, „complement component receptor 2“; *DF*, „D component of complement“)

Weiterhin wurde in Stoffwechselwegen der unspezifischen und adaptiven Immunantwort eine signifikant höher Anzahl different exprimierte Gene im Vergleich R1 vs. R5 beobachtet. Dies umfasst die Stoffwechselwege der bereits genannten „Komplement und Koagulationskaskade“ aber auch der „NK-vermittelte Zytotoxizität“ und die „T-Helferzellen-Differenzierung“. Das relative Transkriptniveau der different exprimierte Genen zwischen den Vergleichsgruppen R1 vs. R5 in gesunden Texelschafen ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Texelschafe der Scrapie-resistenten Risikoklasse R1 mit dem *PRNP*-Genotyp ARR/ARR wiesen im Vergleich zur Risikoklasse R5 ausnahmslos eine höhere Expressions in Genen dieser Stoffwechselwege auf.

Sowohl die Regulation der Natürlichen Killerzellen als auch die Differenzierung der T-Helferzellen stellen ein Bindeglied zwischen der unspezifischen und der adaptiven Immunantwort dar und sind ausnahmslos durch signifikant höher exprimierte Gene in der Scrapie-resistenten Gruppe (R1) vertreten. Dies betrifft nicht nur die Liganden der Immunantwort, die durch die Gene „colony stimulating factor 2“ (*CSF2*), „chemokine (C-C motif) ligand 4“ (*CCL4*), „chemokine (C-X-C motif) ligand 9“ (*CXCL9*) und „fyn tyrosine kinase protooncogene“ (*FYN*) kodiert werden, sondern auch Rezeptoren wie „killer cell lectin-like receptor D1“ (*KLRD1*) und „interleukin 7 receptor“ (*IL7R*).

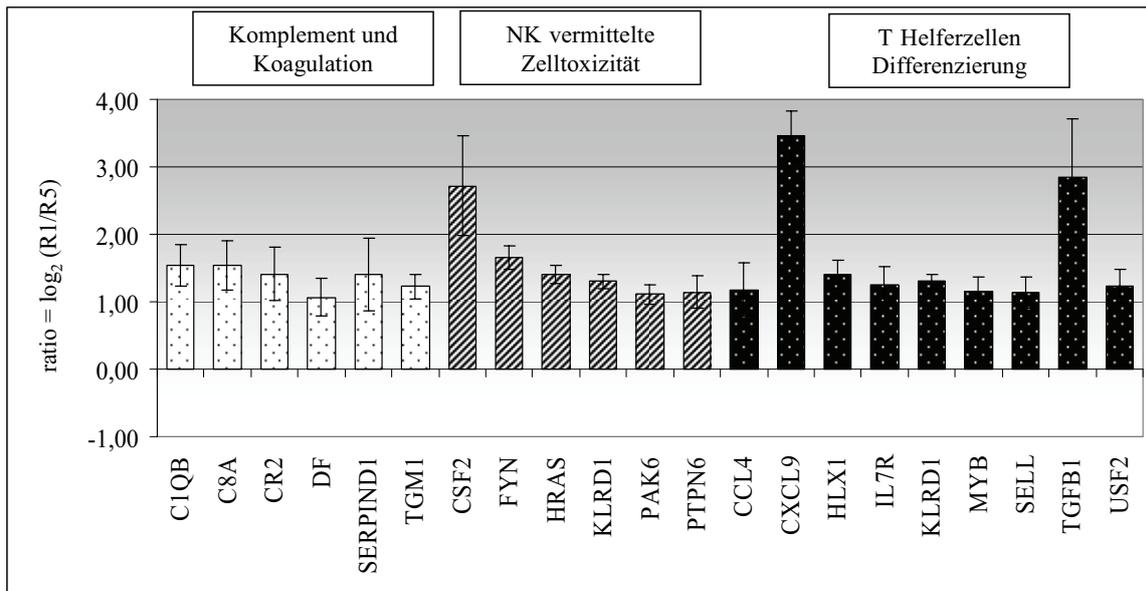


Abbildung 10: Relative Transkriptionsniveaus differenzieren zwischen Scrapie-resistenten (positive Ordinate) und Scrapie-empfindlichen (negative Ordinate) gesunden Texelschafen exprimierter Gene der Stoffwechselwege „Komplement und Koagulation“ (weiße Balken), „NK-vermittelte Zelltoxizität“ (gestreifte Balken) und „T-Helferzellen-Differenzierung“ (schwarze Balken) im retropharyngealen Lymphknoten.

(Abkürzungen: NK, Natürliche Killerzellen; *CIQB*, „complement component 1“; *C8A*, „complement component 8“; *CR2*, „complement component receptor 2“; *DF*, „D component of complement“; *SERPIND1*, „serine proteinase inhibitor D1“; *TGMI*, „transglutaminase 1“; *CSF2*, „colony stimulating factor 2“; *FYN*, „fyn tyrosine kinase protooncogene“; *HRAS*, „harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog“; *KLRD1*, „killer cell lectin-like receptor D1“; *PAK6*, „p21-activated kinase 6“; *PTPN6*, „protein-tyrosin phosphatase, nonreceptor type 6“; *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *CXCL9*, „chemokine (C-X-C motif) ligand 9“; *HLX1*, „H2.0-like homeo box 1“; *IL7R*, „interleukin 7 receptor“; *MYB*, „v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog“; *SELL*, „selectin L“; *TGFBI*, „transforming growth factor, β 1“; *USF2*, „upstream transcription factor 2, c-fos interacting“).

Die Aufnahme von Mikroorganismen oder Antigenen als einer der ersten Mechanismen der Immunreaktion erfolgt über die Endozytose. Im Stoffwechselweg „Endozytose“ wurde die signifikante Häufung differenzierter exprimierter Gene im Vergleich der Risikoklassen R1 vs. R5 über die sechs Gene „intersectin 2“ (*ITSN2*), „stabilin 1“ (*STAB1*), „calcitonin activity modifying protein 2“ (*RAMP2*), „scavenger receptor class F, member 1“ (*SCARF1*), „sorting nexin 17“ (*SNX17*) und „ADP-ribosylation factor 3“ (*ARF3*) definiert (Fisher’s exact Test, $p \leq 0,05$). Ebenfalls ist das differenzierter exprimierte Gen „sorting nexin 15“ (*SNX15*) dieser Gruppe zuzuordnen (Phillips *et al.*, 2001). Wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist, zeigten gesunde, nicht infizierte Texelschafe der Scrapie-resistenten Risikoklasse R1 im Vergleich zu Risikoklasse R5 ebenfalls eine höhere mittlere Transkriptionsrate von Genen, die der Endozytose zuzuordnen sind.

Tabelle 12: Der Endozytose zuzuordnende signifikant different exprimierte Gene zwischen Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen gesunden Texelschafen und deren mittleres relatives Transkriptionsniveau im retropharyngealen Lymphknoten nach heterologer Chip-Hybridisierung. (Abkürzungen: ID, Identifizierung; $\pm s$, Standardabweichung, R1, Risikoklasse; R5, Risikoklasse)

Locus	Array ID	Ratio der Genexpression R5/R1 (\log_2) beim Schaf		Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
			$\pm s$	
<i>ARF3</i>	NM 001659	-1,14	0,350	ADP-ribosylation factor 3
<i>ITSN2</i>	NM 019595	-1,24	0,210	intersectin 2
<i>RAMP2</i>	NM 005854	-1,52	0,260	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2
<i>SCARF1</i>	NM 003693	-1,47	0,287	scavenger receptor class F, member 1
<i>SNX17</i>	NM 014748	-1,15	0,116	sorting nexin 17
<i>STAB1</i>	NM 015136	-1,43	0,245	stabilin 1
<i>SNX15</i>	NM 013306	-2,74	0,780	sorting nexin 15

Darüberhinaus wiesen Stoffwechselwege der Zellkommunikation und Signaltransduktion eine signifikant erhöhte Anzahl different zwischen den Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen Tieren exprimierte Gene auf. Dabei zeigten diese Gene die gleiche Ausprägung im relativen Transkriptionsniveau, wie die Gene der Immunantwort.

Das relative Expressionsniveau für die einzelnen Gene der Stoffwechselwege „Cadherin-vermittelte Zelladhäsion“, „Tight junction“ und „IL-3 Signalweg“ wird in Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt. Gene der ersten beiden Stoffwechselwege regulieren den Zusammenschluss der Zellen und wurden in den Scrapie-resistenten Texelschafen im Vergleich zur Risikoklasse R5 höherer exprimiert. Der „IL-3 Signalweg“, welcher ebenfalls durch vergleichsweise höher exprimierte Gene der Risikoklasse R1 repräsentiert wurde, reguliert die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen und Lymphozyten.

Die enge Verknüpfung zwischen Immunsystem und Zellkommunikation spiegelt sich im mehrfachen Auftreten einiger Gene wie „harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog“ (*HRAS*), „protein-tyrosin phosphatase, nonreceptor type 6“ (*PTPN6*) und „colony stimulating factor 2“ (*CSF2*) wider. Die kodierenden Gene der gesunden Texelschafe der Scrapie-empfindlichen Risikoklasse R5 zeichneten sich somit nicht nur durch eine im Vergleich zur Risikoklasse R1 geringere Expression immunrelevanter Gene, sondern auch durch eine geringere Expression von Genen der inter- und intrazellulären Kommunikation aus.

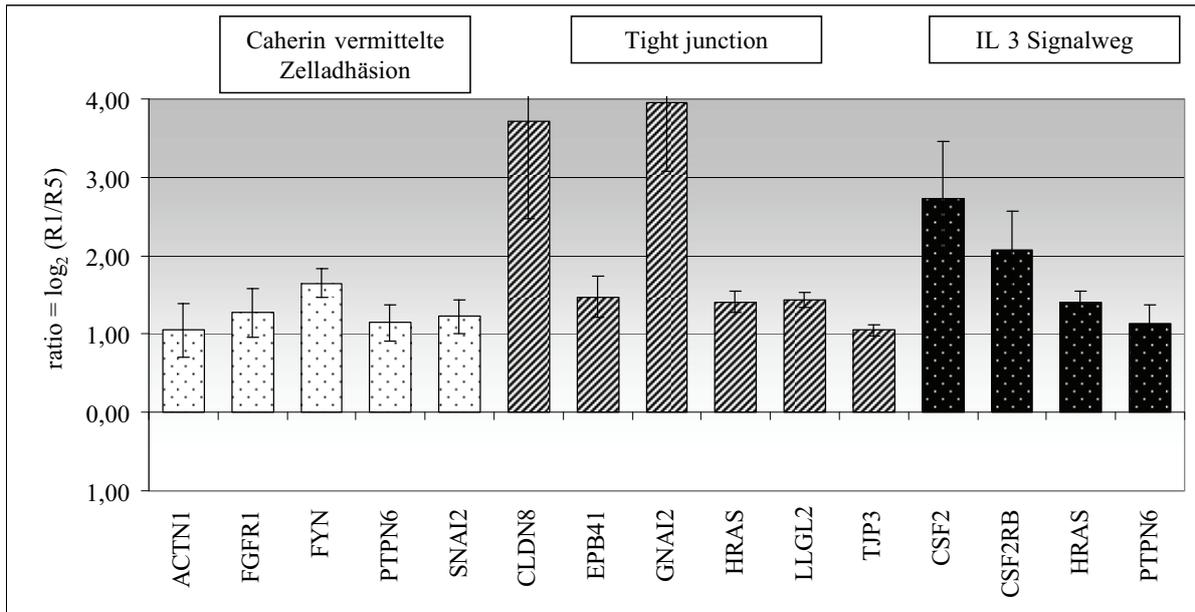


Abbildung 11: Relative Transkriptionsniveaus different zwischen Scrapie-resistenten (positive Ordinate) und Scrapie-empfindlichen (negative Ordinate) gesunden Texelschafen exprimierter Gene der Stoffwechselwege „Cadherin-vermittelte Zelladhäsion“, „Tight junction“ und „IL-3 Signalweg“ im retropharyngealen Lymphknoten.

(Abkürzungen: *IL-3*, „interleukin 3“; *ACTN1*, „actinin α 1“; *FGFR1*, „fibroblast growth factor receptor 1“; *FYN*, „fyn tyrosine kinase protooncogene“; *PTPN6*, „protein-tyrosin phosphatase, nonreceptor type6“; *SNAI2*, „neural crest transcription factor“; *CLDN8*, „claudin 8“; *EPB41*, „erythrocyte membran protein band 4.1“; *GNAI2*, „guanine-nucleotide binding protein 2“; *HRAS*, „harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog“; *LLGL2*, „lethal giant larvae homolog 2“; *TJP3*, „tight junction protein 3“; *CSF2*, „colony stimulating factor 2“; *CSF2RB*, „colony stimulating factor 2 receptor“; *HRAS*, „v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog“)

4 Quantitative Bestimmung des Transkriptionsniveaus ausgewählter funktionaler Kandidatengene mit Echtzeit RT-PCR

4.1 Transkriptniveau immunrelevanter Gene im retropharyngealen Lymphknoten in den Risikoklassen R1 und R5

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse immunrelevanter different exprimierter Gene zwischen den *PRNP*-Genotypengruppen wurde die Messung der absoluten Transkriptmenge bei den in dieser Untersuchung betrachteten nicht mit Scrapie-infizierten, gesunden Texelschafen vorgenommen (Kapitel D 2.4). Die quantitative Transkriptmessung mittels Echtzeit RT-PCR wurde an den selben RNA-Pools durchgeführt, die auch zur Microarray-Hybridisierung zum Einsatz kamen. Der geringe Tierumfang je Scrapie-Risikoklasse (R1 mit n = 4, R5 mit n = 4) und die daraus resultierende mangelnde statistische Absicherung lies keine Expressionsanalyse zwischen den Risikoklassen am Einzeltier zu. Insgesamt wurden elf

Gene aus der Microarray-Analyse des retropharyngealen Lymphknotens in die Echtzeit RT-PCR Untersuchung (n = 3) einbezogen. Für fünf Gene konnte mit den quantitativen Echtzeit RT-PCR-Experimenten das semi-quantitative Hybridisierungsergebnis bestätigt werden. Für fünf weitere Gene konnten in dieser Studie keine signifikanten Expressionsunterschiede bzw. Transkriptmengen zwischen den Risikoklassen R1 und R5 beobachtet werden (*CD74*, *CSF2*, *GNAI2*, *IRF2* und *TGFBI*). Das Gen „major histocompatibility complex II, DQ α 12“ (*HLA-DQA1*) wies einen signifikanten Unterschied im mRNA-Level, entgegengesetzt dem Microarray-Ergebnis auf.

In Abbildung 12 sind die mittels Echtzeit RT-PCR ermittelten Transkriptraten der signifikant different exprimierten Gene ($p \leq 0,05$) zusammenfassend dargestellt. Da verschiedene Gruppen von Lymphozyten, wie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Monozyten, Chemokine als Mediator infolge ihrer Aktivierung innerhalb der Immunantwort exprimieren, wurde die Expression des Genes „chemokine, CC motif ligand 4“ (*CCL4*) untersucht. Die Schafe der Risikoklasse R1 exprimierten *CCL4* signifikant ($p \leq 0,01$) unterschiedlich mit 1.656 ± 13 Kopien/10 ng Gesamt-RNA im Vergleich zur Risikoklasse R5 mit 1.273 ± 143 Kopien. Ebenfalls wies das Gen *DF*, Bestandteil des alternativen Komplementsystems, ein Expressionniveau von 222 ± 39 Kopien/10 ng Gesamt-RNA in der Scrapie-resistenten Gruppe mit marginal signifikantem ($p = 0,067$) Unterschied um den Faktor 1,3 zur Scrapie-empfindlichen Gruppe (150 ± 32 Kopien/10 ng Gesamt-RNA) auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass funktionale Markergene, in diesem Falle des angeborenen Immunsystems, in gesunden, nicht-infizierten Texelschafen mit dem *PRNP*-Genotyp ARR/ARR höher exprimiert werden als im Genotyp VRQ/ARQ bzw. VRQ/VRQ.

Im Übergang zur adaptiven Immunantwort ist die Haftung und der Durchtritt der Lymphozyten zur Aktivierung bedeutsam. Innerhalb dieses Stoffwechselweges wurden die in der Microarray-Hybridisierung different exprimierten Gene *VCAMI* und „selectin L“ (*SELL*) analysiert. Die gegensätzliche Transkription zwischen den Risikoklassen R1 vs. R5 konnte mittels Echtzeit RT-PCR bestätigt werden. In der gepoolten mRNA wurden für *VCAMI* 2.015 ± 129 bzw. 4.453 ± 348 Kopien/10 ng Gesamt-RNA gemessen, wobei die Scrapie-empfindliche Gruppe im Vergleich zur Scrapie-resistenten Gruppe eine 2,21-fach ($p \leq 0,0003$) höhere Expression aufwies. Im Gegensatz dazu exprimierten die Schafe der Risikoklasse R1 *SELL* mit 4.560 ± 141 Kopien/10 ng Gesamt-RNA 1,22-fach höher als die Schafe der Risikoklasse R5 (3.738 ± 253 Kopien/10 ng Gesamt-RNA).

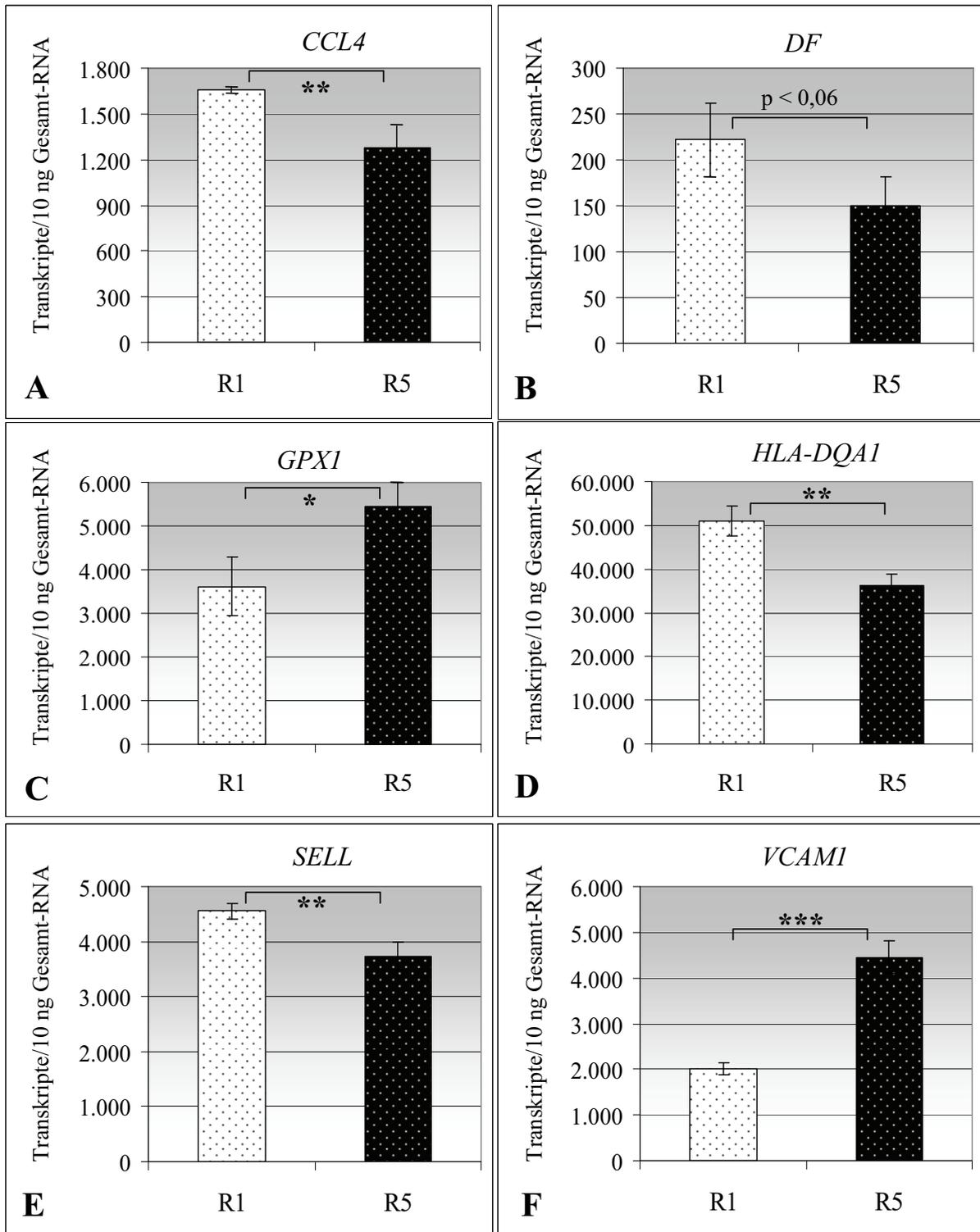


Abbildung 12: Mittleres Transkriptniveau (n = 3 Wiederholungen) der Gene *CCL4* (A), *DF* (B), *GPXI* (C), *HLA-DQA1* (D), *SELL* (E) und *VCAMI* (F) in der gepoolten mRNA der Scrapie-Risikoklassen R1 (n = 4) und R5 (n = 4) mittels Echtzeit RT-PCR im retropharyngealen Lymphknoten.

(Abkürzungen: *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *DF*, „D component of complement“; *GPXI*, „glutathione peroxidase 1“; *HLA-DQA1*, „major histocompatibility complex, II, DQ α 1“; *SELL*, „selectin L“; *VCAMI*, „vascular cell adhesion molecule 1“; R1, Scrapie-Risikoklasse; R5, Scrapie-Risikoklasse; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Diesem in der Immunologie als „homing“ bezeichneten Prozess folgt in der adaptiven Immunantwort die Antigen-Biosynthese und -Präsentation. Dieser Stoffwechselweg ist über die different exprimierte Gene „major histocompatibility complex II, DQ α 12“ (*HLA-DQA1*) und „invariant polypeptide of MHC II antigen“ (*CD74*) des MHC II-Weges bzw. „proteasome activator subunit 1“ (*PSME1*), „proteasome activator subunit, β 5“ (*PSMB5*) sowie „killer cell lectin-like receptor D1“ (*KLRD1*) des MHC I-Weges nach Microarray-Analyse vertreten (siehe Anhang, Tabelle 17 und Tabelle 18). In der Echtzeit RT-PCR konnte eine differente Expression im Vergleich der Risikoklassen R1 vs. R5 für das *HLA-DQA* nachgewiesen werden. Die Transkriptanalyse der Echtzeit RT-PCR stellte sich entgegengesetzt dem Ergebnis der Microarray-Analyse dar. Die Scrapie-resistenten, gesunden Texelschafe exprimierten mit 51.012 ± 3.477 Kopien/10 ng Gesamt-RNA 1,4-fach ($p \leq 0,004$) mehr *HLA-DQA1* als die Tiere der Risikoklasse R5 (36.196 ± 2.746 Kopien/10 ng Gesamt-RNA). Das Microarray-Ergebnis für *CD74* konnte mittels Echtzeit RT-PCR mit 16.126 ± 4.140 Kopien/10 ng Gesamt-RNA der Scrapie-resistenten Gruppe und 19.977 ± 1.355 Kopien/10 ng Gesamt-RNA der Scrapie-empfindlichen Gruppe nicht bestätigt werden ($p \leq 0,2$).

4.2 Transkriptniveau immunrelevanter Gene der Milz in den Risikoklassen R1 und R5

Die Häufung immunrelevanter different exprimierter Gene zwischen den *PRNP*-Genotypengruppen in den retropharyngealen Lymphknoten veranlasste uns, die Milz, ein Gewebe des lymphatischen Prioneninfektionsweges (Aguzzi, 2003), zusätzlich in die Echtzeit RT-PCR-Analysen einzubeziehen. Das Expressionsniveau der beschriebenen Gene *VCAMI* und *SELL* betrug durchschnittlich 33.130 ± 2.041 Kopien/10 ng Gesamt-RNA bzw. 24.792 ± 83 Kopien/10 ng Gesamt-RNA und war in den Risikoklassen R1 und R5 gleich. Diese beiden Gene wurden in der Milz wesentlich stärker als im retropharyngealen Lymphknoten exprimiert (Abbildung 13).

Hingegen war das signifikant unterschiedliche Expressionsmuster der Gene *CCL4* und *DF* aus dem retropharyngealen Lymphknoten ebenfalls in der Milz nachweisbar. Die Milz wies für *CCL4* eine mittlere Transkriptrate von 1.911 ± 48 Kopien (R1) bzw. 2.317 ± 353 Kopien/10 ng Gesamt-RNA (R5) auf. Das Expressionsniveau von *CCL4* stellte sich in der Milz entgegengesetzt den Ergebnissen des retropharyngealen Lymphknotens dar. Im Gewebe Milz wiesen die gesunden Texelschafe der Scrapie-Risikoklasse R5 im Vergleich zur Risikoklasse R1 eine 1,2-fach ($p \leq 0,04$) höhere *CCL4*-Transkription auf. Die Messung

der Transkriptrate ergab für *DF* 721 ± 72 Kopien (R1) und 534 ± 34 Kopien/10 ng Gesamt-RNA (R5). Dabei zeigte die Scrapie-resistente Gruppe für *DF* eine 1,4-fach ($p \leq 0,02$) höhere Transkription als die Scrapie-empfindliche Gruppe.

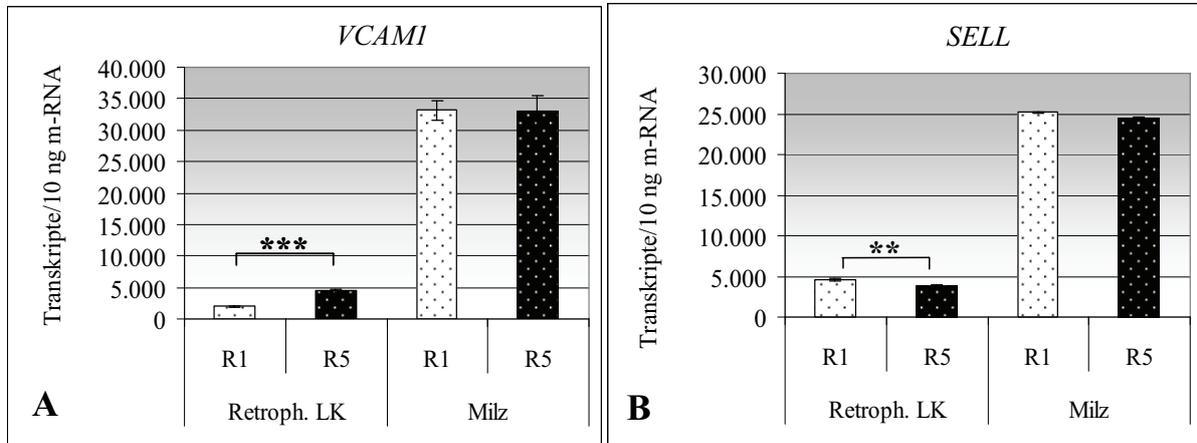


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung des Transkriptniveaus ($n = 3$) der Gene *VCAMI* (A) und *SELL* (B) in den Geweben retropharyngeale Lymphknoten und Milz mittels Echtzeit RT-PCR. (Abkürzungen: *SELL*, „selectin L“; *VCAMI*, „vascular cell adhesion molecule 1“; R1, Scrapie-Risikoklasse; R5, Scrapie-Risikoklasse; Retroph. LK, retropharyngeale Lymphknoten; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Die zusammenfassende grafische Darstellung der mittleren Transkriptionsraten der genannten signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in der Milz mittels Echtzeit RT-PCR erfolgt in Abbildung 14.

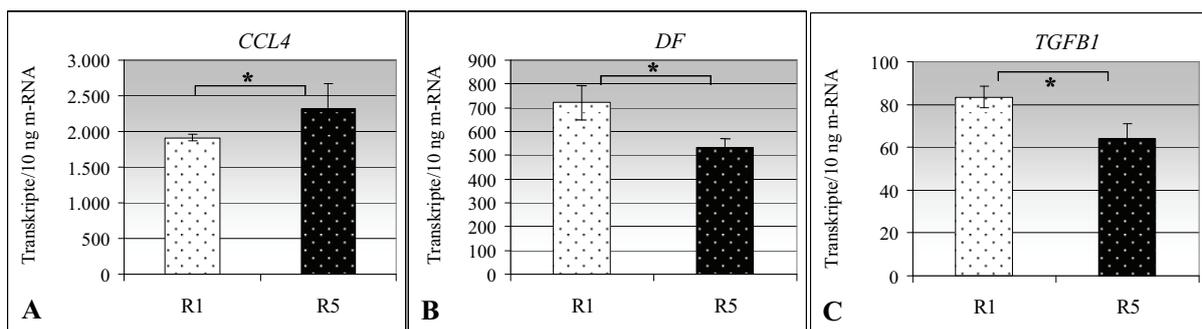


Abbildung 14: Gemessene Transkriptraten ($n = 3$) der Gene *CCL4* (A), *DF* (B) und *TGFBI* (C) in der gepoolten mRNA der Scrapie-Risikoklassen R1 ($n = 4$) und R5 ($n = 4$) mittels Echtzeit RT-PCR der Milz. (Abkürzungen: *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *DF*, „D component of complement“; *TGFBI*, transforming growth factor; R1, Scrapie-Risikoklasse; R5, Scrapie-Risikoklasse; * $p \leq 0,05$)

Eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellwachstums nimmt ein Signalprotein ein, welches durch das Gen „transforming growth factor, β 1“ (*TGFBI*) kodiert wird. Die differente Genexpression zwischen den Scrapie-Risikoklassen im retropharyngealen Lymphknoten, angezeigt durch die Microarray-Analyse, konnte mittels Echtzeit RT-PCR (R1 98 ± 11 Kopien/10 ng Gesamt-RNA, R5 103 ± 8 Kopien/10 ng Gesamt-RNA, $p \leq 0,54$) nicht bekräftigt werden.

Hingegen exprimierte die Milz gesunder Texelschafen *TGFBI* in der Scrapie-resistenten Klasse R1 (83 ± 5 Kopien/10 ng Gesamt-RNA) 1,3-fach ($p \leq 0,02$) höher als in der Scrapie-empfindlichen Klasse R5 (64 ± 7 Kopien/10 ng Gesamt-RNA).

5 Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in ausgewählten funktionellen Kandidatengenen

Die immunologisch bedeutenden Gene *VCAMI*, *SELL* und *HLA-DQA1* wurden auf Merkmalsvarianten untersucht. In diesen Genen wurde eine signifikant differente Genexpression zwischen den Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 sowohl in der Cross-Spezies-Hybridisierung als auch in der Echtzeit RT-PCR nachgewiesen.

5.1 Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in *VCAMI*

Zur Identifizierung potentieller Merkmalsvarianten in den Kandidatengenen einer unterschiedlichen Scrapie-Empfindlichkeit wurde zunächst der kodierende Bereich der gegensätzlichen *PRNP*-Genotypengruppen (R1 vs. R5) über die cRNA-Pools im different exprimierten *VCAMI* analysiert. Die vergleichende Sequenzierung des 2076 bp EST (ES414810) ergab eine Übereinstimmung von 94 % mit der mRNA des *VCAMI* (NM_174484) des *Bos taurus*.

In dem ovinen Fragment von 2076 bp wurden 14 SNP identifiziert (Tabelle 13). Aufgrund ihrer potentiell *PRNP*-abhängigen Ungleichverteilung in den Genomen der Einzeltiere, erfolgte die DNA-Sequenzierung von vier Tieren je Scrapie-Risikoklasse (R1 vs. R5). Die Einzeltier-Sequenzierung wies in den Nukleotidpositionen nt 285, nt 328, nt 383 und nt 402 eine *PRNP*-Genotypen-abhängige Verteilung auf (Tabelle 14), welche potentielle Scrapie-Empfindlichkeit-assozierte Genvarianten im kodierenden Bereich des *VCAMI* darstellen (Abbildung 15).

Tabelle 13: SNP-Detektion im ovinen 2076 bp EST (ES414810) mit Homologie zur *VCAM1* mRNA des *Bos taurus* nach vergleichender Pool-Sequenzierung aus den experimentellen Gruppen R1 vs. R5. (Abkürzungen: Pos. [nt], Position des Nukleotid; SNP, engl. single nucleotid polymorphism; G, Guanin; C, Cytosin, A, Adenin; T, Thymin)

Pos. [nt]	SNP	SNP Detektion im ES414810 zwischen Scrapie-Risikoklassen	
		Pool R1	Pool R5
10	A/T	A/T	A/T
11	A/C	A/C	A/C
285	A/G	G	A/G
328	G/A	G	A/G
383	G/A	G	A/G
403	C/A	C	C/A
456	A/C	A/C	A
561	C/T	C	C/T
782	A/G	A/G	A
833	A/G	A/G	A/G
917	T/C	T/C	T
933	T/G	T/G	T/G
1887	A/C	A/C	A/C
2033	G/T	G/T	G/T

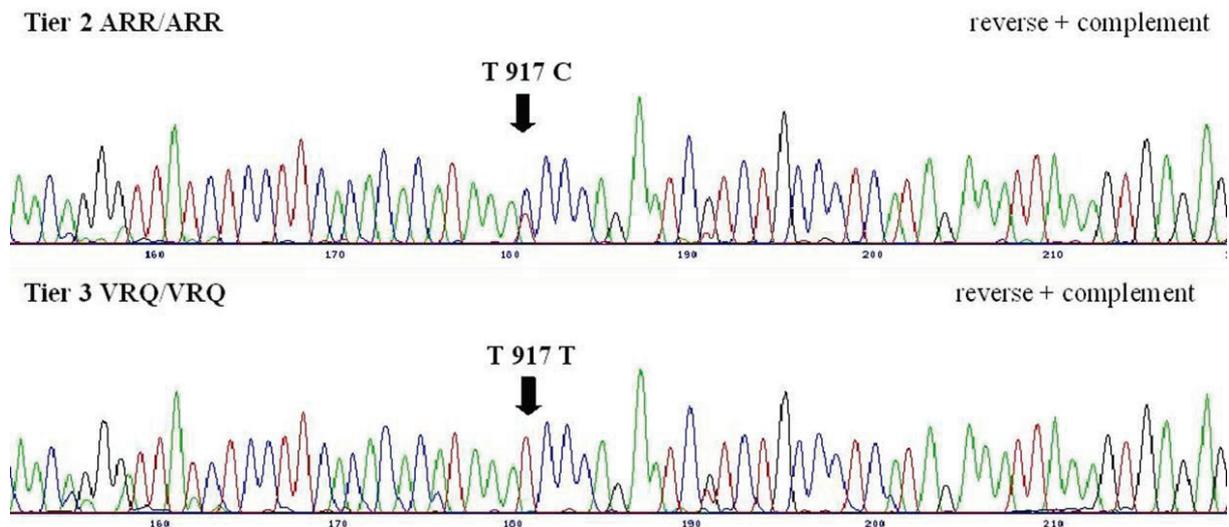


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung des SNP T917C des EST (ES414810) mit Homologie zur *VCAM1* mRNA des *Bos taurus* über Einzeltier-Sequenzierung der Texelschafe der Scrapie-Risikoklasse R1 (Tier 2) und R5 (Tier 3).

(Abkürzungen: C, Cytosin; T, Thymin; ARR/ARR, Genotyp im *PRNP* Aminosäure 136, 154 und 171; schwarz, Guanin; blau, Cytosin, grün, Adenin; rot, Thymin).

Ergebnisse

ktion und der *PRNP*-assoziierten SNP im 2076 bp EST (ES414810) mit Homologie zur *VCAMI* mRNA des *Bos taurus* Tier 4 und Tier 7 der Texelschafe aus den experimentellen Gruppen R1 vs. R5.

Nukleotid; SNP, engl. single nucleotid polymorphism; Aminosäuren: A, Alanin; R, Arginin; H, Histidin; Q, Glutamin; V, Valin; A, Adenin; T, Thymin)

der Risikoklasse R1 (<i>PRNP</i> -Genotyp)			Texelschafe der Risikoklasse R5 (<i>PRNP</i> -Genotyp)			
Tier 4 (ARR/ARR)	Tier 7 (ARR/ARR)	Tier 8 (ARR/ARR)	Tier 1 (VRQ/ARQ)	Tier 3 (VRQ/VRQ)	Tier 5 (VRQ/VRQ)	Tier 6 (VRQ/VRQ)
G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A	A/A
G/G	G/G	G/G	G/A	G/A	G/A	G/A
G/G	G/G	G/G	A/G	A/G	A/G	A/G
C/C	C/C	C/C	C/A	C/A	C/A	C/A
A/C	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
C/C	C/C	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T
A/G	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
A/G	A/G	A/A	A/G	A/G	A/G	A/G
T/C	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
T/G	T/G	T/G	T/T	T/T	T/G	T/G
A/C	A/A	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C
G/T	G/G	G/G	T/T	T/T	G/G	T/T

5.2 Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in *HLA-DQA1*

Die DNA-Sequenzierung des hochpolymorphen ovinen EST des *HLA-DQA1* (ES672871, 1.075 bp) zwischen den alternativen mRNA-Textelschafgruppen R1 vs. R5, resultierte in der Dedektion von 28 SNP (Tabelle 15). Die Datenbankabstimmung der ovinen Sequenz wies trotz einer Lücke von 9 Nukleotiden eine Homologie von 95 % zur „*Ovis aries* Merino MHC OVAR-DQA1 mRNA“ (M93430) auf.

Tabelle 15: Darstellung der SNP-Detektion im 1.075 bp Fragment des *HLA-DQA1* (ES672871) nach nach vergleichender Pool-Sequenzierung der Textelschafe (R1 vs. R5). (Abkürzungen: Pos. [nt], Position des Nukleotid; SNP, engl. single nucleotid polymorphism; G, Guanin; C, Cytosin, A, Adenin; T, Thymin)

Pos. [nt]	SNP	SNP Detektion im ES672871 zwischen Scrapie-Risikoklassen	
		Pool R1	Pool R5
126	A/G	A	G
135	A/G	G	A
140	C/T	C	C/T
149	A/C	A	C
150	A/T	A	T
198	C/G	C	C/G
200	A/G	A/G	G
222	C/A	C	A
242	A/G	A/G	G
246	A/G	A	G
255	G/C/A	G	C/A
258	G/T	GT	T
261	G/A	G	A
262	G/C	G	G/C
264	T/A	T	A
265	G/A	A	G
266	T/G/A	T	G/A
279	T/G	T/G	G
280	T/G	T	G
296	A/C	A	A/C
303	T/G	T	G
304	T/C/G	T/C	G
305	C/G	C	G
321	C/A	C	A
324	A/T	A	T
465	T/C	T	C
508	C/A	C/A	A
713	C/T	C/T	C

Die potentiell *PRNP*-abhängigen ungleich zwischen den Risikoklassen R1 und R5 verteilten SNP konnten in den acht Texelschafen über Einzeltier-Sequenzierung nicht bestätigt werden.

5.3 Identifizierung potentieller merkmalsassoziierter Varianten in *SELL*

Der mutmaßliche kodierende Bereich von *SELL* des *Ovis aries* wurde als EST (ES414811) mit 1.164 bp Fragmentlänge zwischen Scrapie-Risikoklassen R1 vs. R5 vergleichend analysiert. Dieses Fragment weist eine Homologie von 96 % zur mRNA *SELL* des *Bos taurus* (NM_174182) auf. In dem ovinen Fragment wurden über die vergleichende Sequenzierung der gepoolten mRNA der alternativen Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 keine SNP detektiert.

6 Frequenzanalyse der C403A-*VCAMI*-Genvariante in den unterschiedlichen Scrapie-Risikoklassen beim Texelschaf

Die Ergebnisse der RFLP-Analyse zur Prüfung der ermittelten *PRNP*-Assoziation des SNP C403A im kodierenden Bereich des *VCAMI* (ES414810) in den alternativen Risikoklassen sind in Tabelle 16 dargestellt. Von den 90 analysierten Texel-Böcken trugen 62 Tiere den Genotyp CC und 28 Tiere den Genotyp CA. Der theoretisch vorkommende Genotyp AA im SNP C403A wurde im analysierten Tiermaterial nicht detektiert. In der Population von 90 Texel-Böcken betrug die Allelfrequenz im SNP C403A 0,84 für das Allel C bzw. 0,16 für das Allel A.

Tabelle 16: Frequenzanalyse im SNP C403A des *VCAMI* (ES414810) in Abhängigkeit der *PRNP*-bedingten Scrapie-Risikoklassen (Dawson *et al.*, 1998) mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse.

(Abkürzungen: R1-R5, Risikoklassen; CC, Genotyp CC im SNP C403A; CA, Genotyp CA im SNP C403A; AA, Genotyp AA im SNP C403A).

Scrapie-Risikoklasse	Anzahl Tiere	Genotyp <i>VCAMI</i> C403A		
		CC	CA	AA
R1	25	18	7	0
R2	6	2	4	0
R3	30	23	7	0
R4	23	15	8	0
R5	6	4	2	0
<i>Gesamt</i>	<i>90</i>	<i>62</i>	<i>28</i>	<i>0</i>
<i>Gesamt [%]</i>	<i>100</i>	<i>68,9</i>	<i>31,1</i>	<i>0</i>

Der SNP C403A-*VCAMI* befand sich nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) (χ^2 0,324) einer idealen Population. Das Maß |D| gibt die Abweichung der beobachteten

Genotypen vom HWE an. Die Abweichung der Verteilung des SNP C403A vom HWE betrug für die beobachteten Genotypen CC $|D| = 0,44$ und CA $|D| = 0,19$. Der nicht beobachtete Genotyp AA weicht mit $|D| = 0,25$ vom HWE ab. Aufgrund der geringen Beobachtungszahlen zu den einzelnen Genotypen ($n < 5$) mit dem Problem der Signifikanzüberschätzung bei geringen Genotypenerwartungswerten im χ^2 -Test kann keine statistisch gesicherte Aussage gemacht werden.

E Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass gesunde, nicht infizierte Schafe der Rasse Texel mit unterschiedlichen Scrapie-Resistenz-assoziierten *PRNP*-Genotypen signifikante Unterschiede im Expressionsniveau von Genen aufweisen, die insbesondere den Stoffwechselwegen der Immunantwort bzw. der Abwehr externer Stimuli und Pathogene zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese des Vorkommens zusätzlicher, mit dem *PRNP* co-regulierter bzw. gekoppelter physiologischer, die Scrapie-Empfindlichkeit modifizierender Faktoren.

Die vergleichende Expressionsuntersuchung erfolgte mittels heterologer Chip-Hybridisierung von fünf Geweben gesunder, nicht infizierter Texelschafe der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5. Die erfolgreiche heterologe Hybridisierung zwischen verschiedenen Spezies ist von vielen Faktoren abhängig. Hierzu zählen die Templatelänge, die prozentuale Übereinstimmung der orthologen Sequenzen sowie die Art und Verteilung von Basenfehlpaarungen (Rinaudo & Gerin, 2004). In mehreren Arbeiten wurde demonstriert, dass unter stringenten Hybridisierungsbedingungen, wie sie in dem hier vorgestellten experimentellen Ansatz gewählt wurden, Kreuzhybridisierungen zwischen Spezies mit einer Sequenzhomologie $\leq 96\%$ in der kodierenden Region möglich sind (Adjaye *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Klener *et al.*, 2006). Die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) verwendet auf ihren Arrays eine Templatelänge von 50 mer, da sich diese Matrixlänge als Optimum in der Genspezifität erwies (Kane *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2001).

Im Vorversuch konnte nach Maßgabe des hohen Anteils von Genen (Spots) mit einem Hybridisierungssignal gezeigt werden, dass im Vergleich zur heterologen Hybridisierung von oviner RNA auf dem „mouse 10k array“ und „rat 10k array“ die Hybridisierung auf dem humanen Chip eine ausreichend informative vergleichende Expressionsanalyse ermöglicht. Dieser Befund wird durch die im Vergleich zur Maus und Ratte höhere Sequenzhomologie zwischen Mensch und Schaf (MWG Biotech AG, Ebersberg, persönliche Mitteilung) und die in der vorliegenden Untersuchung exemplarisch nachgewiesene Sequenzidentität ausgewählter Gene unterstützt. Da bis zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns ovine Oligonukleotid-Arrays kommerziell nicht verfügbar waren, wurde die heterologe Chip-Hybridisierungs-Technologie mit dem humanen „10k array“ durchgeführt (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Die hohe Anzahl an Hybridisierungssignalen zwischen oviner mRNA der Leber und dem „10k array“ der Spezies *Homo sapiens* zeigte, dass über diesen Ansatz eine repräsentative vergleichende Genomexpressionsanalyse möglich ist.

In den fünf untersuchten Geweben Stammhirn, Jejunum, Ileum im Bereich der Peyer'schen Platten, retropharyngeale Lymphknoten und Leber wurden 75 % bis 91 % der Gene auf dem „human 10k array“ mit einem auswertbaren Signal detektiert. Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, da das Schaf dem Menschen evolutionär näher steht als den Rodentia Ratte und Maus. Der Informationsgehalt des humanen Microarray ist auf Grundlage des entschlüsselten Genoms und der hohen Anzahl bekannter Gene mit ca. 9.800 Annotationen auf dem „10k array“ ähnlich der Maus (9.600 Annotationen) und im Gegensatz zur Ratte (ca. 5.600 Annotationen) am höchsten. Der hohe Anteil an Genen mit auswertbaren Hybridisierungssignalen in den verschiedenen Geweben und die gezeigte Sequenzübereinstimmung zwischen *Ovis aries* und *Homo sapiens* bilden günstige Voraussetzungen für die Analyse der *PRNP*-bedingten physiologischen Unterschiede beim Schaf hinsichtlich dessen Scrapie-Empfindlichkeit. Die in diesem Versuchsansatz erwünschte Extraktion physiologischer Mechanismen aus dem Expressionsprofil nach heterologer Chip-Hybridisierung wird durch die vorhandenen Informationen zu den Genen entschieden beeinflusst (Tsai *et al.*, 2006).

Das Fehlen adäquater Sequenzinformationen für das Schaf und auch oviner Microarrays macht die Cross-Spezies-Chiphybridisierungs-Technologie äußerst interessant für die wissenschaftliche Erforschung des Nutztieres Schaf. Die Verwendung der in den letzten Jahren auf den Markt gebrachten bovinen Microarrays sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden, jedoch ist hier die genomweite Sequenzabdeckung und Genannotation im Vergleich zum Menschen weniger fortgeschritten.

Viele bisherige „Expressionprofiling“-Studien, untersuchten den Einfluss der Scrapie-Infektion auf die Genexpression, wobei sie vorrangig verschiedene Areale des ZNS zum Gegenstand hatten (Duguid *et al.*, 1989; Diedrich *et al.*, 1991; Kenward *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1994; Riemer *et al.*, 2000). Mit den vorliegenden Untersuchungen lag zum ersten Mal der Fokus im vergleichenden „Expressionprofiling“ gesunder, nicht infizierter Tiere der gegensätzlichen Scrapie-Risikoklassen R1 und R5. Den genetischen Einfluss des *PRNP* auf eine potentielle Ausprägung der Scrapie repräsentieren Texelschafe mit dem Genotyp ARR/ARR (R1) bzw. VRQ/VRQ und VRQ/ARQ (R5). Unter Verwendung der

Chip-Hybridisierungs-Technologie konnten wir zeigen, dass sich im Stammhirn gesunder, nicht infizierter Schafe keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen Genotypen belegen lassen. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse des durchgeführten Protease-Tests daraufhin, dass sich die Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung in einem gesunden, infektionsfreien Zustand befanden.

Die Leber ist das stoffwechselaktivste Gewebe höherer Organismen mit einer Vielzahl von Funktionen. Der Abbau stoffwechseleigener und stoffwechselfremder Substanzen, die Regulation der Energiebilanz über den Glukose-, Protein- und Fettstoffwechsel sowie die Hormonsynthese gehören zu den Hauptaufgaben der Leber (Prenzlín, 1996). Für die Leber ergaben sich im Expressionsprofil nach den genannten Kriterien keine Unterschiede zwischen der Risikoklasse R1 und R5. Dies deutet darauf hin, dass die differente Scrapie-Empfindlichkeit der beiden *PRNP*-Genotypen offensichtlich nicht mit deren Leberstoffwechsel assoziiert ist.

Als möglicher, die Scrapie-Empfindlichkeit modifizierender Faktor wird in der Literatur der Infektionsweg diskutiert (Sales, 2006). Im angenommenen komplexen Infektionsweg der pathogenen Prionen spielen die in der vorliegenden Studie untersuchten Gewebe eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich wird der Infektionsweg in vier Stadien untergliedert (van Keulen *et al.*, 2002). Dieser beginnt mit der PrP^{Sc}-Aufnahme über Gewebe des GALT und MALT, gefolgt von der lymphatischen Invasion mit anschließendem Übergang zur neurologischen Invasion und schlussendlich der Etablierung der Erkrankung im ZNS.

In dieser Studie zeigten die Gewebe des GALT, Ileum im Bereich der Peyer'schen Platten und Jejunum, keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil zwischen Schafen mit Scrapie-resistenten (R1) und Scrapie-empfindlichen (R5) *PRNP*-Genotypen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die gesunden Tiere der gegensätzlichen Risikoklassen in diesen Geweben den gleichen physiologischen Hintergrund besitzen, der aber keinen Einfluss auf eine potentielle Scrapie-Infektion hat. Frühere Studien stellen die Peyer'schen Platten als ein bestimmendes Gewebe im Infektionsweg der Prionen dar, da sich hier erste Akkumulationen der PrP^{Sc} nachweisen lassen (Hadlow *et al.*, 1982; van Keulen *et al.*, 1999; Andreoletti *et al.*, 2000). Weiterhin wurde beobachtet, dass auf dem oralen Infektionsweg die Empfindlichkeit einer Prionenerkrankung mit der Anzahl der Peyer'schen Platten im Darm positiv korreliert (Prinz *et al.*, 2003). Die Rolle des GALT im Fall einer oralen Infektion wird kontrovers

diskutiert, da die Verdauungssäfte in der Lage sind, sowohl die zelluläre als auch die pathogene Form der Prionen aufzuschließen. Daraus stellt sich die Frage, woher die ersten akkumulierten PrP^{Sc} der Peyer'schen Platten stammen (Jeffrey *et al.*, 2006). Trotzdem bilden einmal etablierte PrP^{Sc} in den Peyer'schen Platten die Basis für eine weitere Infektionsausbreitung auf Grundlage des engen Kontaktes zu den autonomen Nervenbahnen des Verdauungstraktes.

Im Gegensatz zu den beiden Geweben des GALT wurden im retropharyngealen Lymphknoten, der zu den Geweben des MALT gehört, hoch signifikante Unterschiede im Expressionsmuster gesunder Texelschafe beider Scrapie-Risikoklassen nachgewiesen. So wiesen Gene der „Immunantwort“ und „Reaktion auf einen exogenen Stimulus“ bei den empfindlichen Tieren (R5) überwiegend signifikant verminderte Transkriptionen im Vergleich zu den Scrapie-resistenten Tieren (R1) auf. Diese beobachtete verminderte Immunreaktivität der Scrapie-empfindlichen Genotypengruppe könnte mit aktuellen Befunden in Verbindung stehen, die zeigen dass Schafe mit V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁-Genotyp (R5) eine sehr frühe Akkumulation der PrP^{Sc} in den Tonsillen und retropharyngealen Lymphknoten zeigten (Langeveld *et al.*, 2006). Hingegen konnte bei Schafen mit dem Genotyp A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁ (R1) kein PrP^{Sc} im lymphatischen Gewebe nachgewiesen werden (Schreuder *et al.*, 1996; van Keulen *et al.*, 1996). Der engen Verbindung des retropharyngealen Lymphknotens mit den Mechanismen der TSE, welcher in dieser Untersuchung als alleiniges der fünf untersuchten Gewebe ein differentes Expressionsprofil aufwies, wird durch die Verwendung dieses Gewebes zum Nachweis von Prionen im Rahmen des Scrapie-Monitoring Rechnung getragen.

Über vergleichende Genkarten (Cosseddu *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Maddox, 2005) konnten die different exprimierte Gene des retropharyngealen Lymphknotens *in silico* lokalisiert werden. Da sie mit dem genomweiten „human 10k array“ detektiert wurden, zeigten die Gene auch eine gleichmäßige Verteilung über das Schafgenom. Eine Clusterung oder Anhäufung im *PRNP*-Genombereich (OAR 18) kann ausgeschlossen werden.

Innerhalb des MALT könnten physiologische Unterschiede, bedingt durch Gen-Gen-Interaktionen zwischen *PRNP* und anderen bisher unbekannt Genen die potentielle Prionenaufnahme oder die Pathogenabwehr im genotypisch differenten Tier beeinflussen. Von den different exprimierte Genen des retropharyngealen Lymphknotens (336 Gene) konnten 75 % der Gene physiologischen Prozessen bzw. 49 % der Gene bekannten

Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Trotz der komplexen Vielfalt und Verknüpfungsmöglichkeiten der verschiedenen metabolischen Wege des Organismus (parallele Zuordnung der different exprimierten Gene zu mehreren physiologischen Prozessen bzw. Stoffwechselwegen) legt sich der Fokus aufgrund der signifikant erhöhten Anzahl different exprimierter Gene auf die Stoffwechselwege des Immunsystems. Diese umfassen das „Komplementsystem“, die „humorale Immunantwort“, die „Endozytose“ und die von „Natürlichen Killerzellen-vermittelte Zytotoxizität“. Darüber hinaus unterstreichen sowohl die beobachteten signifikant regulierten Stoffwechselwege „IL-3 Signaltransduktion“, „Tight junctions“ und „Adherence junctions“, als auch die „Lymphozyten Adhäsion und Haftung“ im retropharyngealen Lymphknoten den engen Zusammenhang des Immunsystems mit der inter- und intrazellulären Signalvermittlung. Diese different zwischen gesunden Texelschafen der Scrapie-Risikoklassen R1 und R5 regulierten Stoffwechselwege könnten die lymphatische Invasion des PrP^{Sc} in diesen Geweben beeinflussen. Die bei den gesunden Tieren beider Risikoklassen R1 und R5 beobachteten Unterschiede sollten nicht zur Beeinträchtigung der Gesundheit beider *PRNP*-Genotypen im Normalzustand führen. Allerdings könnten im Fall einer Scrapie-Infektion diese different regulierten Stoffwechselwege eine wichtige Rolle bei der Modulation der Pathogeninvasion und migration bzw. der Abwehrreaktion innerhalb der lymphatischen Gewebe des MALT spielen. Die Funktion unterschiedlicher Lymphknoten während der lymphatischen Invasion variiert abhängig vom Infektionsdruck, Alter und *PRNP*-Genotyp des Wirtes sowie dem Erregerstamm (Ersdal *et al.*, 2005). Langeveld *et al.* (2006) fassen die unterschiedlichen Standpunkte der Wissenschaftler bezüglich der Beteiligung des LRS im Infektionsweg der Scrapie zusammen. Sie schlussfolgern, dass die Einbeziehung der peripheren lymphoiden Gewebe in klinischer und prä-klinischer klassischer Scrapie nicht uneingeschränkt gültig ist. In unserer vergleichenden Untersuchung der *PRNP*-Genotypen der Risikoklassen R1 und R5 wurden mittels Cross-Spezies-Hybridisierung transkriptionelle Differenzen im retropharyngealen Lymphknoten sowohl im angeboren als auch im erworbenen Immunsystem aufgezeigt.

In der vorliegenden Studie konnte weiterhin eine signifikant erhöhte Anzahl von sieben different exprimierten Genen zur Regulation der Blutzirkulation im retropharyngealen Lymphknoten nachgewiesen werden. Diese wurden vergleichsweise geringer in der Scrapie-empfindlichen Risikoklasse (R5) exprimiert. Mabbott & MacPherson (2006) weisen auf die enge Beziehung zwischen dem Lymphknoten und dem Blutkreislauf bzw. der Lymphozyten-

Rezirkulation im Hinblick auf Prionenerkrankungen im Verhältnis zu einzelnen lymphatischen Komponenten hin. Die Möglichkeit der Prioneninfektion und -ausbreitung über den Blutkreislauf untersuchten Heggebo *et al.* (2003). Dieser Infektionsweg konnte über die erfolgreiche Transfusion von Vollblut bzw. Leukozytenfilm von natürlich erkrankten Schafen in empfindliche aber Scrapie-freie Empfängertiere von Hunter *et al.* (2002) bestätigt werden, wobei der genetische Einfluss in dieser Analyse berücksichtigt wurde. Die vorliegenden eigenen Ergebnisse zu den physiologischen Unterschieden in Regulationsmechanismen der Blutzirkulation der gesunden Texelschafe der beiden Risikoklassen R1 und R5 entsprechen diesen erzielten Resultaten.

Mittels der quantitativen Echtzeit RT-PCR konnte eine differente Expression ausgewählter Gene im retropharyngealen Lymphknoten (*SELL*, *CCL4* und *VCAMI*) und in der Milz (*CCL4*, *DF* und *TGFBI*) experimentell verifiziert werden. Die Milz wurde aufgrund ihrer Bedeutung für die Speicherung und Bildung der Lymphozyten und Makrophagen sowie ihrer Verantwortung in der Immunantwort (Antigene des Blutes) in die Untersuchungen zusätzlich einbezogen. Im Verlauf einer Scrapie-Infektion akkumulieren die PrP^{Sc} in den unterschiedlichen Zelltypen der Milz, welche wiederum in der Lage sind, diese zum peripheren Nervensystem weiterzuleiten (Kimberlin & Walker, 1979; Aucouturier *et al.*, 2001). Risikoklassenspezifische Genexpressionsunterschiede (R1 vs. R5) über die different exprimierte Genen *CCL4*, *DF* und *TGFBI* des retropharyngealen Lymphknotens nach heterologer Chip-Hybridisierung konnten ebenfalls in den in der Milz mittels Echtzeit RT-PCR nachgewiesen werden. Die gewebsspezifischen Unterschiede in den sekundären immunologischen Organen repräsentieren die variable Funktion mehrerer Komponenten des Lymphsystems und bestärken die Hypothese einer „Gewebebarriere“ innerhalb des Prioneninfektionsweges (Moudjou *et al.*, 2001).

So z. B. konnte für die Gene *SELL* und *CCL*, die neben weiteren Signalstoffen, wie Cytokine und Chemokine (Abbildung 16) eine wichtige Rolle bei der Lymphozytenaktivierung spielen (Sperandio, 2006), ein höheres Expressionsniveau bei den Scrapie-resistenten Texelschafen (R1) im Vergleich zu den Scrapie-empfindlichen Tieren (R5) im retropharyngealen Lymphknoten beobachtet werden. Lejtenyi *et al.* (2003) wiesen die verminderte Lymphozytenpopulationen in der Milz von *SELL*-„knock-out“-Mäusen nach, wobei die allgemeine Lymphozytenrezirkulation gewährleistet war. In diesem Zusammenhang kann in

der vorliegenden Studie die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Einschränkung der Lymphozytenaktivierung und migration, insbesondere der T-Lymphozyten, in den peripheren Lymphknoten der Scrapie-empfindlichen Schafe (R5) bestehen könnte.

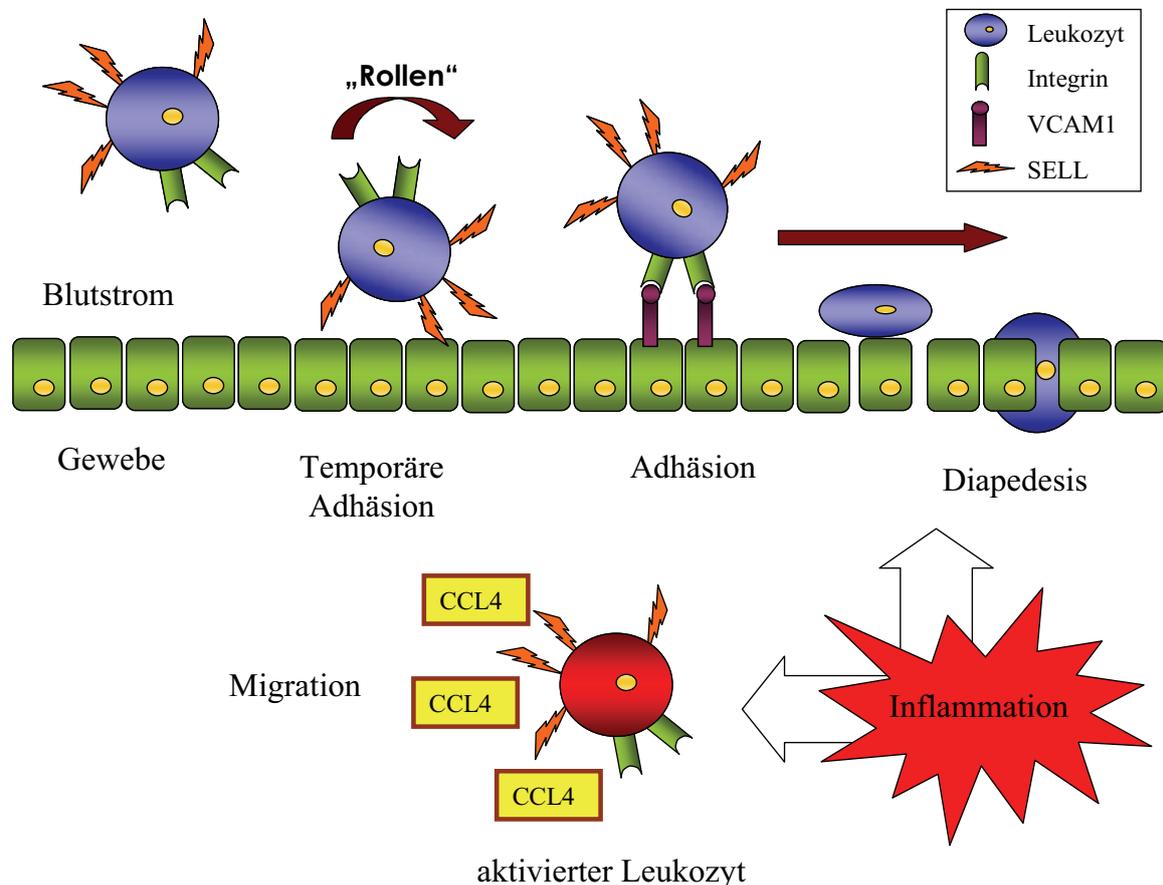


Abbildung 16: Signale der Inflammation forcieren die Adhäsion und Diapedesis zirkulierender Lymphozyten zur Aktivierung. In diesen Prozess sind die different exprimierte Gene *VCAM1*, *SELL* und *CCL4* des retropharyngealen Lymphknotens involviert. (Abkürzungen: *CCL4*, „chemokine (C-C motif) ligand 4“; *SELL*, „selectin L“; *VCAM1*, „vascular cell adhesion molecule 1“)

Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich zwischen Blutstrom, lymphoidem Gewebe und inflammatorischem Gewebe. Über die hohen Endothelzellen (HEV) verlassen die inaktiven Lymphozyten den Blutstrom und gelangen zur Aktivierung in die Lymphknoten. Für die temporäre Haftung zwischen Endothel und Lymphozyten, dem so genannten „Rollen“, exprimieren diese in hohem Maße *SELL* für das Oberflächenrezeptorprotein „selectin L“. In Bezug auf die im Vergleich R1 vs. R5 geringere *SELL*-expression in den Scrapie-empfindlichen gesunden Texelschafen dieser Studie ergeben sich Hinweise auf eine genetisch determinierte verminderte Lymphozyten-Adhäsion in den retropharyngealen Lymphknoten.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des Proteins „selectin L“ die Adhäsion der Lymphozyten reduziert, jedoch die allgemeine Leukozytenemigration, wahrscheinlich kompensatorisch, gesteigert wird (Hickey *et al.*, 2000). Lymphozyten von *SELL*-„knock out“-Mäusen binden nicht an die HEV, was zur starken Verringerung der B-Lymphozyten und NK-Zellen-Population in den peripheren Lymphknoten führt (Lejtenyi *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass in dem Scrapie-resistenten Genotyp (R1) diese beiden Gene *SELL* und *CCL4* vergleichsweise höher exprimiert werden. Dies spricht im Zusammenhang mit der Vielzahl immunrelevanter Gene aus den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen für eine stärkere Aktivität bzw. Bereitschaft der Immunreaktion auf externe Reize und Inflammationsprozesse bei den Scrapie-resistenten Schafen mit dem *PRNP*-Genotyp ARR/ARR.

Des Weiteren wies das Gen *VCAMI* im Expressionsprofil des retropharyngealen Lymphknotens eine höhere Expression in den Schafen der *PRNP*-Genotypengruppe R5 auf. Das Adhäsionsmolekül nimmt während des Prozesses des „homing“ zirkulierender Lymphozyten eine wesentliche Rolle im Stoffwechselweg „Adhäsion und Diapedesis“ ein, wie schon zuvor die Gene *SELL* und *CCL4* (Abbildung 16). Es deutet darauf hin, dass die Endothelzellen der Scrapie-empfindlichen Schafe vermehrt das „vasculäre Adhäsionsmolekül 1“ aufweisen. Dieses Molekül wird durch cytokinaktivierte Endothelzellen auf deren Oberfläche exprimiert und interagiert mit dem Integrin aktivierter Lymphozyten während der permanenten Phase der Haftung (Cybulsky *et al.*, 1991). Proinflammatorische Cytokine initiieren die Expression von *VCAMI* in Regionen, die für eine Läsion anfällig sind, bevor die Läsion in dem entzündeten Gewebe aber auch im normalen Gewebe über die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies ausgebildet wird (Pepinsky *et al.*, 1992). Auf diese Weise können insbesondere Monozyten und aktivierte T-Lymphozyten durch die Endothelschicht über die Anheftung an das vasculäre Adhäsionsmolekül 1 zum Entzündungsherd hindurch treten. Der Vergleich zwischen den Risikoklassen R1 und R5 zeigte eine besonders hohe *VCAMI*-Expression in der Scrapie-empfindlichen Risikoklasse. Die höhere Expression könnte die Permeabilität zwischen den Endothelzellen in diesem Genotyp steigern, so dass Monozyten und T-Lymphozyten aber auch Pathogene leichter durch die Endothelbarriere wandern können.

Darüber hinaus stützen die beobachteten Expressionsunterschiede von *HRAS* und *FYN* zwischen den Texelschaften der Risikoklassen R1 und R5 die Hypothese, dass die Scrapie-Empfindlichkeit neben den *PRNP*-Genotypen auch von Mechanismen des Erregertransportes beeinflusst werden kann. *HRAS* und *FYN* sind Schlüsselgene der Signalweiterleitung und weisen, wie Gene der „Tight junctions“ und „Adherence junctions“, eine höhere Expressionsrate bei Tieren der resistenten Klasse (R1) auf. Sowohl die Epithelbarriere zwischen den einzelnen Geweben als auch die selektive Passage von Molekülen wird von zelläußeren und -inneren Signalen durch die „Tight junctions“ und „Adherence junctions“ bestimmt. Mehrere different exprimierte Gene des retropharyngealen Lymphknotens lassen sich diesen Stoffwechselwegen der Signaltransduktion und Zellkommunikation zuordnen und sind vergleichsweise geringer in der Scrapie-empfindlichen Klasse R5 exprimiert (Abbildung 11). So wird z. B. die Regulation des Zytoskelettes durch „claudin 8“ (*CLDN8*) in Verbindung mit dem „tight junction protein 3“ (*TJP3*) und dem signalvermittelndem „guanine-nucleotide binding protein“ (*GNAI2*) beeinflusst. Ebenso wurden die Gene *ITSN2*, *STAB1*, *RAMP2*, *SCARF1*, *SNX15*, *SNX17* und *ARF3*, welche die rezeptorgeleitete Endozytose regulieren, vergleichsweise höher in den retropharyngealen Lymphknoten der Risikoklasse R1 exprimiert. Dies gibt Hinweise auf eine möglicherweise selektivere Antigen-Aufnahme und somit einen effektiveren Schutz dieser Eintrittsmöglichkeit der Pathogene im Scrapie-resistenten Genotyp.

Eine „schwache“ Epithel- bzw. Endothelbarriere mit einer potentiell höheren Permeabilität der Endothelzellen nach Maßgabe der höheren *VCAM1* Expression in der Risikoklasse R5 gibt ebenfalls Hinweise auf eine vereinfachte Eintrittsmöglichkeit des Pathogenes. Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass in Tieren der Scrapie-resistenten Risikoklasse R1 eine bessere Ausprägung der Haftung und Bindung zwischen den Zellen besteht. Die mit diesem Prozess verbundene kontrollierte Barriere für Moleküle und Ionen im intrazellulären Raum stellt die erste Ebene der Pathogenabwehr innerhalb der Immunantwort dar. Zusammen mit einer wirksamen inter- und intrazellulären Signalübertragung könnten diese Mechanismen der Genotypengruppe ARR/ARR der Scrapie-resistenten Risikoklasse R1 wesentlichen Einfluss auf die Prioneninfektionsabwehr nehmen.

HRAS und *FYN* als Schlüsselgene der Signalweiterleitung sind im Zusammenhang mit Prionen insbesondere in der T-Lymphozyten Aktivierung und in der Zell-Zell-

Kommunikation von Bedeutung (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Griffoni *et al.*, 2003; Bainbridge & Walker, 2005). Ebenso wie die oben genannten Gene der „Tight junctions“ und „Adherence junctions“ dieser Studie wiesen sie eine höhere Expressionsrate bei Tieren der resistenten Klasse (R1) auf. Daher könnte dieser Mechanismus der Signalweiterleitung mit einer verminderten Antigen-Aufnahme und folglich einem effektiveren Schutz im Scrapie-resistenten Genotyp ARR/ARR verbunden sein.

Auch wenn grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass die *PRNP*-Genvarianten direkt die T-Lymphozyten-Aktivierung und damit die Freisetzung von Chemokinen und Cytokinen beeinflussen, so weisen doch die komplexen Expressionsunterschiede auf die Wirkung anderer möglicherweise mit dem *PRNP* co-regulierte bzw. gekoppelte Mechanismen hin. So lässt sich die Mehrzahl der different zwischen den Risikoklassen R1 und R5 exprimierten Gene dieser Studie sowohl der zellulären und humoralen Immunantwort als auch der unspezifischen und adaptiven Immunantwort zugeordnen. Die in früheren Untersuchungen beobachtete bevorzugte erste PrP^{Sc}-Akkumulation während der Prionenerkrankung innerhalb des Lymphknotens im Germinalzentrum (Heggebo *et al.*, 2003) weist auf eine mögliche biologische Relevanz der beobachteten Expressionsunterschiede hin. Aufgenommene Antigene aktivieren das Germinalzentrum, welches daraufhin die B-Lymphozyten Proliferation und die Reifung der FDC innerhalb des Lymphknotens aktiviert. Beide Zellarten stellen Hauptkomponenten der effektiven lymphatischen Invasion während der Prioneninfektion dar (van Keulen *et al.*, 1999; Aguzzi, 2001; Detwiler & Baylis, 2003) und nehmen Schlüsselpositionen in der PrP^{Sc}-Vermehrung ein.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass die vorliegenden Untersuchungen nachdrücklich das Auftreten weiterer Faktoren unterstützten, welche die Scrapie-Infektion modifizieren und mit dem *PRNP*-Genotyp assoziiert sind. Der *PRNP*-Genotyp ist ein genetischer Faktor, der die Prionenerkrankung beeinflusst. Weitere genetische Faktoren werden durch bisher kartierte Scrapie-QTL bei Maus und Schaf und die polygene Varianz angezeigt. Frühere Untersuchungen belegen, dass die Polymorphismen im *PRNP* allein den genetischen Einfluss und die hohe Diversität bei der Ausprägung der Scrapie nicht erklären können. Andere genetische Faktoren tragen zur Krankheitsentwicklung bei oder unterdrücken diese (Tranulis, 2002). Die Verknüpfung des *PRNP*-Genotypes mit der Risikoklasse ist nicht für alle Scrapie-infizierten Herden hilfreich (Baylis *et al.*, 2000), da sich die Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber Scrapie inhomogen zwischen den einzelnen Schafrassen zeigt. Dies

fürte 2003 zur Modulierung der Risikoklassen (R1-R5) in Empfindlichkeits- oder Genotypengruppen (G1-G5) durch das „Department for Environment, Food and Rural Affairs“ in London, Großbritannien (DEFRA, 2003). Im Falle der Genotypen, die in dieser Studie Verwendung fanden, hat dies keine Auswirkungen, da die Tiere in der gleichen Genotypengruppe mit dem entsprechendem Risiko an Scrapie zu erkranken, verblieben.

Der Nachweis atypischer Scrapie beim Schaf im *PRNP*-Genotyp homozygot $A_{136}R_{154}R_{171}$ zeigt allerdings, dass die Risikoklasse R1 und Genotypengruppe G1 nicht in sich resistent gegenüber Scrapie sind (Benestad *et al.*, 2003; Buschmann *et al.*, 2004; Orge *et al.*, 2004). Physiologische Effekte unbekannter, gekoppelter Gene in der Genomregion des *PRNP* bzw. polygene Effekte sind wahrscheinlich in die komplexen Abläufe einer Scrapie-Ausprägung beim Schaf bzw. allgemein in die TSE-Erkrankungen involviert.

F Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Aufklärung möglicher physiologische Eigenschaften einer differentiellen Scrapie-Empfindlichkeit auf Basis vergleichender Expressionsanalyse von gesunden Schafen mit unterschiedlicher Prädisposition an Scrapie zu erkranken (*PRNP*-Genotypen der Risikoklasse R1 vs. R5). Von den gesunden, nicht infizierten Tieren beider Risikoklassen wurden fünf Gewebe mittels Microarray-Hybridisierungstechnik vergleichend untersucht. Diese sind in den Erregertransport (Ileum im Bereich der Peyer'schen Platten, Jejunum, lymphatisches System), die Ausprägung der Erkrankung (Stammhirn) bzw. in eine differente Stoffwechselaktivität der Tiere (Leber) involviert. Weder im Bereich des vermuteten Eintritts infektiöser Prionen (Ileal Peyer'sche Platten, Jejunum), in der stoffwechselaktiven Leber noch im Stammhirn, dem eigentlichen Zielorgan der Erkrankung, wurden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den gesunden, nicht infizierten Schafen beider Risikoklassen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden im retropharyngealen Lymphknoten signifikante Expressionsunterschiede, definiert durch 336 different exprimiert Gene, zwischen den Texelschafen der Risikoklassen R1 und R5 beobachtet. Der Großteil der Gene ($n = 291$, 86,6 %) zeigte eine vergleichsweise erhöhte Expression in der resistenten *PRNP*-Genotypengruppe ARR/ARR (Risikoklasse R1). Von den 336 different exprimierten Genen konnten 252 Gene entsprechend ihrer bekannten Funktion physiologischen Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Die erhöhte Anzahl different exprimierter Gene in Stoffwechselwegen der Immunantwort bzw. Abwehr externer biotischer Reize weist auf ausgeprägte physiologische Unterschiede zwischen gesunden, nicht infizierten Texelschafen der Risikoklassen R1 und R5 im lymphatischen System hin. Der retropharyngeale Lymphknoten und seine immunologisch unterschiedlichen Stoffwechselwege nehmen im Bereich des MALT eine zentrale Rolle in der Erregerabwehr bzw. im Infektionsprozess der Prionen ein. Weiterführende Untersuchungen an der immunrelevanten Milz bestätigten die differente Expression einzelner Gene zwischen hoch resistenten und hoch empfindlichen gesunden, nicht infizierten Texelschafen. Die Genexpression der Milz unterschied sich von den beobachteten different exprimierten Genen des retropharyngealen Lymphknotens. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die *PRNP*-Genotypen mit unterschiedlichen Stoffwechsellagen im Organismus assoziiert sind, welche die unbekanntenen Prozesse der Scrapie-Infektion zu beeinflussen vermögen. Dabei ist es wahrscheinlicher, dass die komplexen Unterschiede im Expressionsprofil auf Effekte

unbekannter, gekoppelter Gene in der Genomregion des *PRNP* bzw. polygene Effekte zurückzuführen sind und nicht ursächlich auf die *PRNP*-Varianten.

Über ein besseres patho-physiologisches Verständnis von Infektion und Ausprägung der TSE beim Schaf konnten neue potentielle funktionelle Kandidatengene für eine erhöhte Scrapie-Empfindlichkeit im Rahmen der Eradikationsprogramme identifiziert werden. Des Weiteren wird über die parallele Betrachtung der einzelnen TSE-Erkrankungen das allgemeine Verständnis um die Wirkungsmechanismen der Prionenerkrankungen erhöht.

G Thesen zur Dissertation

„Vergleichende Analyse der TSE- assoziierten Genexpression in ausgewählten Geweben von Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition für die Ausprägung von Scrapie beim Schaf“

vorgelegt von Dipl.-Ing. agr. Katrin Komolka

Hintergrund, Ziel und Aufgabenstellung

1. Scrapie ist eine Gehirnerkrankung beim Schaf und verläuft, wie alle weltweit bei verschiedenen Spezies verbreiteten Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE), tödlich.
2. Die Empfindlichkeit an Scrapie zu erkranken, wird rassenspezifisch durch Varianten des Prionproteingenes (*PRNP*) beeinflusst. Dabei spielen insbesondere die Punktmutationen in den Codons der Aminosäuren an Position 136 (A/V), 154 (R/H) und 171 (Q/R bzw. Q/H) eine Rolle. Auf deren Grundlage wurden die Scrapie-Risikoklassen R1 bis R5 definiert (R1 sehr resistent, R5 sehr anfällig).
3. Neben den *PRNP*-Genotypen beeinflussen weitere bisher unbekannte genetische und physiologische Faktoren die Scrapie-Empfindlichkeit.
4. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, mögliche physiologische Faktoren einer differentiellen Scrapie-Ausprägung zu identifizieren.
5. Mittels vergleichender Expressionsanalyse von gesunden Schafen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition an Scrapie zu erkranken (*PRNP* Genotyp-Risikoklassen R1 vs. R5), werden different regulierte Stoffwechselwege in fünf Geweben nachgewiesen, die in den Erregertransport (Peyer'sche Platten des Ileum, Jejunum, retropharyngeale Lymphknoten), die Ausprägung der Erkrankung (Stammhirn) bzw. in eine differente Stoffwechselaktivität der Tiere (Leber) involviert sind.

Ergebnisse und Ausblick

6. Die heterologe Chip-Hybridisierung erlaubt nach Maßgabe der Anzahl an Hybridisierungssignalen (75 % bis 91 %) und der Sequenzidentität (85-94 % zu *Homo sapiens*, 89-98 % zu *Bos taurus*) eine repräsentative Expressionsanalyse des Schafgenoms zwischen oviner mRNA und dem humanen „10k array“.
7. Der hohe Genanteil auf dem humanen Chip und der große Anteil annotierter Gene stellen günstige Voraussetzungen für die vergleichende physiologische Untersuchung von Schafen der Scrapie-Risikoklassen R1 vs. R5 unter Verwendung des humanen Microarrays dar.
8. Im Stammhirn gesunder Schafe wurden keine Unterschiede im Expressionsprofil zwischen Scrapie-resistenten und Scrapie-empfindlichen Genotypen nach Cross-Spezies-Hybridisierung beobachtet. Zum einen bestätigen diese Befunde das Ergebnis des durchgeführten Protease-Testes und somit den gesunden, infektionsfreien Zustand der Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung. Zum anderen zeigen sie, dass im Erfolgsorgan dieser Erkrankung keine physiologischen Unterschiede zwischen gesunden Tieren unterschiedlicher genetischer Prädisposition auftreten.
9. Die Leber als stoffwechselaktivstes Gewebe höherer Organismen mit einer Vielzahl von Funktionen zeigt im Expressionsprofil ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Risikoklassen R1 vs. R5 auf. Dies weist darauf hin, dass die unterschiedliche Scrapie-Empfindlichkeit zwischen den beiden *PRNP*-Varianten offensichtlich nicht mit deren Leberstoffwechsel assoziiert ist.
10. Von den in den Infektionsweg involvierten Geweben weisen die Gewebe des GALT, Ileum im Bereich der Peyer'schen Platten und Jejunum ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil zwischen gesunden Schafen mit Scrapie-resistenten (R1) und Scrapie-empfindlichen (R5) *PRNP*-Genotypen auf. Das deutet darauf hin, dass die untersuchten Gewebe des Magen-Darm-Trakt vermutlich keine oder nur eine geringe Rolle bei der Modulation der Scrapie-Empfindlichkeit spielen.
11. Im retropharyngealen Lymphknoten, als Teil des MALT, wurden im Expressionsprofil Unterschiede, definiert durch 336 signifikant different exprimiert Gene, zwischen den gesunden, nicht infizierten Texelschafen der Risikoklassen R1 vs. R5, beobachtet. Dies

weist auf mögliche, die Scrapie-Ausprägung modulierende Wirkung in diesem Gewebe hin.

12. Physiologische Prozesse der Immunantwort, wie die „Reaktion auf einen biotischen Reiz“ und die „Reaktion auf Pathogene oder Parasiten“ sind, nach Maßgabe der signifikant erhöhten Anzahl different exprimierter Gene des retropharyngeale Lymphknotens von Schafen mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition an Scrapie zu erkranken, unterschiedlich reguliert.
13. Scrapie-unempfindliche Texelschafe der Risikoklasse R1 weisen im Vergleich zu den Tieren der Risikoklasse R5 des Stoffwechselwegs „Reaktion auf Pathogene oder Parasiten“ in 23 Genen eine höhere und in zwei Genen eine geringere Regulation auf. Im Fall einer Scrapie-Infektion können diese Differenzen eine wichtige Rolle bei der Pathogeninvasion und -migration bzw. in dessen Abwehr spielen.
14. Mittels quantitativer RT-PCR können die Expressionsunterschiede ausgewählter Markermoleküle im retropharyngealen Lymphknoten verifiziert werden. Zusätzlich zeigt die Milz Risikoklassen-spezifische Genexpressionsunterschiede (R1 vs. R5) in drei immunrelevanten Genen (*CCL4*, *DF*, *TGFBI*). Diese gewebespezifischen Unterschiede in den sekundären immunologischen Organen repräsentieren variable Funktionen mehrerer Komponenten des Lymphsystems und bestärken die Hypothese einer „Gewebebarriere“ innerhalb des Prioneninfektionsweges.
15. Different exprimierte Gene der genannten Stoffwechselwege dienen als potentielle, funktionelle Kandidatengene der Scrapie-Empfindlichkeit und könnten bei Nachweis entsprechender merkmalsassoziierter Genvarianten als Marker in der markergestützten Selektion und im Eradikationsprogramm der Scrapie beim Schaf Verwendung finden sowie das allgemeine Verständnis der Prionenerkrankungen fördern. Im *VCAMI* konnten erste potentielle merkmalsassoziierte Genvarianten identifiziert werden.
16. Die komplexen Unterschiede im Expressionsprofil des lymphatischen Gewebes der Schafe unterschiedlicher Risikoklassen sind mit geringer Wahrscheinlichkeit ursächlich auf die *PRNP*-Varianten zurückzuführen. Vielmehr ist von Effekten unbekannter gekoppelter Gene in der Genomregion des *PRNP* bzw. pleiotrophen Effekten des *PRNP* auszugehen.

H **Literaturverzeichnis**

- Adjaye, J.; Herwig, R.; Herrmann, D.; Wruck, W.; Benkahla, A.; Brink, T. C.; Nowak, M.; Carnwath, J. W.; Hultschig, C.; Niemann, H., und Lehrach, H. (2004): Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. *BMC.Genomics*, 5 (1); S. 83.
- Aguzzi, A. (2001): Peripheral prion pursuit. *J.Clin.Invest*, 108 (5); S. 661-662.
- Aguzzi, A. (2003): Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv.Immunol.*, 81 ; S. 123-171.
- Aguzzi, A. und Polymenidou, M. (2004): Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 116 (2); S. 313-327.
- Aldhous, P. (1990): BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature*, 345 (6272); S. 194.
- Alper, T.; Cramp, W. A.; Haig, D. A., und Clarke, M. C. (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214 (90); S. 764-766.
- Andreoletti, O.; Berthon, P.; Marc, D.; Sarradin, P.; Grosclaude, J.; van Keulen, L.; Schelcher, F.; Elsen, J. M., und Lantier, F. (2000): Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J.Gen.Virol.*, 81 (Pt 12); S. 3115-3126.
- Andreoletti, O.; Lacroux, C.; Chabert, A.; Monnereau, L.; Tabouret, G.; Lantier, F.; Berthon, P.; Eychenne, F.; Lafond-Benestad, S.; Elsen, J. M., und Schelcher, F. (2002): PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J.Gen.Virol.*, 83 (Pt 10); S. 2607-2616.
- Anonymus (1996): To affinity ... and beyond! *Nat.Genet.*, 14 (4); S. 367-370.
- Aucouturier, P.; Geissmann, F.; Damotte, D.; Saborio, G. P.; Meeker, H. C.; Kascsak, R.; Kascsak, R.; Carp, R. I., und Wisniewski, T. (2001): Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J.Clin.Invest*, 108 (5); S. 703-708.
- Bainbridge, J. und Walker, K. B. (2005): The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol.Lett.*, 96 (1); S. 147-150.
- Barlow, R. M. (1972): Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J.Clin.Pathol.Suppl (R.Coll.Pathol.)*, 6 ; S. 102-109.

- Baylis, M.; Houston, F.; Goldmann, W.; Hunter, N., und McLean, A. R. (2000): The signature of scrapie: differences in the PrP genotype profile of scrapie-affected and scrapie-free UK sheep flocks. *Proc.Biol.Sci.*, 267 (1457); S. 2029-2035.
- Benestad, S. L.; Sarradin, P.; Thu, B.; Schonheit, J.; Tranulis, M. A., und Bratberg, B. (2003): Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet.Rec.*, 153 (7); S. 202-208.
- Beringue, V.; Demoy, M.; Lasmezas, C. I.; Gouritin, B.; Weingarten, C.; Deslys, J. P.; Andreux, J. P.; Couvreur, P., und Dormont, D. (2000): Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J.Pathol.*, 190 (4); S. 495-502.
- Brandner, S.; Raeber, A.; Sailer, A.; Blattler, T.; Fischer, M.; Weissmann, C., und Aguzzi, A. (1996): Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93 (23); S. 13148-13151.
- Brazma, A.; Hingamp, P.; Quackenbush, J.; Sherlock, G.; Spellman, P.; Stoeckert, C.; Aach, J.; Ansorge, W.; Ball, C. A.; Causton, H. C.; Gaasterland, T.; Glenisson, P.; Holstege, F. C.; Kim, I. F.; Markowitz, V.; Matese, J. C.; Parkinson, H.; Robinson, A.; Sarkans, U.; Schulze-Kremer, S.; Stewart, J.; Taylor, R.; Vilo, J., und Vingron, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 29 (4); S. 365-371.
- Brown, P. und Gajdusek, D. C. (1991): Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet*, 337 (8736); S. 269-270.
- Bruce, M.; Chree, A.; McConnell, I.; Foster, J.; Pearson, G., und Fraser, H. (1994): Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 343 (1306); S. 405-411.
- Bruce, M. E.; Boyle, A.; Cousens, S.; McConnell, I.; Foster, J.; Goldmann, W., und Fraser, H. (2002): Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J.Gen.Virol.*, 83 (Pt 3); S. 695-704.
- Buschmann, A.; Luhken, G.; Schultz, J.; Erhardt, G., und Groschup, M. H. (2004): Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J.Gen.Virol.*, 85 (Pt 9); S. 2727-2733.
- Bustin, S. A. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.*, 29 (1); S. 23-39.
- Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.*, 25 (2); S. 169-193.
- Campbell, I. L.; Eddleston, M.; Kemper, P.; Oldstone, M. B., und Hobbs, M. V. (1994): Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of

- reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J.Virol.*, 68 (4); S. 2383-2387.
- Chase-Topping, M. E.; Kruuk, L. E.; Lajous, D.; Touzeau, S.; Matthews, L.; Simm, G.; Foster, J. D.; Rupp, R.; Eychenne, F.; Hunter, N.; Elsen, J. M., und Woolhouse, M. E. (2005): Genotype-level variation in lifetime breeding success, litter size and survival of sheep in scrapie-affected flocks. *J.Gen.Virol.*, 86 (Pt 4); S. 1229-1238.
- Chaudhuri, J. D. (2005): Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med.Sci.Monit.*, 11 (2); S. RA52-RA62.
- Cleveland, W. S. und Devlin, S. J. (1988): Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *Journal of the American Statistical Association*, 83 ; S. 596-610.
- Collinge, J. (2005): Molecular neurology of prion disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.*, 76 (7); S. 906-919.
- Collinge, J.; Sidle, K. C.; Meads, J.; Ironside, J., und Hill, A. F. (1996): Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383 (6602); S. 685-690.
- Cosseddu, G. M.; Oustry-Vaiman, A.; Jegou, B.; Moreno, C.; Taourit, S.; Cribiu, E. P.; Elsen, J. M., und Vaiman, D. (2002): Sheep/human comparative map in a chromosome region involved in scrapie incubation time shows multiple breakpoints between human chromosomes 14 and 15 and sheep chromosomes 7 and 18. *Chromosome.Res.*, 10 (5); S. 369-378.
- Cybulsky, M. I.; Fries, J. W.; Williams, A. J.; Sultan, P.; Eddy, R.; Byers, M.; Shows, T.; Gimbrone, M. A., Jr., und Collins, T. (1991): Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88 (17); S. 7859-7863.
- Dawson, M.; Hoinville, L. J.; Hosie, B. D., und Hunter, N. (1998): Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet.Rec.*, 142 (23); S. 623-625.
- DEFRA (2003): NSP (National scrapie plan) genotype classification table. Department for Environment, Food and Rural Affairs, UK; London, <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp/pdf/classification.pdf>.
- Detwiler, L. A. und Baylis, M. (2003): The epidemiology of scrapie. *Rev.Sci.Tech.*, 22 (1); S. 121-143.
- Dickinson, A. G. (1976): Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.*, 44 ; S. 209-241.

- Dickinson, A. G. und Outram, G. W. (1988): Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, 135:63-83. S. 63-83.
- Diedrich, J. F.; Minnigan, H.; Carp, R. I.; Whitaker, J. N.; Race, R.; Frey, W., und Haase, A. T. (1991): Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J.Virol.*, 65 (9); S. 4759-4768.
- Duggan, D. J.; Bittner, M.; Chen, Y.; Meltzer, P., und Trent, J. M. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat.Genet.*, 21 (1 Suppl); S. 10-14.
- Duguid, J. R.; Bohmont, C. W.; Liu, N. G., und Tourtellotte, W. W. (1989): Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86 (18); S. 7260-7264.
- Elsen, J. M.; Amigues, Y.; Schelcher, F.; Ducrocq, V.; Andreoletti, O.; Eychenne, F.; Khang, J. V.; Poivey, J. P.; Lantier, F., und Laplanche, J. L. (1999): Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch.Virol.*, 144 (3); S. 431-445.
- Elvidge, G. (2006): Microarray expression technology: from start to finish. *Pharmacogenomics.*, 7 (1); S. 123-134.
- Ersdal, C.; Ulvund, M. J.; Espenes, A.; Benestad, S. L.; Sarradin, P., und Landsverk, T. (2005): Mapping PrPSc propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet.Pathol.*, 42 (3); S. 258-274.
- Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T., und Solas, D. (1991): Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.*, 251 (4995); S. 767-773.
- Garosi, P.; De Filippo, C.; van Erk, M.; Rocca-Serra, P.; Sansone, S. A., und Elliott, R. (2005): Defining best practice for microarray analyses in nutrigenomic studies. *Br.J.Nutr.*, 93 (4); S. 425-432.
- Geldermann, H.; Preuss, S.; Eckert, J.; Han, Y., und Ollesch, K. (2003): Analysis of polymorphic microsatellites within the bovine and ovine prion protein (PRNP) genes. *Anim Genet.*, 34 (4); S. 283-289.
- Ghosh, S. (2004): Mechanism of intestinal entry of infectious prion protein in the pathogenesis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv Drug Deliv Rev.*, 56 (6); S. 915-920.
- Gibson, U. E.; Heid, C. A., und Williams, P. M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6 (10); S. 995-1001.

- Giese, A.; Groschup, M. H.; Hess, B., und Kretzschmar, H. A. (1995): Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.*, 5 (3); S. 213-221.
- Gillespie, D. und Spiegelman, S. (1965): A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J Mol Biol*, 12 (3); S. 829-842.
- Goldfarb, L. G. (2002): Kuru: the old epidemic in a new mirror. *Microbes.Infect.*, 4 (8); S. 875-882.
- Goldmann, W.; Hunter, N.; Benson, G.; Foster, J. D., und 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 ; S. 2411-2417.
- Goldmann, W.; Hunter, N.; Smith, G.; Foster, J., und Hope, J. (1994): PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J.Gen.Virol.*, 75 (Pt 5); S. 989-995.
- Gossner, A.; Hunter, N., und Hopkins, J. (2006): Role of lymph-borne cells in the early stages of scrapie agent dissemination from the skin. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 109 (3-4); S. 267-278.
- Greig, J. R. (1940): Scrapie: Observations on the transmission of the disease by mediate contact. *Veterinary Journal*, 96 ; S. 203-206.
- Gretzschel, A.; Buschmann, A.; Eiden, M.; Ziegler, U.; Luhken, G.; Erhardt, G., und Groschup, M. H. (2005): Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health.*, 52 (2); S. 55-63.
- Griffith, J. S. (1967): Self-replication and scrapie. *Nature*, 215 (105); S. 1043-1044.
- Griffoni, C.; Toni, M.; Spisni, E.; Bianco, M.; Santi, S.; Riccio, M., und Tomasi, V. (2003): The cellular prion protein: biochemistry, topology, and physiologic functions. *Cell Biochem.Biophys.*, 38 (3); S. 287-304.
- Gruner, L.; Elsen, J. M.; Vu Tien, K. J.; Eychenne, F.; Caritez, J. C.; Jacquiet, P.; Andreoletti, O.; Sarradin, P.; Cortet, J.; Richer, N., und Leroux, H. (2004): Nematode parasites and scrapie: experiments in sheep and mice. *Parasitol.Res.*, 93 (6); S. 493-498.
- Hadlow, W. J.; Kennedy, R. C., und Race, R. E. (1982): Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J.Infect.Dis.*, 146 (5); S. 657-664.
- Hadlow, W. (1956): Scrapie and kuru. *Lancet*, 2 ; S. 289-290.
- Haralambiev, H.; Ivanov, I.; Vesselinova, A., und Mermerski, K. (1973): An attempt to induce scrapie in local sheep in Bulgaria. *Zentralbl.Veterinarmed.B*, 20 (9); S. 701-709.

- Hariharan, R. (2003): The analysis of microarray data. *Pharmacogenomics.*, 4 (4); S. 477-497.
- Harris, D. A.; Lele, P., und Snider, W. D. (1993): Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90 (9); S. 4309-4313.
- Heggebo, R.; Press, C. M.; Gunnes, G.; Ulvund, M. J.; Tranulis, M. A., und Lsverk, T. (2003): Detection of PrP(Sc) in Lymphoid Tissues of Lambs Experimentally Exposed to the Scrapie Agent. *J.Comp Pathol.*, 128 (2-3); S. 172-181.
- Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J., und Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6 (10); S. 986-994.
- Heim, D.; Maurer, E., und Doherr, M. G. (2002): Transmissible spongiforme encephalopathien bei Schafen und Ziegen. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.*, 144 (12); S. 675-683.
- Heppner, F. L.; Christ, A. D.; Klein, M. A.; Prinz, M.; Fried, M.; Kraehenbuhl, J. P., und Aguzzi, A. (2001): Transepithelial prion transport by M cells. *Nat.Med.*, 7 (9); S. 976-977.
- Hernandez-Sanchez, J.; Waddington, D.; Wiener, P.; Haley, C. S., und Williams, J. L. (2002): Genome-wide search for markers associated with bovine spongiform encephalopathy. *Mamm.Genome*, 13 (3); S. 164-168.
- Hickey, M. J.; Forster, M.; Mitchell, D.; Kaur, J.; De, C. C., und Kubes, P. (2000): L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J Immunol.*, 165 (12); S. 7164-7170.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G., und Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*, 11 (9); S. 1026-1030.
- Hill, A. F.; Butterworth, R. J.; Joiner, S.; Jackson, G.; Rossor, M. N.; Thomas, D. J.; Frosh, A.; Tolley, N.; Bell, J. E.; Spencer, M.; King, A.; Al-Sarraj, S.; Ironside, J. W.; Lantos, P. L., und Collinge, J. (1999): Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*, 353 (9148); S. 183-189.
- Hopp, P.; Ulvund, M. J., und Jarp, J. (2001): A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Prev.Vet.Med.*, 51 (3-4); S. 183-198.
- Hörnlimann, B. (2001): Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheit. Walter de Gruyter, Auflage: 1 (Juni 2001),

- Houston, E. F. und Gravenor, M. B. (2003): Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet.Rec.*, 152 (11); S. 333-334.
- Huang, F. P.; Farquhar, C. F.; Mabbott, N. A.; Bruce, M. E., und MacPherson, G. G. (2002): Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J.Gen.Virol.*, 83 (Pt 1); S. 267-271.
- Hunter, N.; Foster, J.; Chong, A.; McCutcheon, S.; Parnham, D.; Eaton, S.; MacKenzie, C., und Houston, F. (2002): Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J.Gen.Virol.*, 83 (Pt 11); S. 2897-2905.
- Hur, K.; Kim, J. I.; Choi, S. I.; Choi, E. K.; Carp, R. I., und Kim, Y. S. (2002): The pathogenic mechanisms of prion diseases. *Mech.Ageing Dev.*, 123 (12); S. 1637-1647.
- Isaacs, J. D.; Jackson, G. S., und Altmann, D. M. (2006): The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clinical & Experimental Immunology*, 146 (1); S. 1-8.
- Jeffrey, M.; Gonzalez, L.; Espenes, A.; Press, C. M.; Martin, S.; Chaplin, M.; Davis, L.; Landsverk, T.; MacAldowie, C.; Eaton, S., und McGovern, G. (2006): Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J.Pathol.*, 209 (1); S. 4-14.
- Kane, M. D.; Jatke, T. A.; Stumpf, C. R.; Lu, J.; Thomas, J. D., und Madore, S. J. (2000): Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 28 (22); S. 4552-4557.
- Kenward, N.; Hope, J.; Landon, M., und Mayer, R. J. (1994): Expression of polyubiquitin and heat-shock protein 70 genes increases in the later stages of disease progression in scrapie-infected mouse brain. *J.Neurochem.*, 62 (5); S. 1870-1877.
- Kimberlin, R. H. und Walker, C. A. (1979): Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J.Comp Pathol.*, 89 (4); S. 551-562.
- Kirkwood, J. K. und Cunningham, A. A. (1994): Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet.Rec.*, 135 (13); S. 296-303.
- Kirkwood, J. K.; Wells, G. A.; Wilesmith, J. W.; Cunningham, A. A., und Jackson, S. I. (1990): Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet.Rec.*, 127 (17); S. 418-420.
- Klein, M. A.; Frigg, R.; Raeber, A. J.; Flechsig, E.; Hegyi, I.; Zinkernagel, R. M.; Weissmann, C., und Aguzzi, A. (1998): PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat.Med.*, 4 (12); S. 1429-1433.

- Klener, P.; Szynal, M.; Cleuter, Y.; Merimi, M.; Duvillier, H.; Lallemand, F.; Bagnis, C.; Griebel, P.; Sotiriou, C.; Burny, A.; Martiat, P., und Van den, B. A. (2006): Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus tax-responsive genes in ovine B cells. *J Virol.*, 80 (4); S. 1922-1938.
- Kretzschmar, H. A. (1999): Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, 249 Suppl 3 ; S. 56-63.
- Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A., und Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.*, 27 (2-3); S. 95-125.
- Kutzer, T.; Pfeiffer, I., und Brenig, B. (2002): Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 119 ; S. 201-208.
- Langeveld, J. P.; Jacobs, J. G.; Erkens, J. H.; Bossers, A.; van Zijderveld, F. G., und van Keulen, L. J. (2006): Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retropharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC.Vet.Res.*, 2:19. S. 19.
- Laurent, P.; Schibler, L.; Vaiman, A.; Laubier, J.; Delcros, C.; Cosseddu, G.; Vaiman, D.; Cribiu, E. P., und Yerle, M. (2007): A 12 000-rad whole-genome radiation hybrid panel in sheep: application to the study of the ovine chromosome 18 region containing a QTL for scrapie susceptibility. *Anim Genet*, .
- Legname, G.; Baskakov, I. V.; Nguyen, H. O.; Riesner, D.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J., und Prusiner, S. B. (2004): Synthetic mammalian prions. *SCIENCE*, 305 (5684); S. 673-676.
- Lejtenyi, D.; Osmond, D. G., und Miller, S. C. (2003): Natural killer cells and B lymphocytes in L-selectin and Mac-1/LFA-1 knockout mice: marker-dependent, but not cell lineage-dependent changes in the spleen and bone marrow. *Immunobiology*, 207 (2); S. 129-135.
- Leung, Y. F. und Cavalieri, D. (2003): Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet.*, 19 (11); S. 649-659.
- Lloyd, S. E.; Onwuazor, O. N.; Beck, J. A.; Mallinson, G.; Farrall, M.; Targonski, P.; Collinge, J., und Fisher, E. M. (2001): Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98 (11); S. 6279-6283.
- Lloyd, S. E.; Uphill, J. B.; Targonski, P. V.; Fisher, E. M., und Collinge, J. (2002): Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics.*, 4 (2); S. 77-81.

- Lockhart, D. J.; Dong, H.; Byrne, M. C.; Follettie, M. T.; Gallo, M. V.; Chee, M. S.; Mittmann, M.; Wang, C.; Kobayashi, M.; Horton, H., und Brown, E. L. (1996): Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.*, 14 (13); S. 1675-1680.
- Lockhart, D. J. und Winzeler, E. A. (2000): Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405 (6788); S. 827-836.
- Lugaresi, E.; Medori, R.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Lugaresi, A.; Tinuper, P.; Zucconi, M., und Gambetti, P. (1986): Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N.Engl.J.Med.*, 315 (16); S. 997-1003.
- Mabbott, N. A. und MacPherson, G. G. (2006): Prions and their lethal journey to the brain. *Nat.Rev.Microbiol.*, 4 (3); S. 201-211.
- Maddox, J. F. (2005): A presentation of the differences between the sheep and goat genetic maps. *Genet.Sel Evol.*, 37 Suppl. 1 ; S. S1-S10.
- McGowan, J. P. (1922): Scrapie in sheep. *Scott J Agric*, 5 ; S. 365-375.
- McKinley, M. P.; Bolton, D. C., und Prusiner, S. B. (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35 (1); S. 57-62.
- Mlecnik, B.; Scheideler, M.; Hackl, H.; Hartler, J.; Sanchez-Cabo, F., und Trajanoski, Z. (2005): PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways. *Nucleic Acids Res.*, 33 ; S. 633-637.
- Mockler, T. C.; Chan, S.; Sundaresan, A.; Chen, H.; Jacobsen, S. E., und Ecker, J. R. (2005): Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics*, 85 (1); S. 1-15.
- Moreno, C. R.; Lantier, F.; Lantier, I.; Andreoletti, O.; Vaiman, D.; Sarradin, P.; Echeynne, F.; Cribiu, E. P.; Cosseddu, G., und Elsen, J. M. (2002): Transposition to sheep of mouse quantitative trait loci (QTL) influencing susceptibility to prion diseases. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production,
- Moreno, C. R.; Lantier, F.; Lantier, I.; Sarradin, P., und Elsen, J. M. (2003): Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, 165 (4); S. 2085-2091.
- Moudjou, M.; Frobert, Y.; Grassi, J., und La Bonnardiere, C. (2001): Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J.Gen.Virol.*, 82 (Pt 8); S. 2017-2024.
- Mouillet-Richard, S.; Ermonval, M.; Chebassier, C.; Laplanche, J. L.; Lehmann, S.; Launay, J. M., und Kellermann, O. (2000): Signal transduction through prion protein. *SCIENCE*, 289 (5486); S. 1925-1928.

- Narang, H. (2002): A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227 (1); S. 4-19.
- Oesch, B.; Westaway, D.; Walchli, M.; McKinley, M. P.; Kent, S. B.; Aebersold, R.; Barry, R. A.; Tempst, P.; Teplow, D. B., und Hood, L. E. (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40 (4); S. 735-746.
- Orge, L.; Galo, A.; Machado, C.; Lima, C.; Ochoa, C.; Silva, J.; Ramos, M., und Simas, J. P. (2004): Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J.Gen.Virol.*, 85 (Pt 11); S. 3487-3491.
- Pepinsky, B.; Hession, C.; Chen, L. L.; Moy, P.; Burkly, L.; Jakubowski, A.; Chow, E. P.; Benjamin, C.; Chi-Rosso, G., und Luhowskyj, S. (1992): Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J.Biol.Chem.*, 267 (25); S. 17820-17826.
- Phillips, S. A.; Barr, V. A.; Haft, D. H.; Taylor, S. I., und Haft, C. R. (2001): Identification and characterization of SNX15, a novel sorting nexin involved in protein trafficking. *J.Biol.Chem.*, 276 (7); S. 5074-5084.
- Poser, C. M. (2002): Notes on the history of the prion diseases. Part II. *Clin.Neurol.Neurosurg.*, 104 (2); S. 77-86.
- Prenzlín, H. (1996): Lehrbuch der Tierphysiologie. Gustav Fischer Verlag Jena, 6. Auflage
- Prinz, M.; Huber, G.; Macpherson, A. J.; Heppner, F. L.; Glatzel, M.; Eugster, H. P.; Wagner, N., und Aguzzi, A. (2003): Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am.J.Pathol.*, 162 (4); S. 1103-1111.
- Prusiner, S. B. (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *SCIENCE*, 216 (4542); S. 136-144.
- Race, R.; Jenny, A., und Sutton, D. (1998): Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J.Infect.Dis.*, 178 (4); S. 949-953.
- Rajeevan, M. S.; Ranamukhaarachchi, D. G.; Vernon, S. D., und Unger, E. R. (2001): Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 25 (4); S. 443-451.
- Rezaei, H.; Choiset, Y.; Eghiaian, F.; Treguer, E.; Mentre, P.; Debey, P.; Grosclaude, J., und Haertle, T. (2002): Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J.Mol.Biol.*, 322 (4); S. 799-814.
- Riemer, C.; Queck, I.; Simon, D.; Kurth, R., und Baier, M. (2000): Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J.Virol.*, 74 (21); S. 10245-10248.

- Rinaudo, J. A. und Gerin, J. L. (2004): Cross-species hybridization: characterization of gene expression in woodchuck liver using human membrane arrays. *J Med.Virol.*, 74 (2); S. 300-313.
- Roucou, X. und LeBlanc, A. C. (2005): Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J.Mol.Med.*, 83 (1); S. 3-11.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.*, 132 ; S. 365-386.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A., und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.*, 230 (4732); S. 1350-1354.
- Sales, N. (2006): What can we learn from the oral intake of prions by sheep? *J.Pathol.*, 209 (1); S. 1-3.
- Sambrook, J. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press,U.S., 2
- SAS Institute Inc. (2006): Base SAS 9.1.3 Procedures Guide, Second Edition, Volumes 1,2,3 and 4. SAS Institute Inc., (9.1.3)
- Schoon, H. A.; Brunckhorst, D., und Pohlenz, J. (1991): [Spongiform encephalopathy in a red-necked ostrich (*Struthio camelus*)]. *Tierarztl.Prax.*, 19 (3); S. 263-265.
- Schreuder, B. E.; van Keulen, L. J.; Vromans, M. E.; Langeveld, J. P., und Smits, M. A. (1996): Preclinical test for prion diseases. *Nature*, 381 (6583); S. 563.
- Schroeder, S.; Weber, J., und Paul, H. (2001): 50 nucleotide long probes on microarrays enable high signal intensity and high specificity.
- Sperandio, M. (2006): Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J*, 273 (19); S. 4377-4389.
- Stahlberg, A.; Kubista, M., und Pfaffl, M. (2004): Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin.Chem.*, 50 (9); S. 1678-1680.
- Stephenson, D. A.; Chiotti, K.; Ebeling, C.; Groth, D.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B., und Carlson, G. A. (2000): Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics*, 69 (1); S. 47-53.
- Storey, J. D. und Tibshirani, R. (2003): Statistical significance for genomewide studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100 (16); S. 9440-9445.
- Strumbo, B.; Ronchi, S.; Bolis, L. C., und Simonc, T. (2001): Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.*, 508 (2); S. 170-174.

- Taylor, D. M.; McConnell, I., und Fraser, H. (1996): Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J.Gen.Virol.*, 77 (Pt 7); S. 1595-1599.
- Tranulis, M. A. (2002): Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. *APMIS*, 110 (1); S. 33-43.
- Tsai, S.; Mir, B.; Martin, A. C.; Estrada, J. L.; Bischoff, S. R.; Hsieh, W. P.; Cassady, J. P.; Freking, B. A.; Nonneman, D. J.; Rohrer, G. A., und Piedrahita, J. A. (2006): Detection of transcriptional difference of porcine imprinted genes using different microarray platforms. *BMC.Genomics*, 7 ; S. 328.
- Unterberger, U.; Voigtlander, T., und Budka, H. (2005): Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuropathol.(Berl)*, 109 (1); S. 32-48.
- van Keulen, L. J.; Schreuder, B. E.; Meloen, R. H.; Mooij-Harkes, G.; Vromans, M. E., und Langeveld, J. P. (1996): Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J.Clin.Microbiol.*, 34 (5); S. 1228-1231.
- van Keulen, L. J.; Schreuder, B. E.; Vromans, M. E.; Langeveld, J. P., und Smits, M. A. (1999): Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J.Comp Pathol.*, 121 (1); S. 55-63.
- van Keulen, L. J.; Vromans, M. E., und van Zijderveld, F. G. (2002): Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, 110 (1); S. 23-32.
- Wang, Z.; Dooley, T. P.; Curto, E. V.; Davis, R. L., und VandeBerg, J. L. (2004): Cross-species application of cDNA microarrays to profile gene expression using UV-induced melanoma in *Monodelphis domestica* as the model system. *Genomics*, 83 (4); S. 588-599.
- Weissmann, C.; Raeber, A. J.; Montrasio, F.; Hegyi, I.; Frigg, R.; Klein, M. A., und Aguzzi, A. (2001): Prions and the lymphoreticular system. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 356 (1406); S. 177-184.
- Wells, G. A.; Hawkins, S. A.; Austin, A. R.; Ryder, S. J.; Done, S. H.; Green, R. B.; Dexter, I.; Dawson, M., und Kimberlin, R. H. (2003): Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J.Gen.Virol.*, 84 (Pt 4); S. 1021-1031.
- Wilesmith, J. W.; Ryan, J. B., und Atkinson, M. J. (1991): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet.Rec.*, 128 (9); S. 199-203.
- Will, R. G.; Ironside, J. W.; Zeidler, M.; Cousens, S. N.; Estibeiro, K.; Alperovitch, A.; Poser, S.; Pocchiari, M.; Hofman, A., und Smith, P. G. (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347 (9006); S. 921-925.

- Williams, E. S. (2005): Chronic wasting disease. *Vet.Pathol.*, 42 (5); S. 530-549.
- Windl, O.; Dempster, M.; Estibeiro, P., und Lathe, R. (1995): A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene.*, 159 (2); S. 181-186.
- Wisniewski, H. M.; Sigurdarson, S.; Rubenstein, R.; Kascsak, R. J., und Carp, R. I. (1996): Mites as vectors for scrapie. *Lancet*, 347 (9008); S. 1114.
- Wong, M. L. und Medrano, J. F. (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.*, 39 (1); S. 75-85.
- Zeeberg, B. R.; Feng, W.; Wang, G.; Wang, M. D.; Fojo, A. T.; Sunshine, M.; Narasimhan, S.; Kane, D. W.; Reinhold, W. C.; Lababidi, S.; Bussey, K. J.; Riss, J.; Barrett, J. C., und Weinstein, J. N. (2003): GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.*, 4 (4); S. 28.

Anhang

der höher exprimierter Gene in der Scrapie-Risikoklasse R1 nach heterologer Chip-Hybridisierung im retropharyngealen (Standardabweichung)

Genexpression R5/R1 beim Schaf ratio	$\pm s$	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
14	1,351	three prime repair exonuclease 1
95	0,872	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
71	1,234	claudin 8
70	0,959	family with sequence similarity 14, member A
46	0,361	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
32	0,595	phospholipase D3
29	0,895	cytochrome c oxidase subunit VIII
25	0,522	chromosome 2 open reading frame 18
16	1,046	enigma (LIM domain protein)
14	0,270	serine protease inhibitor, Kazal type, 5
13	0,968	chromosome 20 open reading frame 149
03	0,053	serologically defined breast cancer antigen 84
85	0,870	transforming growth factor, beta 1
83	0,810	polyglutamine binding protein 1
77	0,292	zinc finger protein 157
75	0,498	transmembrane protein 156
75	0,950	U2 (RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 2
74	0,878	angio-associated, migratory cell protein
74	0,780	sorting nexin 15
73	0,285	sialyltransferase 4A (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase)
72	0,676	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like
72	0,733	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
± s		
66	0,278	PHD protein Jade-1
60	0,535	tuftelin interacting protein 11
57	0,993	TEA domain family member 4
55	0,434	cystatin SA
53	0,834	interferon, gamma-inducible protein 16
52	0,127	inhibin, beta C
52	0,873	placenta-specific 8
49	0,788	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
46	0,140	inversin
45	0,374	KIAA0632 protein
42	0,483	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
40	0,072	bromodomain containing 9
36	0,564	zona pellucida glycoprotein 2 (sperm receptor)
30	0,282	glucagon-like peptide 2 receptor
28	0,558	bactericidal/permeability-increasing protein
25	0,350	mitochondrial ribosomal protein S34
19	0,213	filamin C, gamma (actin binding protein 280)
18	0,412	arachidonate lipoxygenase 3
18	0,064	cortical thymocyte receptor (X, laevis CTX) like
15	0,480	leucine-rich repeat transmembrane neuronal 4 protein
13	0,082	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3
09	0,467	collagen, type VIII, alpha 1
08	0,479	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
08	0,491	ring finger protein 144
04	0,153	chromosome 8 open reading frame 2
04	0,619	neuropeptide Y
03	0,300	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17
01	0,084	protein-O-mannosyltransferase 2

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Genexpression ± s	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
00	0,095	phosphatidic acid phosphatase type 2C
99	0,225	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
98	0,770	gonadotropin-releasing hormone 2
97	0,228	dymeclin
94	0,731	ribonuclease/angiogenin inhibitor
94	0,482	torsin family 3, member A
94	0,485	zinc finger protein 297B
93	0,173	flavin containing monooxygenase 2
93	0,404	ring finger protein 39
91	0,109	hypothetical protein FLJ14154
88	0,154	chromosome 7 open reading frame 42
87	0,046	lectin, mannose-binding, 1 like
87	0,496	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S, cerevisiae)
85	0,427	angiopoietin-like 2
84	0,107	S100 calcium binding protein A5
84	0,365	transcobalamin II ^h macrocytic anemia
83	0,391	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
81	0,500	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
80	0,337	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (thyroid hormone binding protein p55)
79	0,450	FK506 binding protein 8, 38kDa
76	0,346	SEC7 homolog
75	0,069	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
75	0,382	elongation factor-2 kinase
74	0,542	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2
72	0,363	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17
71	0,114	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 1
70	0,050	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
70	0,206	Norrie disease (pseudoglioma)

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf tio	$\pm s$	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
70	0,163	phosphorylase, glycogen muscle (McArdle syndrome, glycogen storage disease type V)
69	0,416	jumonji domain containing 2A
68	0,147	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
67	0,413	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S, cerevisiae)
66	0,335	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
65	0,176	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
65	0,235	5'-nucleotidase, cytosolic III
65	0,520	PRO1596 protein
64	0,646	cytidine deaminase
63	0,338	centaurin, alpha 2
62	0,339	chromosome 14 open reading frame 115
62	0,216	glycerol kinase 2
62	0,133	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta
60	0,613	CD74 antigen (invariant polypeptide of MHC, class II antigen-associated)
60	0,304	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11
60	0,236	stromal interaction molecule 1
59	0,189	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
58	0,508	alkB, alkylation repair homolog (E, coli)
58	0,144	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)
57	0,322	single stranded DNA binding protein 3
56	0,156	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
55	0,502	chromosome 20 open reading frame 59
54	0,308	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
54	0,416	tryptophan 2,3-dioxygenase
53	0,366	complement component 8, alpha polypeptide
52	0,243	homeo box B4
52	0,460	similar to PRE-B-CELL LEUKEMIA TRANSCRIPTION FACTOR-2
52	0,260	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
± s		
52	0,469	retinol binding protein 4, plasma
51	0,584	fibroblast growth factor 11
51	0,018	FSHD region gene 1
51	0,531	RAD23 homolog A (S, cerevisiae)
50	0,329	myosin light chain 1 slow a
50	0,274	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8
49	0,197	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
48	0,200	diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase)
48	0,092	DNA methyltransferase 1 associated protein 1
48	0,560	dual specificity phosphatase 13
48	0,476	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4
48	0,337	seven transmembrane domain protein
47	0,104	chromosome 12 open reading frame 8
47	0,262	erythrocyte membrane protein band 4,1 (elliptocytosis 1, RH-linked)
47	0,389	integrin, alpha 10
47	0,287	scavenger receptor class F, member 1
47	0,391	zinc finger protein 239
46	0,133	REST corepressor 3
45	0,024	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1
45	0,358	sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
44	0,183	CD84 antigen (leukocyte antigen)
44	0,097	lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)
43	0,245	stabilin 1
42	0,329	ADP-ribosylation factor related protein 1
42	0,093	similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit) (LOC138855)
42	0,150	melanoma antigen, family B, 1
41	0,393	complement component receptor 2
41	0,397	heparanase 2

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
± s		
41	0,134	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
41	0,282	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2
41	0,224	transmembrane 4 superfamily member 11 (plasmolipin)
41	0,179	ubiquitin-conjugating enzyme E2S
40	0,214	H2,0-like homeo box 1 (Drosophila)
40	0,544	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
39	0,471	coiled-coil domain containing 51
39	0,273	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
38	0,279	hypothetical protein MGC3067, Derlin-1
38	0,447	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain
36	0,317	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
35	0,430	heat shock transcription factor 2
35	0,489	hypothetical protein MGC2776
34	0,062	ATP binding domain 1 family, member B
34	0,353	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12
34	0,288	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class V
34	0,082	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)
33	0,088	KIAA0980 protein, Kalcium Ionen Transport
33	0,351	kelch-like 4 (Drosophila)
32	0,080	renin binding protein
31	0,495	Lck interacting transmembrane adaptor 1
31	0,227	ubiquitin-fold modifier 1
30	0,205	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
30	0,111	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
30	0,279	phosphatidylserine decarboxylase
29	0,370	mitochondrial intermediate peptidase
29	0,225	RNA binding motif protein 22
29	0,327	ubiquitin domain containing 1 (from human dendritic cells)

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf ratio	$\pm s$	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
27	0,308	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2)
27	0,347	transmembrane, prostate androgen induced RNA
26	0,265	interleukin 7 receptor
26	0,190	zinc finger protein 255
25	0,086	hypothetical protein FLJ10154
25	0,196	fucosyltransferase 5 (alpha (1,3) fucosyltransferase)
25	0,073	protamine 2
25	0,017	SAR1a gene homolog 2 (S, cerevisiae)
24	0,274	gap junction protein, beta 2, 26kDa (connexin 26)
24	0,210	intersectin 2
23	0,376	forkhead box P1
23	0,245	nucleobindin 2
23	0,132	protocadherin gamma subfamily A, 11
23	0,200	T, brachyury homolog (mouse)
23	0,244	upstream transcription factor 2, c-fos interacting
22	0,215	chromosome 20 open reading frame 45
22	0,292	cyclin M3
22	0,104	glutamate dehydrogenase 1
22	0,168	phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)
22	0,215	snail homolog 2 (Drosophila)
22	0,190	transglutaminase 1
21	0,454	interferon regulatory factor 2
21	0,303	hypothetical protein from EUROIMAGE 1977056
21	0,416	tryptophanyl-tRNA synthetase
20	0,301	KIAA0125
20	0,194	zinc finger protein 581
19	0,150	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
19	0,202	IGF-II mRNA-binding protein 2

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
± s		
19	0,374	protocadherin gamma subfamily B, 4
19	0,401	sorcin
19	0,039	zinc finger protein 295
18	0,108	butyrophilin, subfamily 2, member A1
18	0,391	chemokine (C-C motif) ligand 4
18	0,364	IGF-II mRNA-binding protein 3
18	0,110	potassium channel tetramerisation domain containing 17
18	0,355	SAR1a gene homolog 1 (S, cerevisiae)
18	0,091	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6
18	0,319	wingless-type MMTV integration site family, member 8B
17	0,150	arginine-rich, mutated in early stage tumors
17	0,078	GK001 protein
17	0,210	interphase cytoplasmic foci protein 45
17	0,382	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa
17	0,211	tubby like protein 1
16	0,327	BCL2-like 2
16	0,410	glia maturation factor, gamma
16	0,186	molybdenum cofactor synthesis 2
16	0,071	NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)
16	0,016	SET domain and mariner transposase fusion gene
16	0,371	Sjogren's syndrome/scleroderma autoantigen 1
15	0,265	apolipoprotein C-III
15	0,091	mannosidase, alpha, class 2A, member 2
15	0,218	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
15	0,116	sorting nexin 17
14	0,350	ADP-ribosylation factor 3
14	0,441	insulin receptor substrate 2
14	0,058	KIAA0087 gene product

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf tio	$\pm s$	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
14	0,017	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1
14	0,139	PERQ amino acid rich, with GYF domain 1
14	0,236	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
14	0,218	PTX1 protein
14	0,233	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)
13	0,126	activating transcription factor 6
13	0,215	5-azacytidine induced gene 2
13	0,334	sialidase 1 (lysosomal sialidase)
13	0,207	ribosomal protein L4
12	0,311	choline transporter-like protein 1
12	0,085	guanylate cyclase 2F, retinal
12	0,145	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
11	0,235	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
11	0,149	p21(CDKN1A)-activated kinase 6
11	0,395	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2
11	0,201	peroxisomal long-chain acyl-coA thioesterase
10	0,245	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3
10	0,225	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide
10	0,273	non-POU domain containing, octamer-binding
10	0,389	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3
10	0,252	src family associated phosphoprotein 2
09	0,274	chromosome 15 open reading frame 29
09	0,243	bHLH factor Hes4
09	0,165	tetraspan 1
08	0,243	BCL2-like 1
08	0,270	homeo box A11
08	0,418	insulin-like growth factor binding protein 7
08	0,135	neuroendocrine differentiation factor

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
0,117 ± s	vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)
0,284	D component of complement (adipsin)
0,391	protein C receptor, endothelial (EPCR)
0,168	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B15
0,351	AD023 protein
0,148	HDGFRP3: hepatoma-derived growth factor, related protein 3
0,221	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1
0,159	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
0,239	protein kinase C substrate 80K-H
0,347	actinin, alpha 1
0,324	chromosome 22 open reading frame 3
0,175	likely ortholog of mouse gene rich cluster, A gene
0,048	mel transforming oncogene (RAB8 homolog)
0,250	SM-11044 binding protein
0,070	tight junction protein 3
0,236	utrophin (homologous to dystrophin)
0,170	F-box and leucine-rich repeat protein 7
0,317	similar to Protein disulfide isomerase A3 precursor, (Disulfide isomerase ER-60) (LOC149004)
0,312	programmed cell death 2
0,401	SRY (sex determining region Y)-box 1
0,057	cytokine receptor-like factor 1
0,103	dynactin 3 (p22)
0,130	FK506 binding protein 11, 19 kDa
0,039	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
0,183	keratin 8
0,236	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 2
0,191	aminoacylase 1
0,270	S-adenosylhomocysteine hydrolase

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
ratio ± s		
02	0,040	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
02	0,256	JM1 protein
02	0,259	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
02	0,060	RNA binding motif protein 15
02	0,266	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2
02	0,218	sequestosome 1
02	0,290	tripartite motif-containing 62
01	0,343	chromosome 6 open reading frame 55
01	0,337	chromosome 15 hypothetical ATG/GTP binding protein
01	0,302	protein kinase C binding protein 1
01	0,289	prominin 1
01	0,217	S100 calcium binding protein A3
01	0,285	TNF receptor-associated factor 4
00	0,246	ADP-ribosylation factor-like 8B (small GTPase activity)
00	0,034	cysteine and glycine-rich protein 1
00	0,275	il-1rrp2
00	0,221	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3

Anhang

der höher exprimierter Gene in der Scrapie-Risikoklasse R5 nach heterologer Chip-Hybridisierung im retropharyngealen

(Standardabweichung)

Genexpression R5/R1 beim Schaf tatio	$\pm s$	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“
00	0,213	clone cdabp0061 mrna sequence similar to cgi-48 protein with genbank accession number af151806
00	0,239	cholinergic receptor, nicotinic, gamma polypeptide
00	0,088	zinc finger protein 288
01	0,274	carbonic anhydrase III
01	0,108	hypothetical protein FLJ13231
01	0,097	growth arrest-specific 7
01	0,070	Mikrotubule-associated protein 1B
01	0,245	ribosomal protein L32
02	0,022	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3
02	0,087	glutathione peroxidase 1
02	0,188	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)
03	0,116	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette (sub-family C, member 7)
03	0,060	NAG18 protein
03	0,105	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
04	0,122	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)
07	0,137	chemokine (C-C motif) ligand 21
07	0,047	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 4
07	0,194	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5
09	0,142	peptidyl arginine deiminase, type III
10	0,064	Fas apoptotic inhibitory molecule
10	0,289	ATP/GTP-binding protein
10	0,164	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform
11	0,050	leucine rich repeat containing 31
13	0,200	brain abundant, membrane attached signal protein 1

Anhang

Genexpression R5/R1 beim Schaf	Sequenzbeschreibung des „human 10k array“	
± s		
13	0,159	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2
14	0,062	ceruloplasmin (ferroxidase)
14	0,433	thyroid transcription factor 1
16	0,074	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8
16	0,099	elastase 2A
17	0,184	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4
19	0,028	syntaxin 6
21	0,149	vascular cell adhesion molecule 1
22	0,192	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit
23	0,035	chloride channel 6
29	0,210	ATG9 autophagy related 9 homolog A (S, cerevisiae)
30	0,250	stathmin-like 2
40	0,132	chitinase 3-like 2
41	0,109	premature ovarian failure 1B
41	0,116	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA) -preferring, member 1
46	0,266	hypothetical protein MGC3196
58	0,291	nucleolar GTPase
59	0,146	ribonuclease, RNase A family, 4
75	0,098	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20
88	0,093	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
05	0,413	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1

1 Geräte

Zentrifugen:

Zentrifuge 5417 C	(Eppendorf/Gilson, Hamburg)
CL GS-6R Kühlzentrifuge	(Beckmann, München)
Heraeus Labofuge 400	(Heraeus Instruments, Düsseldorf)
Mikroliterzentrifuge FORCE 6	(Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Rotoren:

F 45-30-11, Festwinkelrotor, 45 Grad	(Eppendorf, Hamburg)
GH-3,8 A „Swing out“-Rotor	(Beckmann, München)
12 x 1,5 ml Rotor	(Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA)
16 x 0,5 ml Rotor	(Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA)
4 x 180 ml „Swing out“-Rotor	(Heraeus Instruments, Düsseldorf)

Gelelektrophoresekammern:

Horizontalelektrophoresekammer D3, OWL	(Angewandte Gentechnische Systeme GmbH, Heidelberg)
RNA Elektrophoresekammer	(Biometra, Göttingen)

Elektrophoresestromquelle:

Gene Power Supply GPS 200/400	(Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
High Voltage Power Pack P30	(Biometra, Göttingen)

Vakuum-Konzentrator mit Frosttrockner:

Univapo150H	(Progen Scientific Ltd, Mexborough, South Yorkshire, UK)
Unicryo MC 2L-60 °C	(Progen Scientific Ltd, Mexborough, South Yorkshire, UK)
Univac D08	(Progen Scientific Ltd, Mexborough, South Yorkshire, UK)

Thermostate:

Dri-Block[®] DB-3D (Techne, Staffordshire, UK)

Homogenisator:

Ultra Turrax T25 basic (IKALabortechnik, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)

Mikrowelle:

R3 V10 (Sharp Corporation, Thailand)

Vortexer:

Vortex Genie 2TM G 560 E (Scientific Industries, Bohemia, USA)

Thermo-Schüttler:

Thermomixer 5436 (Eppendorf/Gilson, Hamburg)

pH-Meter:

HI 221 Calibration-Check pH Meter (HANNA Instruments, Kehl am Rhein)

Konfokaler Laserscanner:

428 Array Scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA)

PCR-Geräte:

PCR express thermal cycler (Hybaid, Ashford, UK)

TRIO-Thermoblock TB 1 (Biometra, Göttingen)

Real time PCR-Gerät:

LightCycler 3 (Roche Diagnostics, Mannheim)

Spektralphotometer:

Nano Drop[®] ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA)

Sequenzierautomat:

ABI Modell 310C (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt)

Wasserbad:

Medingen W6 (Prüfwerk Medingen, Medingen)

Magnetrührer:

Oberflächen TEMP.

Heizplatte IKAMAG[®] RET (Janke & Kunkel, Staufen)

UV-Tisch:

High Performance UV

Transilluminator TFM 20 (Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)

Gelaufnahmetechnik:

Kaiser Repro RS1+RA1 5510 (Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)

QImaging 32-0030C-104 (Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)

QIGAM Mono 10-bit (Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)

Drucker P91 D (Mitsubishi Electric Europe, Ratingen)

Reinstwasseranlage:

Milli-Q Academic System (Millipore[™], Schwalbach)

Sterilfiltrationsanlage:

ME 24 (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel)

2 Software

ABI Prism 310 (Version 1.0.4)	(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt)
Base SAS [®] (Version 9.1.3)	(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
Bioedit (Version 7.0.5.2.)	(Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University, Copyright© 1997-2005)
GeneSight (Version 3.5)	(BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA)
GoMiner [™]	(http://discover.nci.nih.gov/gominer/)
ImaGene [™] (Version 5)	(BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA)
Lab Works (Version 4.5.)	(Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)
LightCycler (Version 3.5)	(Roche Diagnostics, Mannheim)
MAVI Pro (Version 2.6.0)	(BioDiscovery Inc., Los Angeles, USA)
PathwayExplorer	(https://pathwayexplorer.genome.tugraz.at/)
Primer3 (Version 0.4.0)	(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
QCapture (Version 1.66)	(Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK)
QVALUE	(http://faculty.washington.edu/~jstorey/qvalue/)
Sequencing analysis (Version 3.0)	(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
TIGR MultiExperimentViewer	(http://www.tigr.org/software/)

3 Chemikalien und Lösungen

3.1 Chemikalien (alphabetisch)

10 x Puffer für SupraTherm [™] taq Polymerase	(GeneCraft, Lüdinghausen)
10 x Puffer für taq DNA Polymerase	(Promega, Madison USA)
2-β-Mercaptoethanol	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
3-Morpholino-1-Propansulfonsäure, MOPS	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
5 x First strang Puffer	(Invitrogen, Karlsruhe)
Aqua bidestillata	(Qiagen, Hilden)
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, BSA	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
Bromphenolblau, 0,1 %	(Serva, Heidelberg)
Chloroform, Trichlormethan	(Roth, Karlsruhe)

Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 mM	(Promega, Mannheim)
Diethylpyrocarbonat 0,1 %, DEPC	(Serva, Heidelberg)
Di-Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	(Merck KGaA, Darmstadt)
Dithiotreitol, DTT, 100 mM	(Invitrogen, Karlsruhe)
DNase I (10 U/μl) + RDD-Puffer	(Qiagen, Hilden)
Essigsäure	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Ethanol, 96-100 %	(Applichem, Darmstadt)
Ethidiumbromid, 10 mg/μl	(Serva, Heidelberg)
Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat, EDTA	(Applichem, Darmstadt)
Ficoll Typ 400	(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
FluoroLink™ Cy3-UTP, 5 mM	(Amersham, Buckinghamshire, UK)
FluoroLink™ Cy5-UTP, 5 mM	(Amersham, Buckinghamshire, UK)
Formaldehyd, 37 %	(Roth, Karlsruhe)
Formamid, 99,5 %	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
Isoamylalkohol, 3-Methyl-1-butanol	(Applichem, Darmstadt)
Isopropanol, Propan-2-ol	(Applichem, Darmstadt)
Kaliumacetat, K-ac	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumacetat, Mg-ac	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumsulfat, MgSO ₄	(Roth, Karlsruhe)
Natriumacetat, Na-ac	(Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumchlorid, NaCl	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Natriumcitrat, Na-Ci	(Roth, Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumhydroxid, NaOH	(Roth, Karlsruhe)
pBR322 DNA/AluI Marker 20	(Fermentas, St. Leon-Rot)
peq Gold Universal Agarose	(peqLab, Erlangen)
Phenol, pH 4,7	(Roth, Karlsruhe)
Phenol, pH 7,5-8,0	(Roth, Karlsruhe)
PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker	(Fermentas, St. Leon-Rot)
Poly T12 Primer, 50 pmol/μl	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
Polyvinylpyrrolidone, PVP	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)

Proteinase K, 20 mg/ml	(Roche Diagnostics, Mannheim)
QIAzol [®] Lysis Reagent	(Qiagen, Hilden)
RNase freies Wasser	(Qiagen, Hilden)
RNasin, Ribonuclease Inhibitor, 40U/μl	(Promega, Madison USA)
Sodium-Dodecyl-Sulfat, SDS ultra pure	(Roth, Karlsruhe)
SuperScript II Reverse Transcriptase	(Invitrogen, Karlsruhe)
SupraTherm™ Taq Polymerase	(GeneCraft, Lüdinghausen)
Taq DNA Polymerase, 5 U/μl	(Promega, Madison USA)
TRI [®] Reagent	(Sigma Aldrich Chemicals, Steinheim)
TRIS, 99,3 %	(Roth, Karlsruhe)
TRIS-Acetat, TRIS-ac	(Roth, Karlsruhe)
Xylencyanol	(Roth, Karlsruhe)
Restriktionsenzym ScrFI	(New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

3.2 Kits (alphabetisch)

ABI [®] PRISM BigDye [®]	
Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	(Applied Biosystem, Foster City, USA)
cDNA Synthesis System	(Roche Diagnostics, Mannheim)
High Pure RNA Tissue Kit	(Roche Diagnostics, Mannheim)
LightCycler [®] FastStart DNA	(Roche Diagnostics, Mannheim)
MasterPLUS SYBR Green I	(Roche Diagnostics, Mannheim)
MEGAscript [®] T7 Kit	(Ambion, Cambridgeshire, UK)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick [®] PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
RNeasy [®] Lipid Tissue Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
RNeasy [®] Mini Kit	(Qiagen, Hilden)

3.3 Lösungen

TRIS Puffer	5 ml	1 M TRIS/HCl (pH 8,0)
	20 ml	0,5 M EDTA
	5 ml	10 % SDS
	70 ml	Aqua bidestillata
TE-Puffer	2,5 ml	1 M TRIS/HCl (pH 8,0)
	0,5 ml	0,5 M EDTA
	247 ml	Aqua bidestillata
10 x TAE-Puffer (pH 8,0)	48,46 g	TRIS-ac
	3,72 g	EDTA
	1 l	Aqua bidestillata
Ladepuffer DNA	50 ml	Glycerin, 99 %
	1 ml	Bromphenolblau, 10 % Lsg.
	24 ml	0,5 M EDTA
	1 ml	1 M TRIS/HCl (pH 8,0)
0,1 M Agarose-Gel	0,75 g	Agarose
	75 ml	TAE-Puffer
	3 µl	Ethidiumbromid (10 mg/µl)
2,2 M Formaldehyd-Gel	30 mg	Agarose
	21,70 ml	DEPC behandeltes Wasser
	5,37 ml	Formaldehyd, 37 %
Probengemisch RNA	5 µl	Formamid
	1,75 µl	Formaldehyd, 37 %
	5 µl	10 x MOPS
	1,0 µl	Ladepuffer RNA
	0,25 µl	Ethidiumbromid

Anhang

Ladepuffer RNA	30 ml	Glycerin, 99 %
	0,25 g	Bromphenolblau
	200 µl	10 mM EDTA
	0,25 g	Xylencyanol
10 x MOPS, pH 7,5	83,72 g	MOPS
	13,61 g	Na-ac
	3,72 g	EDTA
	1 l	Aqua bidestillata
5 x Fragmentierungspuffer	0,50 ml	1 M TRIS/HCl (pH 8,1)
	0,12 g	K-ac
	0,08 g	Mg-ac
	24,50 ml	RNase freies Wasser
Na-Phosphat (pH 8,0)	50 mM	Di-Natriumhydrogenphosphat
	50 mM	Natriumdihydrogenphosphat
20 x SSC Stammlösung (pH 7,0)		
	175,3 g	NaCl
	88,2 g	Na-Ci
50 x Denhardt's Solution	5 g	Ficoll Typ 400
	5 g	PVP
	5 g	BSA
	500 ml	Aqua destillata
Hybridisierungspuffer	50 µl	1 M Na-Phosphat (pH 8,0)
	500 µl	100 % Formamid
	300 µl	20 x SSC
	100 µl	50 x Denhardt's Lösung
	50 µl	10 % SDS

Waschlösung 1	100 ml	20 x SSC
	10 ml	10 % SDS
	890 ml	Aqua destillata
Waschlösung 2	50 ml	20 x SSC
	950 ml	Aqua destillata
Waschlösung 3	25 ml	20 x SSC
	975 ml	Aqua destillata

Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), CI

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), PCI

3.4 Verbrauchsmittel

Centri Sep spin column	(Princeton Separations, Inc.; NY, USA)
Deckglas (24 x 50 mm)	(Roth, Karlsruhe)
Falcon-Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml)	(Roth, Karlsruhe)
LightCycler [®] kurze Kapillare	
5-47 cm x 50 µm	(Roth, Karlsruhe)
Microcon YM-10 concentrators	(Millipore [™] , Schwalbach)
Objekträger-Färboxen und -Halter	(Roth, Karlsruhe)
Omnifix [®] Einmalspritze (50 ml)	(Roth, Karlsruhe)
Röhrenreaktionsgefäß, 5 ml, 75 x 12 mm	(Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Servisol [®] Aero Duster 100	(Ambersil Ltd., Somerset, UK)
Sterican [®] Einmalinjektionskanüle	
Größe 2 (100 ml)	(Roth, Karlsruhe)
Biosphere Filter-Pipettenspitzen	(Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
sterile, RNase-freie Pipettenspitzen	(Eppendorf/Gilson, Hamburg)
Sterilfilter, Größe 0,22 µm	(Millipore [™] , Schwalbach)
Reaktionsgefäß, 0,2 ml; 0,5 ml;	
1,5 ml; 2 ml	(Roth, Karlsruhe)
Vulkanisierungsflüssigkeit	(REMA Tip Top, Poing)

Lebenslauf

Name: Katrin Komolka
Geburtsdatum: 21.02.1978 in Hoyerswerda, Sachsen

Berufserfahrung

09/2007 – heute
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher
Nutztiere Dummerstorf, Forschergruppe Funktionale
Genomanalyse

Thema: „Funktionale Analyse der genetischen Mechanismen, welche die Variabilität der Erregerabwehr in der Milchdrüse des Rindes determinieren“

06/2003 – 06/2007
Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorand)
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher
Nutztiere Dummerstorf
DFG-Projekt und Promotionsvorhaben in der Forschergruppe
Funktionale Genomanalyse, Prof. Dr. rer. nat. M. Schwerin

Thema: „Vergleichende Analyse der TSE- assoziierten Genexpression in ausgewählten Geweben von Tieren mit unterschiedlicher genetischer Prädisposition für die Ausprägung von Scrapie beim Schaf“

Schule/Studium

10. März 2003
Abschluss Diplom Agrar Ingenieurin (Dipl. agr. Ing.)

Thema: „Prüfung der Eignung eines Einstreumittels zur Reduktion der Stubenfliegenpopulation (*Musca domestica*, LINNÉ 1758) unter Laborbedingungen“

09/1997 – 03/2003
Universität Rostock
Studium der Agrarökologie

09/1994 – 08/1997
1. Gesamtschule Cottbus
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1984 – 07/1994
Polytechnische Oberstufe/Realschule Cottbus
Abschluss: Mittlere Reife

Rostock, den 11.10.2008