

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und dem
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger des Friedrich-Loeffler-Institutes,
Bundforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

**Biochemische und histologische Unterscheidung von klassischen und atypischen
Scrapie- und von BSE-Infektionen bei Schafen und deren Übertragung auf Mäuse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anja Gretzschel
aus Dresden

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Martin Groschup
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger
Friedrich Loeffler Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Insel Riems

Professor Dr. Uwe Truyen
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Martin Groschup
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger
Friedrich Loeffler Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Insel Riems

Professor Dr. Uwe Truyen
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Ernst Lücker
Institut für Lebensmittelhygiene
Direktor: Professor Dr. Karsten Fehlhaber
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Markus Glatzel
Institut für Neuropathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Tag der Verteidigung: 18. September 2007

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Das Prionprotein	3
2.1.1	Das Prionmodell.....	3
2.1.2	Das Prionproteingen (PRNP)	4
2.1.3	Das zelluläre Prionprotein (PrP ^C).....	4
2.1.4	Die Scrapie-Isoform des Prionproteins (PrP ^{Sc})	5
2.1.5	Konversion von PrP ^C zu PrP ^{Sc}	7
2.2	Transmissible spongiforme Enzephalopathien	8
2.2.1	Bovine spongiforme Enzephalopathie	9
2.2.2	Scrapie.....	11
2.2.2.1	Geschichtlicher Überblick.....	11
2.2.2.2	Genotyp-Empfänglichkeit.....	12
2.2.2.3	Übertragbarkeit.....	15
2.2.2.4	Pathogenese und Histopathologie	16
2.2.2.5	Atypische Scrapie.....	17
2.2.2.6	BSE beim Schaf	18
2.2.2.7	Diagnostik bei Scrapie in der EU und Deutschland	20
2.2.2.8	Schnellteste und Lebendteste	21
2.3	TSE-Erregerstämme	22
2.3.1	Mausbioassay	23
2.3.1.1	Klinik.....	23
2.3.1.2	Inkubationszeit	24
2.3.1.3	Übertragbarkeit/ Speziesbarriere.....	25
2.3.1.4	Transgene Mäuse.....	26
2.3.2	Proteinbiochemie.....	27
2.3.2.1	Glykosylierungsverhältnis.....	27
2.3.2.2	Molekularmasse	28
2.3.2.3	Immunoreaktivität	29
2.3.2.4	Proteinase-K-Stabilität	30
2.3.3	Histopathologie	30
2.3.3.1	Läsionsprofil.....	30
2.3.3.2	PrP ^{Sc} -Ablagerung und Immunoreaktivität	31
2.3.3.3	Resistenz gegenüber Inaktivierung	32

2.3.3.4	Konformation	33
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Tiere.....	34
3.1.1	Schafe	34
3.1.2	Mäuse	39
3.1.2.1	Mauslinien.....	39
3.1.2.2	Tierhaltung	39
3.1.2.3	Kontrollen.....	40
3.1.2.4	Inokulate.....	40
3.1.2.5	Durchführung der Tierversuche	40
3.1.2.6	Probenentnahme	42
3.1.2.7	Inkubationszeiten	42
3.2	Proteinbiochemische Methoden	43
3.2.1	Herstellung von Gehirnhomogenaten.....	43
3.2.2	Einfacher Proteinase K-Verdau.....	43
3.2.3	Fällung mit Phosphorwolframsäure (PTA-Fällung)	44
3.2.4	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	44
3.2.5	Western Blot.....	45
3.2.6	Glykosylierungsverhältnisse und Molekularmasse	46
3.2.7	Antikörperbindungsverhältnis	46
3.2.8	Langzeit-Proteinase K-Resistenz	48
3.2.9	Deglykosylierung	48
3.2.10	Proteinase K-Stabilität.....	48
3.3	Histologische Methoden	49
3.3.1	Herstellung der histologischen Präparate	49
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	50
3.3.3	Beurteilung der Vakuolisierung (Lesion Profile Scoring)	50
3.3.4	Immunhistologische Methoden	56
3.3.5	Beurteilung der immunhistologischen Präparate	57
3.4	Erhaltene Dienstleistungen.....	58
3.4.1	Schnellteste, Diagnostik	58
3.4.2	Genotypen, Alter, Rasse und Todesart der Scrapieisolate	58
3.4.3	Kontrollen.....	58

4	ERGEBNISSE	60
4.1	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate	60
4.1.1	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Schaf (FLI-Test)	60
4.1.1.1	Glykosylierungsverhältnisse	60
4.1.1.2	Molekulare Masse	61
4.1.1.3	Antikörperbindungsverhältnis.....	62
4.1.2	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate in der Maus	65
4.1.2.1	Kontrollen.....	65
4.1.2.2	Übertragungsraten und Inkubationszeiten.....	65
4.1.2.3	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	68
4.1.2.4	Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung	76
	Histopathologische Charakterisierung, vergleichende Darstellung und Clusteranalyse..	88
4.2	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate	94
4.2.1	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Schaf	94
4.2.1.1	PrP ^{Sc} -Bandenmuster und Molekularmasse.....	94
4.2.1.2	Epitopbestimmung mittels verschiedener PrP-Antikörper.....	96
4.2.1.3	Antikörperbindungsverhältnis.....	101
4.2.1.4	PK-Stabilität	101
4.2.1.5	Deglykosylierung	102
4.2.2	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate in der Maus	103
4.2.2.1	Klinische Symptome, Übertragungsraten und Inkubationszeiten	103
4.2.2.2	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	110
4.2.2.3	Histologische Charakterisierung	112
5	DISKUSSION	118
5.1	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate	118
5.1.1	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Schafmaterial (FLI-Test)	118
5.1.2	Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Mausmaterial	120
5.1.2.1	Übertragungsraten und Inkubationszeiten.....	120
5.1.2.2	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	122
5.1.2.3	Histologische Charakterisierung	123
5.1.3	Ausbrüche klassischer Scrapie	126
5.1.3.1	Ausbruch Borken, Nordrhein Westfalen	126
5.1.3.2	Ausbruch Güstrow, Mecklenburg Vorpommern.....	127
5.1.3.3	Ausbruch Hochsauerlandkreis, Nordrhein Westfalen	128

5.2	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate.....	128
5.2.1	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Schafmaterial	128
5.2.2	Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Mausmaterial	133
5.2.2.1	Klinische Symptome, Übertragungsraten und Inkubationszeiten	133
5.2.2.2	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	134
5.2.2.3	Histologische Charakterisierung	135
5.3	Bewertung der zur Stammcharakterisierung verwendeten Methoden.....	137
5.3.1	Bewertung der proteinbiochemischen Methoden.....	137
5.3.2	Bewertung der histologischen Methoden.....	138
5.3.3	Vergleich der Stammcharakterisierung im Mausbioassay und im FLI-Test.....	139
6	ZUSAMMENFASSUNG	141
7	SUMMARY	143
8	LITERATURVERZEICHNIS	145
9	ANHANG.....	168
9.1	Materialien.....	168
9.1.1	Antikörper	168
9.1.1.1	Antikörper gegen PrP	168
9.1.1.2	andere Antikörper.....	168
9.1.2	Konjugate	174
9.1.3	Enzyme.....	174
9.1.4	Puffer und Lösungen	174
9.1.5	Chemikalien	178
9.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	179
9.2	Histologische Methoden.....	181
9.3	Ergebnistabellen.....	182
9.4	Bilddokumentation.....	193
9.5	Tabellenverzeichnis.....	213
9.6	Abbildungsverzeichnis.....	213

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
AK	Antikörper
AKBV	Antikörperbindungsverhältnis
APS	Ammoniumpersulfat
BBP12/92	Boviner Brain Pool 12/1992
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CEA	Commissariat a l'Energie Atomique
CIDC	Central Institute for Animal Disease Control
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	Carboxy-terminal
CWD	Chronic Wasting Disease
DEFRA	Department for Environment, Food and Rural Affairs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union

FFI	Fatale familiäre Insomnie
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
G	Gauge, Durchmesser einer Kanüle
G α M	goat-anti-mouse
G α Ra	goat-anti-rabbit
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
i. c.	intrazerebral
IgG	Immunglobulin G
i. p.	intraperitoneal
IHC	Immunhistochemie
INNT	Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Kap.	Kapitel
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
LRS	Lymphoretikuläres System
M	Molar; Mol/Liter
MAK	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

n.a.	nicht auswertbar
NMR	nuclear magnetic resonance – Magnetische Kernresonanz
Nor98	atypische Scrapie
NP 40	Nonidet P 40
N-terminal	Amino-terminal
O.I.E.	Office Internationale des Epizooties, World Organisation for Animal Health Internationales Tierseuchenamt
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET-Blot	Paraffin Embedded Tissue Blot
PK	Proteinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	N-Glycosidase F
PNS	Peripheres Nervensystem
PRNP	Prionproteingen
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	Scrapie-assoziiertes Prionprotein
PrP ²⁷⁻³⁰	Proteinase K resistenter Teil des PrP ^{Sc}
PrP*	Konversionsintermediat
PTA	phosphotungstic acid – Phosphorwolframsäure
PVDF	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwertes
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SDS	Natriumdodecylsulfat
sinc-Gen	Scrapie-Incubation-Gen
sog.	sogenannt
SSBP1	Sheep Scrapie Brain Pool 1
Tab.	Tabelle
TBA	Tierkörperbeseitigungsanstalt
TBM	tingible body macrophages
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TME	Transmissible Minkenzephalopathie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
u.a.	unter anderem
U	Unit
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
vCJD	„new-variant-CJD“; neue Variante der CJD
vCJK	neue Variante der CJK
VLA	Veterinary Laboratories Agency
VO	Verordnung
w/v	Gewichtsprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Aminosäuren (Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code)

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Deutsche Bundesländer

BB	Brandenburg	BW	Baden Württemberg
BY	Bayern	HE	Hessen
MV	Mecklenburg Vorpommern	NRW	Nordrhein Westfalen
NS	Niedersachsen	SN	Sachsen
ST	Sachsen Anhalt	TH	Thüringen

1 Einleitung

Scrapie ist eine Erkrankung bei Schafen und Ziegen, die 1732 erstmals beschrieben wurde und daher seit mehr als 270 Jahren bekannt ist (MCGOWAN 1922). Sie gehört wie die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen zu den transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSEn). Dabei handelt es sich um eine Gruppe neurodegenerativer, progressiver und stets tödlich verlaufender Erkrankungen. Scrapie kommt mit Ausnahme von Australien und Neuseeland weltweit vor.

Die Natur des Erregers ist noch nicht vollständig geklärt. PRUSINER (1982) verwendete als erster den Begriff Prion, der sich von „**proteinaceous infectious particle**“ ableitet. Die daraus abgeleitete „protein-only“-Theorie geht davon aus, dass es sich bei dem Erreger um die fehlgefaltete Isoform, PrP^{Sc}, des wirtseigenen Prionproteins, PrP^C, handelt. Der Erreger zeigt eine ungewöhnlich hohe Resistenz gegenüber chemikalischen und physikalischen Inaktivierungsverfahren.

Scrapie gilt im Gegensatz zu BSE als nicht übertragbar auf den Menschen. Nach Einführung der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien, welche auch die stichprobenartige Testung von geschlachteten und verendeten Schafen und Ziegen beinhaltete, kam es zu einem Anstieg der diagnostizierten Scrapiefälle innerhalb Deutschlands sowie in der EU.

Bei der Scrapie sind klassische und atypische Formen bekannt. Atypische Scrapiefälle wurden erstmals 1998 in Norwegen beschrieben (BENESTAD et al. 2003), weshalb diese Isolate auch als Nor98-Scrapie bezeichnet wurden. Inzwischen wurden atypische Scrapiefälle, die im Vergleich zum klassischen Scrapieerreger ungewöhnliche Eigenschaften aufweisen, in zahlreichen Ländern der EU beschrieben.

Schafe können experimentell mit dem BSE-Erreger infiziert werden, wobei eine BSE-Infektion im Schaf klinisch nicht von einer Scrapieinfektion unterschieden werden kann. Es ist bekannt, dass Tiermehl vor Einführung des Verfütterungsverbotes auch an Schafe und Ziegen verfüttert wurde. Um das Risiko einer BSE-Infektion innerhalb der Schaf- und Ziegenpopulation einschätzen zu können, müssen daher gemäß der Verordnung (EG) Nr. 36/2005 zur Änderung der VO (EG) Nr. 999/2001 seit dem 14.01.2005 alle bei kleinen Wiederkäuern festgestellten TSE-Fälle in der EU einem differentialdiagnostischen Test unterzogen werden, um BSE von Scrapie zu unterscheiden. Der erste Fall einer natürlichen Übertragung des BSE-Erregers auf eine Ziege wurde 2005 bekannt (ELOIT et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein differentialdiagnostischer Test (FLI-Test) entwickelt, um direkt am Schafmaterial die Abgrenzung einer BSE-Infektion von einer Scrapieinfektion zu ermöglichen. Bei einem Teil der dafür verwendeten deutschen klassischen Scrapiefälle wurde diese Charakterisierung zusätzlich im Mausbioassay durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem FLI-Test zu verifizieren und die vorhandenen Scrapiestämme weitergehend zu charakterisieren.

Der zweite Teil dieser Arbeit enthält experimentelle Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung und Übertragbarkeit atypischer deutscher Scrapieisolate sowie zu deren Differenzierung gegenüber dem BSE-Erreger.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Prionprotein

2.1.1 Das Prionmodell

Seit Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde über die Natur des Erregers der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSEn) diskutiert. Die Virus-Theorie wird heute von DIRINGER et al. (1994) und MANUELIDIS (1994, 1995, 2003) vertreten. Als Ursache wird von diesen das Vorliegen eines ungewöhnlichen, sogenannten „slow“-Virus vermutet. Da bisher der Nachweis einer TSE-spezifischen Nukleinsäure oder überhaupt einer Nukleinsäure, die lang genug wäre, um ein kleines Protein zu kodieren, nicht gelang (RIESNER et al. 1993), gilt diese Theorie als unwahrscheinlich. Die Virino-Theorie (KIMBERLIN 1982, DICKINSON u. OUTRAM 1988) geht davon aus, dass der Erreger aus einer spezifischen Nukleinsäure besteht, die von einem wirtsspezifischen Protein umhüllt ist. Durch die Virino-Theorie könnten das Fehlen der Immunantwort bei den TSEn und auch die Stammvariationen erklärt werden.

Schon 1966 stellten ALPER et al. (1966) fest, dass der Scrapie-Erreger nicht durch ionisierende und UV-Bestrahlung inaktiviert wird und folgerten daraus, dass dieser Erreger kleiner als alle bisher bekannten Viren ist und dass es sich vielmehr um ein Protein handeln könnte. Prusiner konnte später bestätigen, dass Scrapie-Erreger nicht durch Verfahren inaktiviert werden, die Nukleinsäuren verändern oder zerstören, wohl aber durch Behandlungen, die zum Abbau oder der Zerstörung von Proteinen führen. Er zog daraus die Schlussfolgerung, dass es sich nicht um ein Virus, sondern um einen neuartigen, proteinartigen Erreger handeln muss, den er als Prion (**proteinaceous infectious particle**, daraus entstand der Begriff ‚Prion‘) bezeichnete (PRUSINER 1982). Die darauf beruhende „protein-only“ Theorie (GRIFFITH 1967, PRUSINER 1991) geht davon aus, dass es sich bei dem infektiösen Erreger um die pathologische Isoform, PrP^{Sc}, des zellulären Prionproteins, PrP^C, handelt. Der bis heute ausstehende Nachweis einer erregerspezifischen Nukleinsäure, die Verbindung zwischen PrP^{Sc} und einer Scrapieinfektion (BOLTON et al. 1982, PRUSINER 1982), die Zusammenhänge zwischen dem Prionproteingen und unterschiedlichen Empfänglichkeiten gegenüber Prionen (PRUSINER et al. 1990) und familiären Prionenkrankheiten (HSIAO et al. 1989) sowie der Nachweis, dass PrP-Knockout-Mäuse unempfindlich gegenüber einer Scrapieinfektion sind (BÜELER et al. 1993), unterstützen diese Theorie, obwohl sie immer noch kontrovers diskutiert wird (SOTO u. CASTILLA 2004).

2.1.2 Das Prionproteing (PRNP)

Das Prionproteing (PRNP) ist bei allen Säugetieren hoch konserviert. Es handelt sich um ein Gen, das in einfacher Kopie vorliegt und für den Aufrechterhalt der Zelle notwendig ist (COLLINS et al. 2004). Das PRNP wird am stärksten in Neuronen exprimiert (OESCH et al. 1985), aber auch in Oligodendrozyten, Astrozyten und in geringerer Menge in zahlreichen extraneuronalen Geweben wie der Niere. Ein Gen, das PrP^C oder PrP^C-ähnliche Proteine kodiert, wurde auch bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen beschrieben (WOPFNER et al. 1999, SIMONIC et al. 2000, STRUMBO et al. 2001, OIDTMANN et al. 2003, RIVERA-MILLA et al. 2003). Das PRNP der Säugetiere beinhaltet in Abhängigkeit von der jeweiligen Tierart zwei oder drei Exons, wobei das letzte Exon den vollständigen offenen Leserahmen enthält. Das PRNP des Schafes befindet sich auf Chromosom 13 und besitzt zwei kurze, 5' nicht-translatierte Exons und ein langes kodierendes drittes Exon (GOLDMANN et al. 1990, GOLDMANN 1993). Der offene Leserahmen für das PrP^C von Ziege und Schaf kodiert für 256 Aminosäuren (GOLDMANN et al. 1990, 1996). Bei zahlreichen Tierarten wurden Polymorphismen für das Prionprotein beschrieben, z.B. bei Mäusen (WESTAWAY et al. 1987, 1994, BARRON et al. 2001, 2003, 2005), Schafen und Ziegen und auch beim Menschen, die mit veränderten Inkubationszeiten und Empfänglichkeiten für TSEn einhergehen. Diese beruhen auf Punkt- oder Insertationsmutationen im offenen Leserahmen des Prionproteingens. Durch solche Mutationen kann der α -helikale Bereich des Prionproteins destabilisiert und die Konversion zu einer β -Faltblattstruktur begünstigt werden.

2.1.3 Das zelluläre Prionprotein (PrP^C)

Das reife PrP^C ist ein Glykoprotein, welches im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wird. Es hat eine molekulare Masse von 33-35 kDa. Während der Synthese im ER finden mehrere posttranslationale Modifikationen statt: Amino-(N)-terminal wird ein 23 Aminosäuren umfassendes Signalpeptid abgespalten, zwischen zwei Cysteinen am Carboxy-(C)-Terminus wird eine Disulfidbrücke gebildet und nach Abspaltung eines C-terminalen hydrophoben Peptids wird ein Glykosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker) angefügt, über den das PrP^C an der Zelloberfläche verankert wird. Weiterhin können im ER und Golgi-Apparat an Position 180 und 196 (Mausprionprotein) an den dortigen Asparaginresten Oligosaccharide angefügt werden, so dass das zelluläre Prionprotein in drei Isoformen vorliegt: unglykosyliert, einfach oder zweifach glykosyliert.

Auf der Zelloberfläche ist PrP^C in Caveolen oder ‚caveolae-like-domains‘ lokalisiert (VEY et

al. 1996). Nicht alle PrP^C-Moleküle bleiben auf der Zelloberfläche: ein Teil der PrP^C-Moleküle unterliegt einem endozytotischen Kreislauf, bei dem es zur endozytotischen Aufnahme in die Zelle und danach zur erneuten Präsentation auf der Zelloberfläche kommt (SHYNG et al. 1993).

Die biologische Funktion von PrP^C ist noch nicht abschließend geklärt. PrP-Knockout-Mäuse, bei denen der offene Leserahmen zerstört wurde, sind normal entwickelt und zeigen keine verkürzte Lebensdauer (BÜELER et al. 1992, MANSON et al. 1994). Lediglich geringgradige Abweichungen im zirkadianen Rhythmus (TOBLER et al. 1996), veränderte Funktionen des Hippocampus (COLLINGE et al. 1994, COLLING et al. 1997, HERMS et al. 1999, MALLUCCI et al. 2002) und geringgradige Verhaltensänderungen wurden beschrieben. PrP-Knockout-Mäuse, denen mehr als der offene Leserahmen des PRNP entfernt wurde, entwickeln sich ebenfalls normal, zeigen jedoch im höheren Alter Ataxien und einen Verlust der Purkinjezellen im Kleinhirn (SAKAGUCHI et al. 1996, MOORE et al. 1999, SILVERMAN et al. 2000, ROSSI et al. 2001). Das PrP^C könnte im neuronalen Kupfermetabolismus (BROWN et al. 1997, BROWN 2004), bei der synaptischen Signalübertragung (COLLINGE et al. 1994) oder bei der Bildung und Differenzierung bestimmter Nervenzellen (STEELE et al. 2006) eine Rolle spielen.

Die Struktur des PrP^C besteht aus drei α -Helices und zwei kurzen antiparallel angeordneten β -Faltblättern (RIEK et al. 1996, 1997, ZAHN et al. 2000). Die globuläre Domäne umfasst die Aminosäuren 121 bis 231, während der N-terminale Teil unstrukturiert ist. Inzwischen wurden die dreidimensionalen Strukturen der PrP^C-Moleküle zahlreicher Tierarten mittels NMR-Untersuchungen (nuclear magnetic resonance – Magnetische Kernresonanz) aufgeklärt (LOPEZ GARCIA et al. 2000, HORNEMANN et al. 2004, CALZOLAI et al. 2005, GOSSERT et al. 2005, LYSEK et al. 2005).

PrP^C wird durch Proteinase K (PK) komplett verdaut und ist in milden Detergentien löslich.

2.1.4 Die Scrapie-Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc})

Die Aminosäuresequenz und die molekulare Masse von PrP^C und PrP^{Sc} sind gleich, Unterschiede finden sich jedoch in der Konformation und den biochemischen Eigenschaften.

PrP^C liegt als α -helikales Monomer vor, während PrP^{Sc} aufgrund des erhöhten Anteils an β -Faltblattstrukturen zu dicht gepackten Multimeren aggregiert (BASKAKOV et al. 2002). Dies führt bei PrP^{Sc} zu einer partiellen Resistenz gegenüber dem Verdau mit zahlreichen Proteasen, darunter Proteinase K (PK): N-terminal werden ungefähr 70 Aminosäuren abgespalten, wo-

durch sich die molekulare Masse des PK-resistenten PrP^{Sc} auf 27-30 kDa verringert. Die Folge ist eine charakteristische Verschiebung („shift“) der molekularen Masse von PrP^{Sc} im Western Blot. Das PK-verdaute PrP^{Sc} wird wegen der veränderten molekularen Masse auch als PrP²⁷⁻³⁰ bezeichnet, bleibt jedoch infektiös. Die PK-Resistenz ist allerdings nur relativ; sie ist u.a. vom Verhältnis der eingesetzten PK-Menge zur eingesetzten Proteinmenge und vom verwendeten TSE-Erregerstamm abhängig und kann unter denaturierenden Bedingungen deutlich erniedrigt sein. Im Gegensatz zu PrP^C ist PrP^{Sc} auch nach Zugabe milder Detergentien unlöslich. PrP^{Sc} hat eine hohe Tendenz zur Bildung fibrillärer Aggregate, die elektronenmikroskopisch dargestellt werden können (Abb. 2.1) und als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnet werden (PRUSINER et al. 1983). PrP^{Sc} hat im Gegensatz zu PrP^C einen höheren Anteil an β -Faltblattstrukturen (PAN et al. 1993). Solche Strukturen können auch in vitro aus rekombinantem, bakteriell exprimiertem Prionprotein unter geeigneten Bedingungen entstehen (BASKAKOV et al. 2002). Es handelte sich dabei um N-terminal verkürztes, rekombinantes PrP, welches die Aminosäuresequenz von 89 bis 230 enthielt und in β -Faltblatt-reiche Strukturen aggregierte. Diese waren in der Lage, in transgenen Mäusen eine TSE-Erkrankung hervorzurufen (LEGNAME et al. 2004).

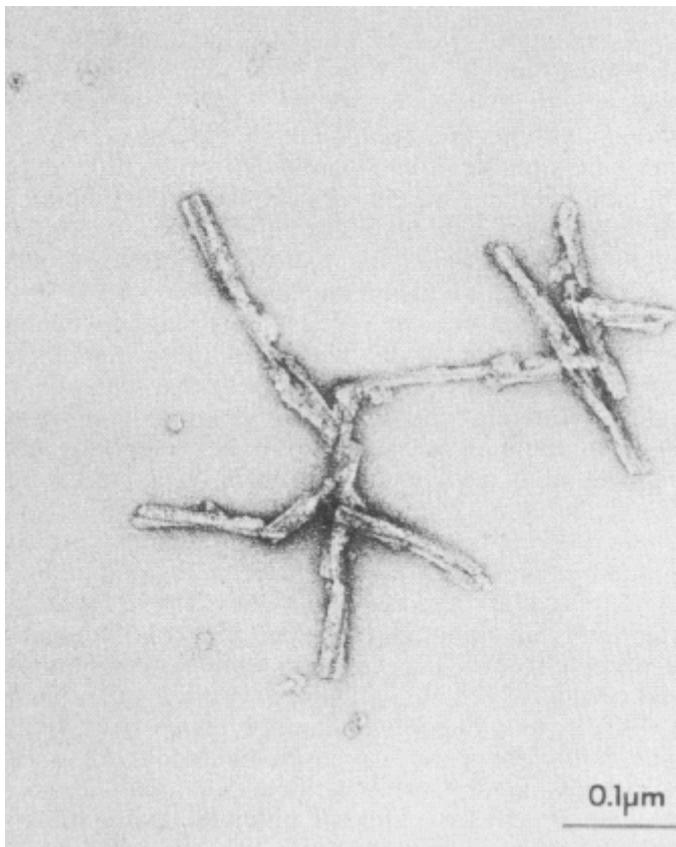


Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische Darstellung aufgereinigter Scrapie-assoziiierter Fibrillen (SAF) bei mit dem Scapiestamm Me7 infizierten C57Bl6-Mäusen (KASCSAK et al. 1986).

2.1.5 Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}

Der genaue Ablauf der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} ist noch nicht vollständig geklärt. Auch der Ort der Konversion wird kontrovers diskutiert: Sie könnte an der Zelloberfläche in den Caveolen (HARRIS 1998) oder sog. „*lipid rafts*“ (Baron et al. 2002), in den Endosomen (CAUGHEY et al. 1991, ARNOLD et al. 1995) oder in Lysosomen (LASZLO et al. 1992, MAYER et al. 1992) stattfinden. Der genaue Mechanismus der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} ist noch nicht geklärt, aber man nimmt an, dass sich Zwischenprodukte von PrP^C schrittweise umfalten und sich die veränderten biochemischen Eigenschaften aneignen (HARRIS 1998, JACKSON et al. 1999). Für diese Umfaltung ist der direkte Kontakt zwischen PrP^C und PrP^{Sc} notwendig. Zwei verschiedene Modelle wurden zur Beschreibung dieser Umfaltung vorgeschlagen: das Heterodimer-Modell von PRUSINER (1991) und das Kristallisationsmodell von Lansbury (COME et al. 1993, CAUGHEY et al. 1995).

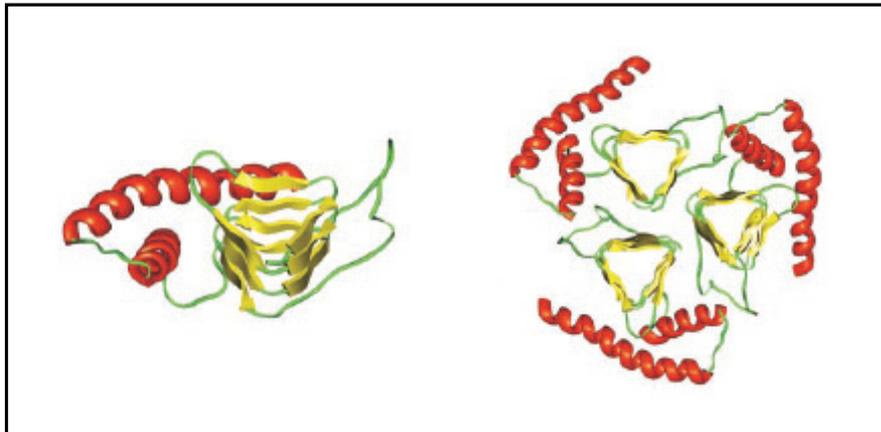


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des monomeren PrP²⁷⁻³⁰ (links) und des trimeren PrP²⁷⁻³⁰ (GOVAERTS et al. 2004).

Im Heterodimer-Modell ist die spontane Umfaltung in PrP^{Sc} in der Regel energetisch unmöglich. Hierzu ist die direkte Interaktion des PrP^C mit exogenem PrP^{Sc} erforderlich. Durch Mutationen im Prionprotein, wie sie bei familiären Prionenkrankheiten vorkommen, kann die initiale Umfaltung jedoch auch spontan erfolgen, wenn auch ausgesprochen ineffizient (WEISSMANN 1999). Beim Kristallisationsmodell lässt sich monomeres PrP^C reversibel in ein Konversionsintermediat PrP^{*} überführen, das Gleichgewicht der Reaktion liegt jedoch eindeutig auf Seite des zellulären PrP^C. Erst wenn sich PrP^{*} an einen Infektionskeim („seed“) aus mehreren PrP^{Sc}-Molekülen anlagert, verschiebt sich das Gleichgewicht endgültig zu PrP^{Sc} und es bilden sich fibrilläre Aggregate aus. Diese Amyloide können wiederum fragmentieren und neue Infektionskeime bilden. Die Größe der Fragmente scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen: SILVEIRA et al. (2005) konnten zeigen, dass Aggregate aus 14-28 Prionmolekülen die höchste Infektiosität besitzen. Ein Modell, wie monomeres PrP²⁷⁻³⁰ in trimeren PrP²⁷⁻³⁰ Strukturen aggregieren könnte, ist in Abbildung 2.2 dargestellt (GOVAERTS et al. 2004).

Es ist *in vitro* möglich, PrP^C zu PrP^{Sc} zu konvertieren (KOCISKO et al. 1994, BESSEN et al. 1995, CAUGHEY et al. 1999). In diesen Ansätzen gelang es aber nur, PK-resistentes, nicht jedoch infektiöses PrP^{Sc} zu generieren. Erst durch eine neue Methode, die mittels Ultraschall PrP^{Sc} amplifiziert (SABORIO et al. 2001, SOTO et al. 2002) und als PMCA (protein misfolding cyclic amplification) bezeichnet wird, konnte pathogenes PrP^{Sc} erzeugt werden, das bei syrischen Hamstern zu einer TSE-Erkrankung führte (CASTILLA et al. 2005b). Dieser Versuch gilt als weiterer Beleg für die „protein-only“ Theorie.

2.2 Transmissible spongiforme Enzephalopathien

Transmissible spongiforme Enzephalopathien sind infektiöse, neurodegenerative Erkrankungen (ASHER et al. 1976, FRASER 1976) des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch die Akkumulation einer abnormen Isoform (PrP^{Sc}) des wirtseigenen, zellulären Prionproteins (PrP^C) gekennzeichnet sind. Sie kommen sowohl beim Menschen als auch bei zahlreichen Säugetierspezies vor. Nach einer monate- bis jahrelangen Inkubationszeit kommt es zu einem progressiven Krankheitsverlauf, der immer tödlich endet. Die neurodegenerative Schädigung des ZNS ist durch die Ablagerung von PrP^{Sc}, spongiformen Läsionen im Neuropil, Degeneration von Nervenzellen und Astrozytose gekennzeichnet. Eine humorale oder zelluläre Immunantwort fehlt jedoch. Das klinische Bild ist durch Ataxie, Demenz und Sensibilitätsstörungen gekennzeichnet. Einen Überblick über alle beim Menschen und den Tieren vorkommenden TSEn gibt Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Übersicht über die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bei Tieren und Menschen (PRUSINER 1997)

Transmissible spongiforme Enzephalopathien	
Tiere	Mensch
Scrapie	Kuru
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJK)
Transmissible Nerz-Enzephalopathie (TME)	- iatrogen
Chronic Wasting Disease (CWD)	- sporadisch
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	- familiär – genetisch - neue Variante
Spongiforme Enzephalopathie der exotischen Wildwiederkäuer	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)
	Fatale Familiäre Insomnie (FFI)

Bei Straußen wurde eine aviäre spongiforme Enzephalopathie publiziert (SCHOON et al. 1991a, b), die Übertragbarkeit dieser Enzephalopathie gilt bisher jedoch als nicht gesichert.

2.2.1 Bovine spongiforme Enzephalopathie

Neben der Scrapie bei Schafen und Ziegen ist die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind die wohl bekannteste transmissible spongiforme Enzephalopathie bei Tieren. 1985 wurde sie in Großbritannien zum ersten Mal beschrieben (WELLS et al. 1987). Bis zum Dezember 2005 wurden über 180.000 BSE-Fälle in Großbritannien (DEFRA 2005b) und über 5000 Fälle in anderen europäischen Ländern (O.I.E. 2006) gefunden. Inzwischen ist BSE auch in Ländern außerhalb Europas aufgetreten; so wurden BSE-Fälle in Israel, Japan, Kanada und in den Vereinigten Staaten (O.I.E. 2006) verzeichnet. Vor dem Jahr 2000 wurden in Deutschland sechs BSE-Fälle bei Rindern beschrieben, die aus Großbritannien und der Schweiz nach Deutschland importiert worden waren. Seit Einführung der BSE-Schnelltests im November 2000 wurden in Deutschland 405 BSE-Fälle bei einheimischen Rindern diagnostiziert (Stand: 31.12.2006) (Abb. 2.3).

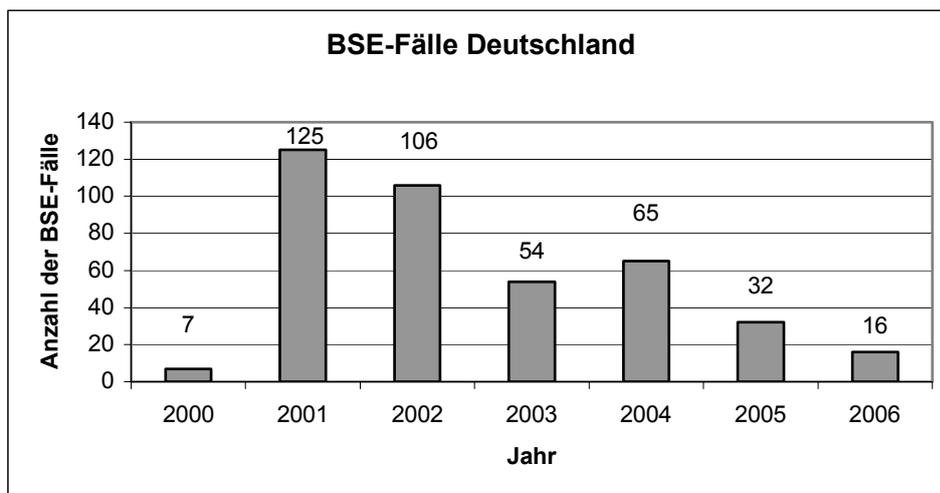


Abb. 2.3: Anzahl der BSE-Fälle bei Rindern, die seit Einführung der BSE-Schnelltests in Deutschland gefunden wurden.

Bis heute ist die genaue Ursache für die Entstehung der BSE-Epidemie im Vereinigten Königreich unklar. Sicher ist, dass die Verfütterung von ungenügend erhitztem Tiermehl an Rinder (WILESMITH et al. 1988, 1991, KIMBERLIN u. WILESMITH 1994) zur massenhaften Infektion geführt hat. Einige Wissenschaftler vermuten, dass ursprünglich Scrapieerreger aus infizierten Schafen auf das Rind übertragen wurden (WILESMITH et al. 1988, 1991). Dagegen spricht allerdings, dass die Scrapieinfektion von Rindern zumindest im Rahmen experimenteller Studien andere proteinbiochemische und histopathologische Merkmale her-

vorrufen als eine BSE-Infektion (CUTLIP et al. 1994, CLARK et al. 1995, CUTLIP et al. 1997). Daher vermuten andere Wissenschaftler, dass der Ursprung der BSE-Epidemie auf ein spontan an BSE erkranktes Rind zurückgeht, aus dessen Kadaver Tiermehl hergestellt wurde und damit der Infektionszyklus initiiert wurde (EDDY 1995). Den Beginn der Epidemie datieren WILESMITH et al. (1988) auf den Zeitraum 1981/82.

Klinische Anzeichen einer BSE-Erkrankung treten bei Rindern ab einem Alter von durchschnittlich 5 Jahren auf. Das Spektrum der Inkubationszeiten ist allerdings breit. So berichteten MATRAVERS et al. (2000) klinische Anzeichen bei einem erst 20 Monate alten Rind, YAMAKAWA et al. (2003) konnten bei einem 23 Monate alten klinisch gesunden Rind PrP^{Sc} nachweisen. Die Klinik ist durch Verhaltensstörungen (Ängstlichkeit, Nervosität, Aggressivität, Zähneknirschen, Tremor), Bewegungsstörungen (Ataxien, Hypermetrie der Nachhand, Festliegen), Sensibilitätsstörungen (Überempfindlichkeit auf Licht, Lärm, Berührung) und langsame Abmagerung sowie durch einen langsamen Rückgang der Milchleistung gekennzeichnet (BRAUN et al. 1997).

BRUCE et al. (1994) infizierten RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäuse mit verschiedenen BSE-Isolaten. Dabei waren die Inkubationszeiten, Histopathologie und Läsionsprofile sehr ähnlich und deuteten darauf hin, dass es sich bei dem BSE-Erreger um einen einzigen Stamm handelt. In Italien, Frankreich, Belgien, Japan und Deutschland wurden jedoch inzwischen auch atypische BSE-Fälle mit ungewöhnlichen proteinbiochemischen Eigenschaften beschrieben (YAMAKAWA et al. 2003, BIACABE et al. 2004, CASALONE et al. 2004, DE BOSSCHERE et al. 2004a, BUSCHMANN et al. 2006).

Nach dem Auftreten des ersten einheimischen BSE-Falls in Deutschland im November 2000 wurde ab Dezember 2000 die Schnelltest-Untersuchung aller über 30 Monate alten Schlachtrinder sowie aller über 24 Monate alten Risikotiere (gefallene, krank- oder notgeschlachtete sowie im Rahmen von Kohortentötungen euthanasierte Rinder) vorgeschrieben. Seit dem 1. Juli 2001 müssen laut der gesetzlichen Bestimmungen in der EU alle Schlachtrinder über 30 Monate sowie alle Risikotiere über 24 Monate mittels einem BSE-Schnelltest untersucht werden (VO (EG) Nr. 999/2001). Die in Deutschland seit Februar 2001 geltende weitere Absenkung des Testalters für Schlachtrinder auf 24 Monate wurde zum 28.6.2006 aufgehoben.

2.2.2 Scrapie

2.2.2.1 Geschichtlicher Überblick

Scrapie gilt als Prototyp der TSEn, da sie die am längsten bekannte TSE-Erkrankung darstellt. Scrapie kommt bei Schafen und Ziegen weltweit mit Ausnahme von Australien und Neuseeland vor. Die Erstbeschreibung datiert auf das Jahr 1732 (MCGOWAN 1922).

Der Name Scrapie kommt vom Englischen „to scrape“ – kratzen, da Pruritus eines der Hauptsymptome bei dieser Erkrankung ist. Die erkrankten Tiere scheuern und kratzen sich bis zum massiven Wollverlust. Aufgrund des mitunter auftretenden hypermetrischen Ganges bei den Tieren hat sich in Deutschland der Name Traberkrankheit etabliert. Dagegen hat sich im französischen Sprachgebrauch der Name ‚la tremblante‘ (frei übersetzt: Zitterkrankheit) eingebürgert. Erkrankte Schafe zeigen außerdem Verhaltensänderungen und Abmagerung, nach mehreren Wochen und Monaten kommt es zum Festliegen und Tod der Schafe.

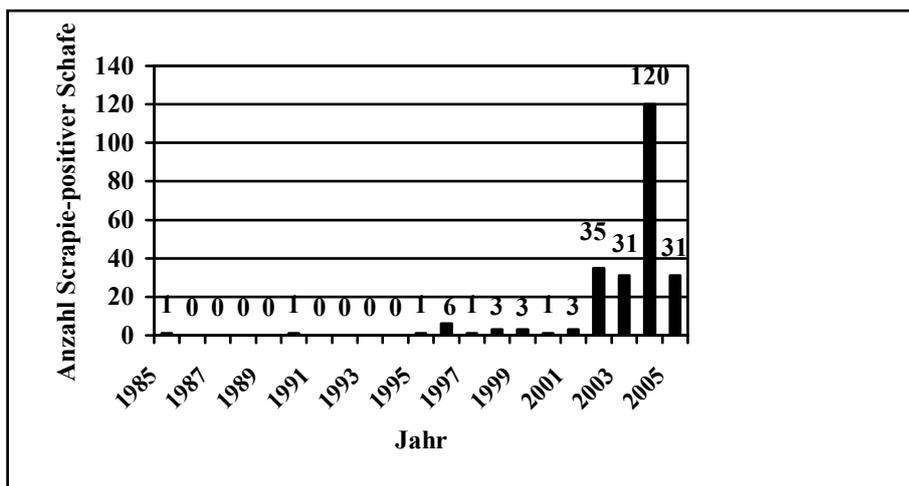


Abb. 2.4: Anzahl der Schafe pro Jahr, die in Deutschland seit 1985 positiv auf Scrapie getestet wurden. Seit Einführung der stichprobenartigen Testung von kleinen Wiederkäuern auf Scrapie nach der VO (EG) Nr. 999/2001 stieg die Anzahl der Scrapie-positiven Schafe stark an.

In Deutschland wurde Scrapie vor dem Zweiten Weltkrieg sehr häufig diagnostiziert. Dagegen trat Scrapie nach dem zweiten Weltkrieg bis 2001 nur sehr selten auf (Abb. 2.4). Seit der Einführung eines EU-weiten aktiven Überwachungsprogramms für Scrapie an geschlachteten und verendeten Schafen und Ziegen (VO (EG) Nr. 999/2001) mittels Schnelltests wurden auch in Deutschland deutlich mehr Scrapie-positive Schafe identifiziert. Dabei kamen neben Infektionen mit den klassischen Scrapieerregern auch Infektionen mit ungewöhnlichen Eigenschaften, sogenannte atypische Scrapiefälle, vor. Erstmals waren ähnliche Fälle 1998 in Norwegen gefunden worden (BENESTAD et al. 2003), und erhielten deshalb auch die Bezeichnung „Nor98“-Scrapie. Bei fast der Hälfte der 217 Scrapie-positiven Schafe, die im Zeitraum

2002 bis 2004 in Deutschland diagnostiziert wurden, handelt es sich um atypische Scrapiefälle. Bei der atypischen Scrapie ist meist nur ein Schaf pro Herde erkrankt, während bei klassischen Scrapie bis zu 50 Tiere und mehr betroffen sein können (Tab. 2.2).

Bis heute wurde in Deutschland noch kein Fall von Scrapie in einer Ziege nachgewiesen.

Tab. 2.2: Anzahl der Scrapieausbrüche und Anzahl der Scrapie-positiven Schafe, die seit Einführung des Überwachungsprogramms für Scrapie in Deutschland (2002) diagnostiziert wurden

	Klassische Scrapie		Atypische Scrapie		Gesamt	
	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe	Anzahl der Ausbrüche	Anzahl der Schafe
2002	4	26	9	9	13	35
2003	4	11	18	20	22	31
2004	6	78	37	42	43	120
2005	4	4	25	27	29	31
Gesamt	18	119	89	98	107	217

2.2.2.2 Genotyp-Empfänglichkeit

Der offene Leserahmen des Prionproteins beim Schaf kodiert für 256 Aminosäuren (GOLDMANN et al. 1990). Beim Schaf wurden bis heute 25 Polymorphismen im offenen Leserahmen des Prionproteins gefunden. Insgesamt sind 32 Aminosäureaustausche an diesen 25 Kodons bekannt, während die Anzahl der veröffentlichten Haplotypen 40 beträgt (GOLDMANN et al. 2005). Die Kodons 136, 154 und 171 haben beim Schaf Einfluß auf die Resistenz bzw. Empfänglichkeit gegenüber einer Scrapieinfektion (HUNTER 1997, DAWSON et al. 1998). Dabei handelt es sich um die Polymorphismen Valin (V) oder Alanin (A) am Kodon 136, Arginin (R) oder Histidin (H) am Kodon 154 und Arginin (R), Glutamin (Q) oder Histidin (H) am Kodon 171 (BAYLIS et al. 2004, BAYLIS u. GOLDMANN 2004). Von 12 möglichen Kombinationen dieser Polymorphismen kommen 5 gehäuft in der Schafpopulation vor: ARR, ARQ, AHQ, ARH und VRQ. Die Genotypen werden als Kurzform 136, 154, 171 mit der Buchstabenabkürzung für die Aminosäuren angegeben. Der Genotyp ARR galt dabei lange als hoch-resistent gegenüber einer Scrapieinfektion, während der Genotyp VRQ sehr empfänglich für eine Scrapieinfektion ist. Heute weiß man allerdings, dass die Resistenz des Genotyps ARR nur relativ ist und sich vorrangig auf eine Infektion mit klassischer Scrapie bezieht.

Die meisten anderen Polymorphismen wurden bei dem Haplotyp ARQ gefunden. Ob sie einen Einfluß auf die Scrapieempfänglichkeit haben, ist meist nicht bekannt. Eine partielle Resistenz gegenüber Scrapie scheint allerdings vorhanden zu sein, wenn Cystein (C) am

Kodon 151 bei isländischen Schafen (THORGEIRSDOTTIR et al. 1999) und Threonin (T) am Kodon 112 bei japanischen Suffolk- und Corriedaleschafen (IKEDA et al. 1995) auftritt. Bei Ziegen scheint Arginin (A) am Kodon 143 mit einer partiellen Resistenz einherzugehen (BILLINIS et al. 2002, 2004).

Die Genotypen haben auch einen Einfluß auf die Inkubationszeit nach einer Scrapieinfektion. Diese kann bei Schafen der hoch empfänglichen Genotypen wie VRQ, die mit einem hochinfektiösen Scrapiestamm infiziert wurden, nur wenige Monate betragen (ANDREOLETTI et al. 2000) oder mehrere Jahre bei Tieren mit weniger empfänglichen Genotypen, die mit einem weniger infektiösen Scrapiestamm infiziert wurden (GONZALEZ et al. 2002).

Die Empfänglichkeit für Scrapie ist weiterhin vom verwendeten Scrapiestamm und von der verwendeten Schafrasse abhängig (GOLDMANN et al. 1994, O'ROURKE et al. 1997, DAWSON et al. 1998). DIAZ et al. (2005) postulierten, dass die Scrapieempfänglichkeit neben den Polymorphismen des Prionproteins auch von weiteren Genen beeinflusst wird.

Tab. 2.3: Übersicht über die PrP-Genotypen bei Schafen und deren Empfänglichkeit bzw. Resistenz gegenüber einer Scrapieinfektion (DEFRA 2003)

Genotyp	Genotyp-klasse	Grad der Resistenz bzw. Empfänglichkeit für Scrapie
ARR / ARR	1	Schafe, die gegenüber einer Scrapieinfektion genetisch am meisten resistent sind.
ARR / AHQ ARR / ARH ARR / ARQ	2	Schafe sind genetisch resistent gegenüber einer Scrapieinfektion, die weitere Verwendung in Zuchtprogrammen sollte jedoch sorgfältig abgeschätzt werden.
AHQ / AHQ AHQ / ARH AHQ / ARQ ARH / ARH ARH / ARQ ARQ / ARQ	3	Schafe sind genetisch nur wenig resistent gegenüber einer Scrapieinfektion, die weitere Verwendung in Zuchtprogrammen sollte sorgfältig abgeschätzt werden.
ARR / VRQ	4	Schafe sind genetisch empfänglich gegenüber einer Scrapieinfektion und sollten für Zuchtprogramme nicht verwendet werden.
AHQ / VRQ ARH / VRQ ARQ / VRQ VRQ / VRQ	5	Schafe sind hoch empfänglich für Scrapie und sollten nicht für die Zucht verwendet werden.

MOUM et al. (2005) beschrieben ein gehäuftes Vorkommen von Phenylalanin (statt Leucin) am Kodon 141 bei Schafen mit atypischen Scrapiefällen. Schon 1996 wurde bei der Ziege nachgewiesen, dass die Methioninsubstitution am Kodon 142, welches dem Kodon 141 der Schafe entspricht, zu einer Verlängerung der Inkubationszeit bei experimentell mit BSE und Scrapie infizierten Ziegen führt (GOLDMANN et al. 1996). Für Ziegen sind bisher insgesamt sechs Polymorphismen bekannt (KUROSAKI et al. 2005).

Die Genotypen, die mit einer unterschiedlichen Empfänglichkeit einhergehen, werden in fünf verschiedene Risikoklassen eingeteilt (Tab. 2.3) (DAWSON et al. 1998, DEFRA 2003). Diese wurden zunächst als Grundlage für die Etablierung von Zuchtprogrammen auf Scrapiereistenz in zahlreichen europäischen Ländern verwendet (u.a. England, Niederlande, Frankreich) (BUSCHMANN u. GROSCHUP 2005a). Durch diese Zuchtprogramme soll die Frequenz des ARR-Allels gesteigert und die Häufigkeit des VRQ-Allels verringert werden (EGLIN et al. 2005).

Schafe, die homozygot bezüglich des ARR-Genotyps sind, galten lange als Scrapie-resistent (HUNTER 1997). Inzwischen wurde sowohl die experimentelle Infektion solcher Schafe mit dem BSE-Erreger (HOUSTON et al. 2003), als auch die natürliche Infektion solcher Schafe mit der atypischen Scrapieform (BUSCHMANN et al. 2004b, DE BOSSCHERE et al. 2005) nachgewiesen. MCCUTCHEON et al. (2005) konnten zeigen, dass bei dem Genotyp ARR/VRQ nach einer Scrapieinfektion deutlich weniger PrP^{Sc} im Gehirn abgelagert wird als bei dem Genotyp VRQ/VRQ. Dass die verschiedenen Genotypen einen Einfluss auf die Ausbreitung und Verteilung des Erregers im Schaf haben, stellten auch ERSDAL et al. (2005) fest: Die Ausbreitung verlief in den Schafen mit dem Genotyp VRQ/ARQ wesentlich langsamer und die Akkumulation von PrP^{Sc} war in peripheren Geweben deutlich geringer als bei Schafen mit dem Genotyp VRQ/VRQ. Während bei Scrapie-infizierten Schafen mit dem homozygoten Genotyp VRQ PrP^{Sc} im enterischen Nervensystem (ENS) vom Ösophagus bis zum Rektum nachgewiesen werden konnte, trat es bei Schafen mit dem Genotyp VRQ/ARQ nur von den Vormägen bis zum Rektum, nicht aber im Ösophagus auf (VAN KEULEN et al. 1999). Bei Schafen mit klinischer Scrapie, die den homozygoten Genotyp VRQ/VRQ tragen, kamen PrP^{Sc}-Ablagerungen sowohl im lymphoretikulären Gewebe als auch im ZNS vor, wogegen PrP^{Sc}-Ablagerungen bei Schafen mit dem Genotyp VRQ/ARR auf das ZNS beschränkt waren (VAN KEULEN et al. 1996, SCHREUDER et al. 1998, ANDREOLETTI et al. 2000). Fasst man die Ergebnisse dieser drei Publikationen zusammen, kann man davon ausgehen, dass Schafe, welche Träger des PrP-Allels ARR sind, PrP^{Sc} nicht im lymphoretikulären Gewebe akkumulieren.

Die Empfänglichkeit dieser Schafe für den BSE-Erreger scheint trotz allem wesentlich geringer zu sein als die von Schafen mit hoch-empfindlichem Genotyp. Bis auf IKEDA et al. (1995) handelt es sich bei den beschriebenen Scrapieausbrüchen mit Schafen, die den homozygoten ARR-Genotyp tragen, um atypische Scrapiefälle und bei diesem einen Fall war kein Material für weiterführende Untersuchungen vorhanden, so dass man nicht mehr nachvollziehen kann, ob es sich dabei um ein klassisches oder einen atypisches Scrapieisolat handelte. Da die atypischen Scrapiefälle vermehrt mit Genotypen assoziiert sind, die bisher als wenig oder gar unempfindlich gegenüber einer Scrapieinfektion galten, stellt sich die Frage, ob man mit den Scrapieresistenzzuchtprogrammen nicht Schafe selektiert, die zwar für klassische Scrapie weniger empfindlich sind, aber für atypische Scrapie empfindlich sind. Weiterhin könnte es sein, dass solche als resistent geltenden Schafe längere Inkubationszeiten bei einer Infektion aufweisen oder die Infektion gar unbemerkt bleibt (BUSCHMANN u. GROSCHUP 2005a). Da diese Schafe aber weniger empfindlich gegenüber einer BSE-Infektion sind, sieht man die Scrapieresistenzzuchtprogramme weiterhin als gerechtfertigt an.

2.2.2.3 Übertragbarkeit

Der Scrapieerreger kann sowohl vertikal als auch horizontal übertragen werden.

Ob es sich bei der vertikalen Übertragung um eine direkte Infektion des Embryos im Uterus oder um eine perinatale Infektion des Jungtieres handelt, steht noch nicht mit Sicherheit fest. Eine mögliche maternale Übertragung von Scrapie wurde schon vor drei Jahrzehnten nachgewiesen (PATTISON et al. 1972, DICKINSON et al. 1974, PATTISON et al. 1974). Nachkommen Scrapie-infizierter Schafe besitzen ein höheres Risiko, an Scrapie zu erkranken, als Nachkommen nicht erkrankter Schafe (DETWILER 1992, HOINVILLE 1996). Der Nachweis von PrP^{Sc} in der Plazenta Scrapie-infizierter Schafe (ONODERA et al. 1993, RACE et al. 1998, ANDREOLETTI et al. 2002) scheint eine maternale Übertragung zu bestätigen. Die Plazenta wurde bisher als einzige Quelle für die Ausscheidung von PrP^{Sc} bei Schafen beschrieben (RYDER et al. 2004). Das PrP^{Sc} ist vor allem in fetalen Trophoblasten der Kotyledonen zu finden (ANDREOLETTI et al. 2002, CAPLAZI et al. 2004). Die Akkumulation von PrP^{Sc} in der Plazenta ist auch vom Genotyp des Embryos abhängig: Nur bei Embryos mit hoch empfindlichen Genotypen wurde PrP^{Sc} in der Plazenta gefunden (TUO et al. 2001, ANDREOLETTI et al. 2002, TUO et al. 2002). Eine Infektion des Embryos im Uterus konnte noch nicht nachgewiesen werden (FOOTE et al. 1993, TUO et al. 2001, WANG et al. 2001, 2002). Im Rahmen anderer dazu durchgeführten Studien mit gegensätzlichen Ergebnissen konnte im Nachhinein aufgrund der verwendeten Schafe und der Versuchsbedingungen eine laterale Kontamination nicht vollständig ausgeschlossen werden (FOSTER et al. 1992, 1996b,

1999). Insgesamt wird die peri- oder postnatale Infektion des Jungtieres als der wahrscheinlichere Übertragungsweg gegenüber einer intrauterinen Infektion angesehen (ANDREOLETTI et al. 2002).

Von größerer Bedeutung scheint jedoch die horizontale Übertragung durch Scrapie-Kontaminationen in der Umwelt oder durch direkten Kontakt von Tier zu Tier zu sein (PATTISON et al. 1972, 1974, HADLOW et al. 1982). Durch die infektiöse Plazenta erfolgt eine Kontamination der Weiden, durch die hohe Stabilität des Erregers bleibt dieser jahrelang in der Umgebung persistent. Sowohl Jungtiere als auch adulte Tiere können sich so infizieren (SIGURDARSON 1991), wobei die Empfänglichkeit von Jungtieren im Alter von unter sechs Monaten höher zu sein scheint. Das Risiko, an Scrapie zu erkranken, steigt, je länger Lämmer in einer kontaminierten Umgebung gehalten wurden (HOURRIGAN u. KLINGSPORN 1996). TOUZEAU et al. (2006) stellten eine gesteigerte Übertragung von Scrapie während der Ablammzeit fest.

Zusammenfassend wird angenommen, dass die größte Bedeutung für die Ausbreitung des Scrapieerregers innerhalb einer Herde die horizontale Übertragung darstellt (RYDER et al. 2004, EVONIUK et al. 2005), während die vertikale Übertragung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (REDMAN et al. 2002).

2.2.2.4 Pathogenese und Histopathologie

Die Pathogenese von Scrapie beim Schaf kann man in drei Stadien unterteilen: In der ersten Phase erfolgt die Invasion des darmassoziierten Lymphgewebes (GALT – gut associated lymphoid tissue). Danach breitet sich der Erreger im nicht-darmassoziierten Lymphgewebe aus. Die Neuroinvasion des peripheren (PNS) und zentralen Nervensystems (ZNS) stellt die dritte Phase der Pathogenese dar (HADLOW et al. 1979, 1982, VAN KEULEN et al. 1995, 1999, 2000, 2002).

Nach der oralen Aufnahme des Scrapieerregers kann dieser in den Tonsillen des Rachenraumes und in den Peyerschen Platten des kaudalen Jejunums und Ileums nachgewiesen werden, welche zum darmassoziierten Lymphgewebe gehören (SCHREUDER et al. 1998, HEGGEBE et al. 2000, PRINZ et al. 2003). Zu diesem Zeitpunkt ist PrP^{Sc} auch in den zu diesen Gebieten gehörenden Lymphknoten, d.h. in den medialen Retropharyngeallymphknoten und Mesenteriallymphknoten, vorhanden (ANDREOLETTI et al. 2000, VAN KEULEN et al. 2002). Über im Darmepithel lokalisierte membranöse epitheliale Zellen (M-Zellen) erfolgt vermutlich die Erregeraufnahme, über dendritische Zellen und Makrophagen der Transport in das darunterliegende Lymphgewebe der Peyerschen Platten (VAN KEULEN et al. 1996,

ANDREOLETTI et al. 2000, AUCOUTURIER et al. 2001, PRINZ et al. 2002, UNTERBERGER et al. 2005). Diese Zelltypen könnten auch für die sich anschließende Verbreitung des Erregers im nicht-darmassoziierten Lymphgewebe verantwortlich sein (JEFFREY et al. 2000, 2001a, UNTERBERGER et al. 2005). In der Milz und in Lymphknoten spielen vor allem follikulär dendritische Zellen eine Rolle (PRESS et al. 2004). Die Ausbreitung und Vermehrung des Erregers im Darm und im Lymphgewebe dauert je nach Genotyp des betroffenen Tieres mehrere Monate bis Jahre, bevor das zentrale Nervensystem (ZNS) erreicht wird (DETWILER u. BAYLIS 2003). Die Neuroinvasion hat ihren Ursprung im enterischen Nervensystem und erfolgt vermutlich über die Intramuralganglien und über den Nervus vagus und den Nervus splanchnicus (KIMBERLIN u. Walker 1980, 1982, BALDAUF et al. 1997, VAN KEULEN et al. 2000, MCBRIDE et al. 2001, ERSDAL et al. 2003). Die Ausbreitung geschieht retrograd über efferente parasymphatische und sympathische Nervenfasern, die den Darm innervieren, und erreicht schließlich das dorsale Motorneuron des Nervus vagus (DMNV) in der Medulla oblongata und die intermediolaterale Säule der thorakalen Rückenmarksegmente.

Neben dieser Infektionsroute in das ZNS werden weitere Infektionswege diskutiert. Zum einen kann die Neuroinvasion auch über andere periphere Nerven als den oben genannten erfolgen; nach der erfolgreichen Übertragung von TSEn auf Schafe mittels Bluttransfusion (HUNTER et al. 2002) wird auch eine hämatogene Infektion über Blutlymphozyten nicht ausgeschlossen.

Bei Schafen haben außerdem sowohl der Genotyp des Schafes als auch der verwendete Erregerstamm Einfluß auf die Pathogenese (ANDREOLETTI et al. 2000, ERSDAL et al. 2003, HEGGEBE et al. 2003, ERSDAL et al. 2005).

Die Histopathologie ist durch charakteristische spongiforme Degenerationen (Vakuolisierung), Mikrogliaaktivierung, Astrozytose und Degeneration von Nervenzellen gekennzeichnet. Außerdem sind mittels immunhistochemischer Methoden PrP^{Sc}-Ablagerung im lymphatischen Gewebe und im Nervengewebe nachweisbar.

2.2.2.5 Atypische Scrapie

Klinisch sind an atypischer Scrapie erkrankte Schafe entweder unauffällig oder zeigen Gewichtsverlust, Schreckhaftigkeit und progressive Ataxien. Pruritus und Wollverlust wie bei der klassischen Scrapie werden selten beobachtet (BENESTAD et al. 2003). Atypische Scrapiefälle zeigen ungewöhnliche proteinbiochemische und histopathologische Eigenschaften. Nach der Veröffentlichung des ersten norwegischen Falles (BENESTAD et al. 2003) wurden

ähnliche Fälle in Deutschland und Frankreich (BUSCHMANN et al. 2004a), Schweden (GAVIER-WIDEN et al. 2004), Irland (ONNASCH et al. 2004), Portugal (ORGE et al. 2004), Belgien (DE BOSSCHERE et al. 2004b, 2005), Großbritannien (EVEREST et al. 2006) und auf den Falkland-Inseln (EPSTEIN et al. 2005) nachgewiesen.

In Deutschland handelt es sich bei 40 % aller diagnostizierten Scrapiefälle und bei mehr als 80 % der betroffenen Herden um atypische Scrapie (GRETZSCHEL et al. 2005). Bei diesem Scrapietyp ist die Ablagerung von PrP^{Sc} und die Vakuolisierung vor allem im Kleinhirn und Großhirn zu finden, weniger im Bereich des Obex wie bei der klassischen Scrapie. Im Western Blot findet man anstelle der drei typischen PrP^{Sc}-Banden im Fall der klassischen Scrapie mindestens drei undeutlich voneinander abgegrenzte Banden sowie eine zusätzliche Bande mit einer molekularen Masse von etwa 11 kDa. Das PrP^{Sc} der atypischen Scrapieisolate hat eine geringere Stabilität gegenüber Proteinase K als das PrP^{Sc} der klassischen Scrapie. Die Inzidenz in betroffenen Herden ist niedriger als bei der klassischen Scrapie.

Wegen der geringen Inzidenz in den betroffenen Herden stellte sich anfangs die Frage, ob es sich überhaupt um einen infektiösen Erreger handelt. Inzwischen konnte die Übertragbarkeit norwegischer und französischer atypischer Scrapieisolate im transgenen Mausmodell gezeigt werden (LE DUR et al. 2005) und durch die am FLI durchgeführten Versuche konnte diese Annahme sowohl für die deutschen atypischen Scrapieisolate im Rahmen der vorliegenden Arbeit als auch für die norwegischen atypischen Scrapieisolate (Anne Buschmann, pers. Mitteilung, Insel Riems, 27.02.2006) bestätigt werden.

Atypische Scrapiefälle treten auch vermehrt bei Schafen mit Genotypen auf, die als gering empfänglich oder gar resistent gegenüber einer Scrapieinfektion galten (BUSCHMANN et al. 2004b). Die Allele AHQ und ARR treten gehäuft auf.

Die atypischen Scrapie-Fälle werden nur von wenigen der zurzeit kommerziell vertriebenen Schnelltests sicher erkannt (BUSCHMANN et al. 2004a). Diese reagieren hoch-empfindlich auch bei geringgradigen PrP^{Sc}-Ablagerungen im Bereich der diagnostischen Obexprobe und arbeiten mit einer niedrigeren Proteinase K-Konzentration.

2.2.2.6 BSE beim Schaf

Schon 1993 konnte gezeigt werden, dass der BSE-Erreger experimentell nach intrazerebraler und oraler Infektion auf Schafe übertragen werden kann (FOSTER et al. 1993). Die Klinik war im Grunde nicht von der der klassischen Scrapie zu unterscheiden, auffällig war lediglich die sehr kurze Krankheitsdauer von 1 bis 5 Tagen (FOSTER et al. 2001a). Die Schafe zeigten Ataxien, Pruritus fehlte jedoch. Klinik und Inkubationszeiten scheinen in Abhängigkeit von

der verwendeten Schafrasse zu variieren: Bei experimentell mit BSE infizierten einheimischen Schafrassen in Frankreich stellten BARON et al. (2000) intensiven Pruritus, Wollverlust, Ataxien und Abmagerung fest, die Krankheitsdauer betrug 3 Monate. Bei einem ähnlichen Versuch in den Niederlanden betrug die Krankheitsdauer mehrere Wochen (THURING 2002). Die kürzesten Inkubationszeiten hatten Schafe mit den Genotypen ARQ/ARQ und AHQ/AHQ (SCHREUDER u. SOMERVILLE 2003). Die experimentelle intrazerebrale Infektion von den als Scrapie-resistent geltenden Schafen mit dem Genotyp ARR/ARR wurde 2003 nachgewiesen (HOUSTON et al. 2003). Für zahlreiche Schafrassen wurde eine experimentelle Empfänglichkeit für eine Infektion mit dem BSE-Erreger nachgewiesen: Cheviot, Romney, Suffolk, Lacaune, Texel, Poll Dorset (SCHREUDER u. SOMERVILLE 2003, GONZALEZ et al. 2005a). Für andere Rassen muss ebenfalls eine solche Empfänglichkeit vermutet werden.

Die Pathogenese und Ausbreitung des BSE-Erregers beim experimentell BSE-infizierten Schaf scheint der klassischen Scrapie ähnlicher zu sein als die bei der BSE beim Rind (FOSTER et al. 2001b, JEFFREY et al. 2001a). BSE-Infektiosität wurde bei Schafen ähnlich wie bei der klassischen Scrapie nicht nur im zentralen und peripheren Nervensystem, sondern auch im lymphoretikulären System (Peyersche Platten, Milz, Leber, distales Ileum, Mesenteriallymphknoten, Tonsillen u.a.) gefunden (FOSTER et al. 1996a, FOSTER et al. 2001a, 2001b, BELLWORTHY et al. 2005a).

Während die klassische Scrapie maternal übertragbar zu sein scheint (DICKINSON et al. 1974) und der Scrapieerreger bei Scrapie-infizierten Schafen in der Plazenta nachweisbar ist (RACE et al. 1998, ANDREOLETTI et al. 2002), fand man bei BSE-infizierten Schafen weder im plazentaren Gewebe noch in Gehirn oder Milz des Embryos PrP^{Sc}-Ablagerungen (FOSTER et al. 1999). FOSTER et al. (2004) ziehen aus maternalen Übertragungsversuchen bei BSE-infizierten Schafen den Schluss, dass eine maternale Übertragung, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Frequenz auftreten würde. BELLWORTHY et al. (2005b) veröffentlichten die erste natürliche Übertragung des BSE-Erregers innerhalb einer Schafherde, die mit BSE experimentell infiziert worden war. Es bleibt allerdings abzuklären, ob diese Infektionen während der Trächtigkeit oder, vergleichbar zum Geschehen in Scrapie-infizierten Schafherden, perinatal stattfanden.

Die Übertragung des BSE-Erregers durch Bluttransfusion von BSE-infizierten Schafen auf andere Schafe ist ebenfalls möglich (HOUSTON et al. 2000, HUNTER et al. 2002, 2003).

Nachdem die Übertragbarkeit des BSE-Erregers auf Schafe experimentell nachgewiesen

worden war und die Verfütterung von TSE-kontaminiertem Tiermehl an Schafe nicht ausgeschlossen werden konnte, beschäftigten sich zahlreiche Veröffentlichungen mit der Berechnung des Risikos einer BSE-Epidemie innerhalb der britischen Schafpopulation und des Risikos für die menschliche Nahrungsmittelkette (FERGUSON et al. 2002, KAO et al. 2002, 2003).

GRAVENOR et al. (2003) schätzten die Möglichkeit einer natürlichen BSE-Infektion im Schaf als sehr gering ein.

2005 wurde der erste Fall einer natürlichen Übertragung des BSE-Erregers auf einen kleinen Wiederkäuer veröffentlicht (ELOIT et al. 2005). Die Ziege wurde 2002 in Frankreich geschlachtet und in einem Schnelltest positiv auf Scrapie getestet. Die restlichen 310 Ziegen der Herde wurden gekeult, aber weder im Gehirn noch im Lymphgewebe konnte PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Gehirnhomogenat dieser Ziege wurde in transgene und konventionelle Mäuse inokuliert. Diese Mäuse erkrankten und wiesen im Gehirn spongiforme Veränderungen und Ablagerungen des pathologischen Prionproteins auf, die sich histopathologisch bzw. biochemisch nicht von denen bei BSE-infizierten Mäusen unterscheiden ließen. Nach der Bekanntgabe dieses Befundes wurde über eine zweite Ziege berichtet, die 1990 in Großbritannien als TSE-positiv getestet wurde und bei der ebenfalls der Verdacht auf BSE besteht. Die Auswertung der Übertragungsversuche dieses zweiten Falles auf Mäuse bleibt abzuwarten (DEFRA 2005a).

2.2.2.7 Diagnostik bei Scrapie in der EU und Deutschland

Um die wahre Inzidenz von TSE-Erkrankungen bei kleinen Wiederkäuern abzuschätzen, müssen über 18 Monate alte Schafe und Ziegen in allen EU-Mitgliedsstaaten seit 2002 stichprobenartig mittels TSE-Schnelltests untersucht werden (Verordnung (EG) 999/2001). Bezogen auf Deutschland sollten anfangs 60.000 geschlachtete und 6.000 verendete Schafe und Ziegen pro Jahr untersucht werden. Da die geforderte Zahl der Schlachtieruntersuchungen nicht erreicht wurde, ist seit Januar 2004 die Untersuchung von jährlich 10.000 geschlachteten und 10.000 verendeten Schafen und Ziegen vorgeschrieben. Hierzu wird aus dem Bereich des Obex eine Probe entnommen und in einem TSE-Schnelltest an einem privaten oder staatlichen Untersuchungsamt auf PrP^{Sc} untersucht (GROSCHUP u. STOLZE 2002, BUSCHMANN et al. 2004c, BUSCHMANN u. GROSCHUP 2005a).

Die im Schnelltest reaktiven Proben müssen zur abschließenden Bestätigung an das Nationale Referenzlabor (NRL) für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT) am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems

zur weiteren diagnostischen Abklärung eingesandt werden. Als Bestätigungsmethoden nach der OIE (ANONYM 2004) gelten:

1. Immunhistologischer Nachweis von PrP^{Sc} im Obex
2. Immunochemische Detektion von PrP^{Sc} im Obex
3. Nachweis Scrapie-assoziiierter Fibrillen (SAF) im Elektronenmikroskop.

Seit dem 14.01.2005 muss bei allen bei Schafen und Ziegen festgestellten TSE-Fällen ein differentialdiagnostischer Test zur Unterscheidung von BSE und Scrapie durchgeführt werden (VO (EG) Nr. 36/2005 zur Änderung der VO (EG) Nr. 999/2001). In der EU sind fünf solcher Differenzierungstests zugelassen, drei Western Blots, ein ELISA und eine immunhistologische Differenzierung. Der im Rahmen dieser Dissertation etablierte FLI-Test (GRETZSCHEL et al. 2005) wurde als einer dieser Differenzierungstests zertifiziert und hat zwei Ringtests, die vom Referenzlabor für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien der EU (Community Reference Laboratory, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Großbritannien) durchgeführt wurden, im Januar und November 2005 bestanden.

2.2.2.8 Schnellteste und Lebendteste

In Deutschland sind gegenwärtig (Stand: 13.01.2006) fünf Schnellteste zur Diagnose von TSE-Infektionen beim Schaf zugelassen: der BioRad TeSeE (ELISA, BioRad; früher: BioRad Platelia), der Prionics Check Western (Western blot, Prionics AG), der Prionics Check LIA (ELISA, Prionics AG), der Enfer Test (ELISA, Enfer) (MOYNAGH u. SCHIMMEL 1999, SCHALLER et al. 1999, OESCH et al. 2000, COOLEY et al. 2001, BIFFIGER et al. 2002) und der IDEXX HerdCheck Test (IDEXX, Schiphol, Niederlande). Bis auf den IDEXX HerdCheck Test, der auf eine spezifische Bindung von PrP^{Sc} an einen Seprion-Liganden basiert, beruhen alle bisherigen Tests auf dem Nachweis des Proteinase K-resistenten Teils des PrP^{Sc} nach PK-Verdau mit PrP-spezifischen Antikörpern.

Für die Untersuchung von Rindern auf BSE sind in Deutschland zudem noch der BetaPrion BSE EIA Test (AJ Roboscreen, Leipzig), der Prionics Check PrioSTRIP (Prionics AG, Schlieren, Schweiz) und der PrionScreen Test (Roche, Penzberg) zugelassen.

Ein Problem bei der Diagnose der Scrapie stellen die sogenannten atypischen Scrapiefälle dar. Sie werden nicht von allen Schnelltesten gleich gut erkannt (BUSCHMANN et al. 2004a), da das dabei gebildete PrP^{Sc} wesentlich weniger PK-resistent ist und vorwiegend im Klein- und Großhirn und nicht im Hirnstamm abgelagert wird. Vor diesem Hintergrund erkennen nur wenige TSE-Schnelltests atypische Scrapiefälle anhand von Obexproben mit hinreichender

Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit. Alle Schnelltests basieren auf dem postmortalen Nachweis des PrP^{Sc}. Da bei der Scrapie im Schaf das lymphoretikuläre Gewebe sehr zeitig in die Pathogenese involviert ist, kann am lebenden Schaf eine präklinische Diagnose immunhistologisch durch Biopsien aus dem dritten Augenlid, den Tonsillen oder der rektalen Mukosa gestellt werden (SCHREUDER et al. 1996, 1997, 1998, O'Rourke et al. 1998a, 2000, JEFFREY et al. 2001c, O'Rourke et al. 2002, GONZALEZ et al. 2005b). Allerdings ist hierbei nur ein positives Ergebnis beweisend, da bei Schafen genetische Faktoren die lymphatische PrP^{Sc}-Bildung beeinflussen, so dass ein negatives Untersuchungsergebnis bei Schafen bestimmter Genotypen eine TSE-Infektion nicht ausschließen kann.

Die Übertragung der TSEn über die Blutbahn konnte sowohl für die iatrogene Form der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung als auch für BSE beim Schaf nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis von PrP^{Sc} im Blut war aufgrund der fehlenden Sensitivität der bisher verfügbaren Testmethoden nicht möglich. CASTILLA et al. (2005a) konnten mittels der PMCA erstmals PrP^{Sc} im Blut infizierter Hamster nachweisen.

2.3 TSE-Erregerstämme

Bei den TSE-Erregern sind Stammvariationen nachweisbar, obwohl die Aminosäuresequenz des pathologischen Prionproteins identisch ist. TSE-Erregerstämme können anhand verschiedener Eigenschaften voneinander abgegrenzt werden. Bei der klassischen Stammdifferenzierung („straintyping“) werden die Erreger auf Mäuse verschiedener Inzuchtlinien übertragen (BRUCE et al. 1992). Die dabei ermittelten Inkubationszeiten und die neuropathologischen Veränderungen, die in Form sogenannter Läsionsprofile dargestellt werden, gelten als Grundlage für die TSE-Stammcharakterisierung (BRUCE 2003). Da dieser Mausbioassay aber sehr zeit- und arbeitsaufwändig ist und eine sehr große Anzahl von Versuchstieren erfordert, ist man in den letzten Jahren vermehrt dazu übergegangen, die Stammcharakterisierung anhand immunbiochemischer Eigenschaften des PrP^{Sc} durchzuführen.

Die molekulare Grundlage für diese Erregerstämme ist unbekannt. Es wird vermutet, dass diese in der unterschiedlichen Konformation des PrP^{Sc} begründet sein könnten, aber auch die Glykosylierung (HILL u. COLLINGE 2004, NEUENDORF et al. 2005) oder das Vorkommens eines sog. „Faktors X“ oder einer Nukleinsäure könnten eine Rolle spielen.

Dass die Konformation des Prionproteins die Basis für die Stammvariation darstellt, wurde inzwischen formal an Hefepriionen nachgewiesen (KING u. DIAZ-AVALOS 2004, TANAKA et al. 2004, TELLING 2004, KRISHNAN u. LINDQUIST 2005). Beim Prionprotein von Hefen scheint insbesondere die Länge des amyloiden Kerns und die Art der intermo-

lekularen Verbindungen die strukturelle Grundlage der verschiedenen TSE-Stämme darzustellen.

Bei Scrapie wurden bisher mehr als 20 verschiedene Stämme beschrieben (BRUCE 1996, BRUCE et al. 2002). Bei BSE, der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, bei der FSE und der TSE der exotischen Huftiere schien es sich jedoch lange Zeit um einen einzigen Stamm zu handeln (FRASER et al. 1992, BRUCE et al. 1994, FRASER et al. 1994, BRUCE et al. 1997, BRUCE 2000). Die kürzlich beschriebenen atypischen BSE-Fälle zeigen jedoch, dass es auch hier unterschiedliche Stämme zu geben scheint.

Bei natürlichen TSE-Isolaten kann es sich auch um eine Mischung verschiedener Stämme handeln.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Charakteristika der TSE-Stämme unter besonderer Berücksichtigung der Differenzierung zwischen BSE und Scrapie beim Schaf erläutert.

2.3.1 Mausbioassay

Im Mausbioassay werden die Klinik, die Inkubationszeiten und die Übertragbarkeit verschiedener TSE-Stämme ermittelt.

2.3.1.1 Klinik

Dass verschiedene TSE-Erregerstämme mit verschiedenen klinischen Symptomen einhergehen können, beschrieben PATTISON und MILLSON (1961) schon im Jahre 1961. Sie inokulierten Ziegen mit dem Gehirnhomogenat eines an Scrapie erkrankten Schafes. Nach einer Inkubationszeit von 43 Monaten erkrankte die Mehrzahl der Ziegen. Interessanterweise zeigten die Ziegen zwei deutlich voneinander abgrenzbare Krankheitsbilder, das „Drowsy“-Syndrom (schläfrig) und das „Scratching“-Syndrom (kratzen). Wurde Gehirnmaterial dieser Ziegen zur Inokulation weiterer Ziegen benutzt, so zeigten auch sie die unterschiedlichen klinischen Symptome, in Abhängigkeit davon, ob sie mit Gehirn der „Drowsy“- oder „Scratching“-Ziegen infiziert waren.

Auch TME-Stämme können anhand der klinischen Symptomatik im Hamster unterschieden werden: der „Hyper“-Stamm führt zu Übererregung und zerebellärer Ataxie, während der „Drowsy“-Stamm durch Lethargie und Ataxie gekennzeichnet ist (BESSEN u. MARSH 1992a, 1992b, 1994).

Daneben kommt es bei der Infektion von Mäusen mit dem Scrapestamm Me7 und von Hamstern mit dem Scrapestamm 139H anders als bei allen anderen Stämmen zur Gewichtszunahme.

me und zu Störungen des Glukosestoffwechsels (CARP et al. 1984, 1989, 1997, 1998, KIM et al. 1987, 1988).

2.3.1.2 Inkubationszeit

Die Inkubationszeit ist neben dem verwendeten TSE-Stamm auch vom Genotyp des Wirtstieres sowie von der Infektionsroute und der Dosis abhängig.

Bei der Erstübertragung eines TSE-Isolates auf Mäuse ist die Übertragungsrate oft sehr gering und die Inkubationszeiten sind sehr lang und weit gestreut. Die Inkubationszeit kann sogar länger sein als die Lebenserwartung der Maus (BRUCE 1996). Während der folgenden Subpassagen verkürzt sich die Inkubationszeit zumeist deutlich und stabilisiert sich nach einigen Passagen, bis der Standardfehler der Inkubationszeiten unter 2 % beträgt.

Bei Mäusen sind die beiden für die Inkubationszeit bedeutsamen Polymorphismen an Kodon 108 (Phenylalanin im Austausch mit Leucin) und 189 (Threonin im Austausch mit Valin) des Mausprionproteingens lokalisiert. Sie werden als sinc^{s7} -Gen (scrapie **incubation gene, short incubation period**) oder prnp-a bzw. als sinc^{p7} -Gen (scrapie **incubation gene, prolonged incubation period**) oder prnp-b bezeichnet. Prnp-a kommt bei RIII- und C57Bl6-Mäusen, Prnp-b bei VM95-Mäusen vor. Zuerst wurden diese unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Inokulation des Scrapiestammes Me7 in die verschiedenen Mauslinien beobachtet (DICKINSON et al. 1968). Nachfolgende Experimente mit dem Scrapiestamm 22A führten zu einem reversen Verhalten. Dieser Stamm rief bei VM95-Mäusen eine verkürzte, bei RIII- und C57Bl6-Mäusen eine verlängerte Inkubationszeit hervor (DICKINSON u. MEIKLE 1971).

Jeder TSE-Stamm ruft ein charakteristisches und reproduzierbares Verhältnis der Inkubationszeiten in den drei möglichen Mausgenotypen (homozygot prnp-a , homozygot prnp-b oder heterozygot prnp-a/b) hervor. Die Inkubationszeit in den heterozygoten Mäusen (auch als F1-Kreuzung, z.B. zwischen VM95- und C57Bl6-Mäusen, bezeichnet) liegt oft zwischen den Inkubationszeiten des prnp-a und prnp-b Genotyps, manchmal ist sie auch länger als die längere der beiden Inkubationszeiten, aber sie ist niemals kürzer als eine der beiden Inkubationszeiten (BRUCE et al. 1991, BRUCE u. Fraser 1991).

RIII-Mäuse zeigten bei einer Erstinfektion mit BSE eine um etwa 100 Tage kürzere Inkubationszeit als C57Bl6-Mäuse. Als Ursache für diese verschiedenen Inkubationszeiten trotz gleichen genetischen Hintergrunds wird ein multigenetischer, PrP-unabhängiger Effekt angesehen (MANOLAKOU et al. 2001). Die Inkubationszeit bei einer BSE-Infektion der VM95/C57Bl6-Kreuzung lag bei deutlich mehr als 700 Tagen. Bei der Subpassage verkürzten sich die Inkubationszeiten und der Unterschied der Inkubationszeiten zwischen RIII- und

C57Bl6-Mäusen wurde reduziert. Bei der Subpassage von BSE aus VM95-Mäusen in VM95-Mäusen zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Inkubationszeit auf etwa 120 Tage (BRUCE 1993, BRUCE et al. 1994, 2002). Die auffallende Einheitlichkeit der Ergebnisse aus primären Übertragungen des BSE-Erregers auf Mäuse (BRUCE et al. 1994, 1997, 2002) galt als Beweis dafür, dass es sich bei dem BSE-Erreger um einen einzigen Stamm handelt. Ergebnisse aus Übertragungsversuchen atypischer BSE-Fälle auf Mäuse stehen derzeit noch aus, daher beziehen sich alle bisher verfügbaren Daten auf die Übertragung des klassischen BSE-Stamms. Im Gegensatz dazu variieren die Inkubationszeiten bei der Übertragung verschiedener Scrapieisolate deutlich und erst die Subpassagen führen zur Isolierung einer begrenzten Anzahl von Scrapiestämmen (BRUCE et al. 2002).

Inzwischen wurden bei der Maus zahlreiche andere genetische Loci beschrieben, die einen Einfluß auf die Inkubationszeit haben (STEPHENSON et al. 2000, LLOYD et al. 2001, MANOLAKOU et al. 2001).

2.3.1.3 Übertragbarkeit/ Speziesbarriere

Die Übertragbarkeit von TSE-Stämmen auf verschiedene Säugetierarten wird durch die Speziesbarriere begrenzt. Diese Speziesbarriere führt in den Empfängertieren zu längeren, weit gestreuten Inkubationszeiten, die länger als die normale Lebensdauer des Tieres sein können und zu verminderten Übertragungsraten. Weiterhin können die klinischen und histologischen Charakteristika des TSE-Stammes im Empfängertier verändert sein. Die Übertragbarkeit der TSEn ist konzentrationsabhängig; wird das Inokulat verdünnt, so nimmt die durchschnittliche Inkubationszeit zu und die Übertragungsrate nimmt ab. Nach der ersten Übertragung zwischen zwei Spezies kommt es in den folgenden Subpassagen zu einer Verkürzung der Inkubationszeit und zu einer Stabilisierung der klinischen und histologischen Stammcharakteristika. Die Abnahme der Inkubationszeit von der Erstinfektion zwischen zwei Spezies zu den folgenden Subpassagen innerhalb derselben Spezies wird oft als Maß für die Speziesbarriere genutzt. Es gibt aber auch Arten, bei denen die Speziesbarriere so groß ist, dass es nicht zu einer Übertragung von TSEn zwischen diesen zwei Arten kommt.

Eine Ursache für die Speziesbarriere wird in der Aminosäuresequenz des Prionproteins vermutet. Wenn das Prionprotein des Wirtes nicht in die Konformation des inokulierten Prions umgefaltet werden kann, so besteht eine Speziesbarriere. Eine Infektion findet jedoch statt, wenn die Umfaltung des Wirtsprions in die Konformation des inokulierten Prions ermöglicht wird. Die Speziesbarriere wird also durch den Grad der Übereinstimmung der Primärsequenzen, die die gleichen Konformationen in der Spender- und Empfängertierart ermöglichen,

bestimmt (COLLINGE 1999, HILL u. COLLINGE 2004).

Bei der Übertragung von TSE-Erregerstämmen spielen die Modelle der Adaptation und die der Selektion eine Rolle (BARTZ et al. 2000). Wird ein TSE-Stamm zwischen zwei Spezies übertragen, so kann das erregerspezifische PrP^{Sc} das wirtsspezifische PrP^C in mehr als eine stabile Konformation umfalten. Wie durch eine erregerspezifische PrP^{Sc}-Konformation mehrere neue Konformationen aus dem gleichen wirtsspezifischen PrP^C gebildet werden können, bleibt abzuklären. Die Selektion erfolgt innerhalb einer Spezies in Abhängigkeit von der Schnelligkeit der Erregervermehrung und von der Konzentration des eingesetzten Erregerstammes. Existieren innerhalb einer Spezies mehrere TSE-Stämme, so wird der Stamm, der kürzere Inkubationszeiten hervorruft, selektiert. Wird jedoch der TSE-Stamm, der längere Inkubationszeiten hervorruft, deutlich höher konzentriert eingesetzt, so kann sich dieser TSE-Stamm durchsetzen.

Natürlich vorkommende TSE-Isolate können eine Mischung mehrerer TSE-Stämme enthalten. Diese könne nach der Primärübertragung durch Subpassagen in Versuchstieren isoliert und stabilisiert werden. Über das Verhalten von Scrapie- und BSE-Erregern bei gleichzeitiger Infektion z.B. von Mäusen ist noch sehr wenig bekannt. Es scheint jedoch, dass der Scrapieerreger den BSE-Erreger maskiert, sogar wenn letzterer in höheren Konzentrationen eingesetzt wird (BARON u. BIACABE 2001).

2.3.1.4 Transgene Mäuse

In den letzten Jahren wurden vermehrt transgene Mäuse zur Charakterisierung bzw. Differenzierung von TSE-Stämmen sowie zum hochempfindlichen Nachweis von TSE-Erregern genutzt (BARON 2002, BARON et al. 2004). Hierzu zählen u.a. transgene Mäuse, die das ovine (CROZET et al. 2001a, VILOTTE et al. 2001), bovine (SCOTT et al. 1997, BUSCHMANN et al. 2000), humane (TELLING et al. 1994, COLLINGE et al. 1995) und murine (FISCHER et al. 1996) Prionprotein überexprimieren. Diese Mäuse zeigen im Gegensatz zu Wildtypmäusen eine stark verminderte Speziesbarriere: so sind Tgbov-Mäuse, die das Rinderprionprotein exprimieren, bis zu 10.000mal empfänglicher als RIII-Mäuse gegenüber einer BSE-Infektion (BUSCHMANN u. GROSCHUP 2005b). Bei den transgenen Mäusen, die das Schafprionprotein überexprimieren, wurden verschiedene Genotypen des Schafprionproteins als Transgen verwendet. Die am FLI entwickelten Tgshp-Mäuse tragen den Genotyp ARQ, während Tg338-Mäuse (VILOTTE et al. 2001, LAUDE et al. 2002, LE DUR et al. 2005) den Genotyp VRQ tragen.

2.3.2 Proteinbiochemie

Die proteinbiochemischen Charakteristika von TSE-Stämmen wurden zuerst vor allem an mauspassagierten TSE-Isolaten bestimmt. Inzwischen ist man dazu übergegangen, die Glykosylierungsverhältnisse, die Molekularmasse, die Immunoreaktivität und die Proteinase K-Stabilität direkt am Gewebe des TSE-infizierten Wirtes durchzuführen.

2.3.2.1 Glykosylierungsverhältnis

Das Glykosylierungsverhältnis stellt den Anteil der di-, mono- und unglykosylierten Bande des PrP^{Sc} am Gesamtsignal im Western Blot dar. KASCSAK et al. (1985) beschrieben erstmals, dass das Glykosylierungsverhältnis bei murinen Scrapiestämmen variiert. Solche Unterschiede im Glykosylierungsverhältnis wurden später auch bei anderen TSEn nachgewiesen (COLLINGE et al. 1996, PARCHI et al. 1997, SOMERVILLE et al. 1997, KUCZIUS et al. 1998, RACE et al. 2002, STACK et al. 2004).

Bei BSE im Rind und im Schaf ist aus noch unbekanntem Grund der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande höher als bei den allermeisten bisher untersuchten Scrapiestämmen. Dieser Unterschied wird zur Differenzierung zwischen BSE und Scrapie im Schaf genutzt (STACK et al. 2002, NONNO et al. 2003, LEZMI et al. 2004, THURING et al. 2004, GRETZSCHEL et al. 2005). Diese Stammeigenschaft bleibt auch bei Übertragungsversuchen auf Mäuse erhalten. Sowohl bei Wildtyp- als auch bei transgenen Mäusen, die das Schafprionprotein exprimieren, ist der Anteil des diglykosylierten PrP^{Sc} bei BSE-infizierten Mäusen deutlich höher als der Anteil des monoglykosylierten PrP^{Sc} im Gegensatz zu mit natürlichen Scrapieisolaten infizierten Mäusen (KUCZIUS et al. 1998, BARON et al. 2004).

Die Abgrenzung von BSE- und Scrapieinfektionen beim Schaf allein anhand der PrP^{Sc}-Glykosylierung ist nicht eindeutig (BARON et al. 1999, SWEENEY et al. 2000). Die Scrapieisolate können aber meist durch die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande von BSE abgegrenzt werden (BARON et al. 2000). Der Scrapiestamm CH1641 (HOPE et al. 1999) zeigt proteinbiochemisch ein nicht von BSE unterscheidbares Glykosylierungsverhältnis mit Dominanz der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande.

Fälle atypischer BSE in Frankreich, Italien und Deutschland (CASALONE et al. 2003, BIACABE et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2006) waren durch eine weniger deutliche bzw. fehlende Dominanz der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande gekennzeichnet. Auf das Glykosylierungsverhältnis haben neben dem verwendeten TSE-Stamm auch das betroffene Gewebe, die Gehirnregion und der Prionproteingenotyp einen Einfluß (HILL et al. 1999, SOMERVILLE 1999, SOMERVILLE et al. 2005, HILL et al. 2006). Ob dabei die in den verschiedenen Ge-

bieten vorkommenden Zelltypen oder gar die einzelnen Zellorganellen einen Einfluß haben, wird noch diskutiert (HILL u. COLLINGE 2004). Das Glykosylierungsverhältnis kann methodisch auch vom verwendeten Antikörper (SWEENEY et al. 2000, NONNO et al. 2003) und von der Aufreinigungsmethode beeinflusst werden.

2.3.2.2 Molekularmasse

Die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande nach einer Proteinase K-Behandlung wird ebenfalls zur Stammcharakterisierung verwendet. So lassen sich bei Nerzen zwei TME-Stämme – ‚Hyper‘ und ‚Drowsy‘ – sowohl klinisch als auch durch die Unterschiede in der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande unterscheiden: der ‚Hyper‘-Stamm zeigt im Western Blot eine etwa 2 kDa größere Molekularmasse als der ‚Drowsy‘-Stamm (BESSEN u. MARSH 1992a, 1994, BARTZ et al. 2000). Die Ursache für die unterschiedlichen Molekularmassen stellen die verschiedenen PK-Schnittstellen dar. Die genaue PK-Schnittstelle ist von der Konformation des PrP^{Sc} und somit vom verwendeten TSE-Stamm abhängig. Die PK-Schnittstelle bei mit BSE infizierten Mäusen liegt bei Aminosäureposition 96 bis 97, die PK-Schnittstelle bei Scrapie bei Aminosäureposition 81 bis 89 (HAYASHI et al. 2005). Sowohl in infizierten Mäusen und Schafen als auch in Rindern induziert der BSE-Erreger die Bildung von PrP^{Sc} mit einer niedrigeren Molekularmasse nach PK-Verdau als bei den meisten Scrapiestämmen (KUCZIUS et al. 1998, STACK et al. 2002, NONNO et al. 2003, BARON et al. 2004, LEZMI et al. 2004, THURING et al. 2004, GRETZSCHEL et al. 2005). Bei BSE-infizierten Schafen ist die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande sogar noch niedriger als die bei BSE im Rind. Zur besseren Darstellung dieser Unterschiede kann man die Proben einer Deglykosylierung unterziehen (NONNO et al. 2003).

Die zuletzt beschriebenen atypischen ‚L-type‘ BSE-Fälle im Rind weisen ebenfalls eine niedrigere Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande im Vergleich zum klassischen BSE-Stamm auf (CASALONE et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2006). Dagegen besaßen die atypischen ‚H-type‘ BSE-Fälle in Frankreich und Deutschland eine höhere Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande (BIACABE et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2006).

Auch der Scrapie-Stamm CH1641 zeigt eine dem BSE-Profil ähnliche Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande (HOPE et al. 1999).

Bei einigen Scrapieisolaten wurde das Auftreten von zwei unglykosylierten PrP^{Sc}-Banden beschrieben (SCHREUDER u. SOMERVILLE 2003, ZANUSSO et al. 2003).

2.3.2.3 Immunoreaktivität

Auch die unterschiedliche Immunoreaktivität des PrP^{Sc} ist ein Effekt der erregerspezifischen PK-Schnittstellen. Dies wurde zuerst an mauspassagierten BSE- und Scrapiestämmen mit dem PAK Ra10 und den MAKs 3B5, SAF15 und SAF32 beobachtet (GROSCHUP et al. 2000, BARON u. BIACABE 2001, BARON et al. 2004, JUNGHANS 2004). Der PAK Ra10 bindet im PK-resistenten Teil des PrP^{Sc}, er detektiert nach PK-Verdau sowohl das PrP^{Sc} von BSE als auch das PrP^{Sc} von Scrapie. Im Gegensatz dazu binden die MAKs aminoterminal von der PK-Schnittstelle, so dass sie nur das PrP^{Sc} von Scrapie erkennen. Der Genotyp bei Mäusen scheint jedoch einen Einfluß auf das gebildete PrP^{Sc} und somit auf die PK-Schnittstelle zu haben: Bei VM95-Mäusen kann eine Differenzierung zwischen BSE und Scrapie mit diesen Antikörpern nur bedingt durchgeführt werden, da hier BSE auch von den MAKs 3B5 und SAF32 erkannt wird, wenn auch nur schwach (JUNGHANS 2004).

Direkt am Schaf- und Rindermaterial wurde dieses Prinzip zuerst von STACK et al. (2002) für die Differenzierung von BSE und Scrapie genutzt. Als Antikörper, der im Bereich der PK-Schnittstelle bindet, wurde der monoklonale Antikörper (MAK) P4 verwendet, der Scrapie im Schaf sehr gut, ovine BSE nur sehr schwach und BSE im Rind gar nicht detektiert (Abb. 2.5). Für die Antikörper, die im Bereich des PK-resistenten PrP^{Sc} binden, wurden je nach Publikation verschiedene Antikörper verwendet, z.B. MAK 6H4 oder MAK L42 (LEZMI et al. 2004, THURING et al. 2004, GRETZSCHEL et al. 2005). Auch PrP^{Sc} der atypischen 'H-type' BSE-Fälle wird durch MAK P4 erkannt, aber nicht PrP^{Sc} aus den klassischen BSE-Isolaten oder vom Scrapiestamm CH1641 (STACK et al. 2002, BIACABE et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2006).

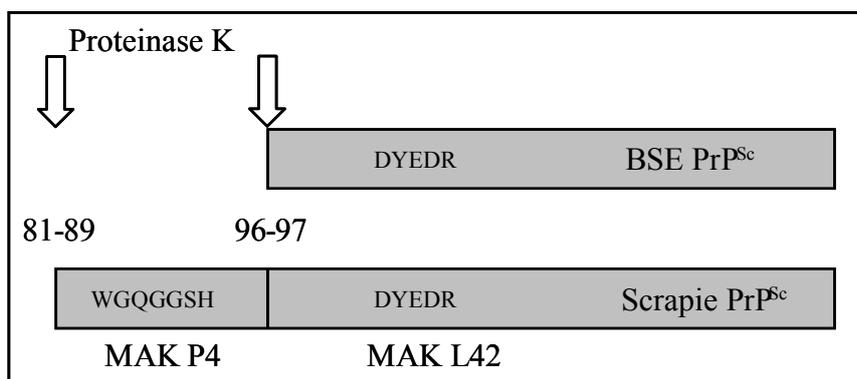


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen PK-Schnittstellen bei PrP^{Sc} von BSE und von Scrapie. Da die PK-Spaltstelle bei BSE weiter C-terminal liegt als bei Scrapie, detektieren Antikörper wie z.B. MAK P4, die im Bereich der PK-Schnittstelle binden, nach PK-Verdau noch das PrP^{Sc} von Scrapie, aber nicht mehr das PrP^{Sc} von BSE.

An transgenen Mäusen, die das Schafprionprotein exprimieren, konnte mit dem MAK P4 ebenfalls eine Differenzierung zwischen verschiedenen Scrapieisolaten und dem BSE-Erreger durchgeführt werden (BARON et al. 2004).

2.3.2.4 Proteinase-K-Stabilität

Die Stabilität gegenüber dem Verdau mit Proteinase K variiert bei den verschiedenen TSE-Stämmen. Das PrP^{Sc} von BSE ist viel sensitiver als das PrP^{Sc} der meisten Scrapiestämme. Die atypischen Scrapie-Fälle zeigen eine deutlich geringere PK-Stabilität als die klassischen Scrapiefälle (BUSCHMANN et al. 2004b). Die Unterschiede können einerseits durch einen Langzeit-PK-Verdau (KUCZIUS et al. 1998, JUNGHANS 2004) oder durch die Behandlung der Proben mit steigenden PK-Konzentrationen (LEZMI et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2004b) sichtbar gemacht werden.

2.3.3 Histopathologie

Charakteristisch für die TSEn sind die spongiformen Degenerationen im Gehirn, die histologisch als Vakuolisierung sichtbar sind. Daneben können Nervenzelldegenerationen, Gliose und das Vorkommen von Plaques beobachtet werden. Diese Eigenschaften unterscheiden sich bei den verschiedenen TSE-Stämmen und können so zu einer ersten Differenzierung von TSE-Stämmen genutzt werden. Eine entzündliche Immunantwort fehlt bei TSEn, auch wenn bei muriner Scrapie inzwischen eine abnorme Keimzentrumsreaktion in der Milz festgestellt werden konnte (MCGOVERN et al. 2004).

2.3.3.1 Läsionsprofil

TSE-Stämme können anhand des Grades und der Verteilung der Vakuolisierung im Gehirn unterschieden werden. Auf Basis einer semiquantitativen Beurteilung (Skala von 0-5) wird dabei der Grad der Vakuolisierung in neun Regionen der grauen Substanz und drei Regionen der weißen Substanz zur Erstellung sog. Läsionsprofile ermittelt (MOULD et al. 1967, FRASER u. DICKINSON 1968). Das Läsionsprofil wird neben dem verwendeten TSE-Stamm aber auch von Wirtsfaktoren, z.B. der verwendeten Mauslinie, beeinflusst. Diese Läsionsprofile wurden zuerst im Mausmodell zur Differenzierung von TSE-Stämmen genutzt. Durch diese Untersuchungen gelang auch der Nachweis, dass die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sowie die Fälle von FSE und TSEn bei exotischen Wildwiederkäuern ebenfalls durch den BSE-Erreger hervorgerufen wurden, da sie alle ein einheitliches Läsionsprofil zeigten (BRUCE et al. 1994, 1997, HILL et al. 1997, BROWN et al. 2003). Auch Schafe, Ziegen und Schweine, die mit BSE infiziert und anschließend in Mäusen subpass-

agiert wurden, zeigten dieses charakteristische Läsionsprofil (BRUCE et al. 1994, FOSTER et al. 1996a). Die Auswertung der Erstpassage von 150 BSE-Übertragungen auf Mäuse (GREEN et al. 2005) bestätigte die These, dass es sich bei dem klassischen BSE-Erreger um einen einzigen Stamm handelte. Die Maxima der Vakuolisierung sind bei BSE im Hypothalamus, im Septum und in der Medulla oblongata zu finden. Im Gegensatz dazu zeigen alle bisher isolierten Scrapieisolate eine breite Variation in den Läsionsprofilen (BRUCE u. FRASER 1991), aus denen nach mehreren Subpassagen jedoch nur eine begrenzte Anzahl definierter Scrapiestämme isoliert werden konnte (BRUCE et al. 2002).

Da der Mausbioassay sehr zeitaufwändig ist und einige TSE-Isolate sich nicht auf konventionelle Mäuse übertragen ließen, wurden Läsionsprofile auch direkt am Schafgehirn erstellt (SIMMONS et al. 1996, WOOD et al. 1997, BEGARA-MCGORUM et al. 2002, LIGIOS et al. 2002). Die Interpretation solcher Läsionsprofile ist jedoch diffizil, da beim Schaf neben dem TSE-Stamm auch andere Faktoren wie Rasse, Genotyp, Inkubationszeit und das Alter des Tieres zum Zeitpunkt der Inokulation eine Rolle spielen können.

2.3.3.2 PrP^{Sc}-Ablagerung und Immunoreaktivität

Die Verteilung des PrP^{Sc} kann in der Immunhistologie durch PrP-spezifische Antikörper dargestellt werden. Die Gehirnregionen, in denen eine starke Vakuolisierung beobachtet wird, zeigen korrelierend dazu auch die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen. Die PrP^{Sc}-Ablagerung kann dabei diffus verteilt und fein granulär oder mehr fokal in Form amyloider Plaques auftreten. Wie bei der Vakuolisierung kann die Verteilung und der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung zur Differenzierung von TSE-Stämmen genutzt werden. Einige TSE-Stämme scheinen nicht nur bestimmte Gehirnregionen, sondern sogar bestimmte Nervenzelltypen zu bevorzugen.

Bei der Maus wurden die PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster zuerst zur Stammdifferenzierung verwendet (BRUCE et al. 1989, BRUCE 1993, 2003) und dienten zum Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen BSE und vCJK (BROWN et al. 2003). Inzwischen findet neben der klassischen Immunhistologie zur Darstellung des PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster bei der Maus und beim Hamster auch der PET-Blot (Paraffin Embedded Tissue Blot) Verwendung (TARABOULOS et al. 1992, SCHULZ-SCHAEFFER et al. 2000a, b).

Immunhistologische Untersuchungen erlauben die Unterscheidung von oviner BSE von natürlichen und experimentellen Scrapieisolaten direkt am Schafmaterial (JEFFREY et al. 2006). Dabei werden immunohistochemisch gefärbte Schnitte aus dem Gehirn und/oder dem lymphoretikulären System (LRS) von Schafen untersucht. Im LRS ist die PrP^{Sc}-Ablagerung vor allem in follikulär dendritischen Zellen und in „tingible body macrophages“ (TBM) zu finden. Fälle

von oviner BSE zeigen weniger PrP^{Sc}-Ablagerungen im Zytoplasma von Neuronen und in phagozytotischen Zellen des Gehirns und des LRS, wenn sie mit Antikörpern, deren Epitop im Bereich der PK-Schnittstelle (Aminosäure 84-105) binden, inkubiert werden (JEFFREY et al. 2001b, 2003, THURING et al. 2004, MARTIN et al. 2005).

Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster wird hauptsächlich durch den verwendeten Scrapiestamm beeinflusst (GONZALEZ et al. 2002, 2003). Immunhistologisch zeigt ovine BSE ein charakteristisches PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster, welches sich von allen bisher untersuchten Scrapieisolaten unterscheiden lässt. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster wird dabei nicht oder nur gering von der Schafrasse, dem PrP-Genotyp oder der Inokulationsart beeinflusst (GONZALEZ et al. 2005a), aber der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung scheint vom PrP-Genotyp und somit von der Länge der Inkubationszeit abhängig zu sein (GONZALEZ et al. 2002). Diese immunhistologische Methodik erlaubt die Abgrenzung des Scrapiestammes CH1641 von oviner BSE (JEFFREY et al. 2006).

Diese beiden Methoden wurden weiterhin zur präklinischen Differenzierung zwischen BSE und Scrapie am Schaf verwendet (THURING et al. 2005).

Ein weiteres histologisches Merkmal der TSEn ist das Auftreten amyloider Plaques. Sie können nach ihrer Häufigkeit, ihrer Art und ihrer Lokalisation unterschieden werden (BRUCE et al. 1989, BRUCE 2003). Floride Plaques bestehen aus einem fibrillären Kern, der von einem Ring von Vakuolen umgeben ist. Sie sind häufig im Gehirn von vCJK-Patienten nachweisbar (WILL et al. 1996), sowie bei BSE-infizierten Affen (LASMEZAS et al. 1996), bei mit oviner BSE infizierten transgenen Mäusen, die das Schafprionprotein überexprimieren (CROZET et al. 2001b) und bei mit BSE oder vCJK infizierten transgenen Mäusen, die das humane Prionprotein exprimieren (ASANTE et al. 2002). Das Fehlen von Plaques bei mit BSE-infizierten Prnp-a Wildtypmäusen wird von GREEN et al. (2005) als eine spezifische Eigenschaft des BSE-Erregers angesehen. Das Auftreten von Plaques ist einerseits vom TSE-Stamm, aber auch von der verwendeten Mauslinie und der Inkubationszeit abhängig (BRUCE u. FRASER 1982). Auch die Behandlung der histologischen Proben mit Ameisensäure kann zu einem reduzierten Auftreten von Plaques führen (BROWN et al. 2003).

2.3.3.3 Resistenz gegenüber Inaktivierung

Der TSE-Erreger zeichnet sich durch eine hohe physikalische und chemische Stabilität aus. Unterschiede bei der Inaktivierung von TSE-Stämmen können auf unterschiedlichen Thermostabilitäten (KIMBERLIN et al. 1983, SOMERVILLE et al. 2002, TAYLOR et al. 2002), Resistenzen gegenüber basischen pH-Werten (> pH 11) sowie Kombinationen von hohen

Temperaturen und basischen pH-Werten bestehen (SOMERVILLE 2002). Zum Beispiel ist der Scrapie-Stamm 22C bis 70°C stabil, der Scrapie-Stamm 22A bis 97°C. Auch SDS (Natriumdodecylsulfat, > 1%) oder starke Chaotrope (z. B. 3 M Guanidiniumhydrochlorid) führen zu einer Reduktion der Infektiosität (KIMBERLIN et al. 1983, CAUGHEY et al. 1997). Bei zwei Mausmodellen, bei denen die Scrapiestämme 22A und 139A in verschiedenen Mauslinien verwendet wurden, konnte stammspezifische Unterschiede in der Resistenz gegenüber SDS nachgewiesen werden und der Scrapie-Stamm 22A zeigte eine höhere Thermostabilität als der Scrapie-Stamm 139A (KIMBERLIN et al. 1983).

2.3.3.4 Konformation

Erste Hinweise, dass sich die Konformation des PrP^{Sc} bei den verschiedenen TSE-Stämmen unterscheidet, ergaben sich aus Studien mit transgenen Mäusen (TELLING et al. 1996). CAUGHEY et al. (1998) konnten mittels Infrarotspektroskopie nachweisen, dass sich die Konformation der beiden Hamsterscrapiestämme ‚Hyper‘ und ‚Drowsy‘ in der β -Faltblattregion sehr stark unterscheidet. Die Infrarotspektroskopie wurde auch zur Differenzierung von BSE und Scrapie im Hamster eingesetzt (THOMZIG et al. 2004).

Mittels Fluoreszenzspektroskopie (RUBENSTEIN et al. 1998) und durch einen konformationsabhängigen Immunoassay (conformation dependent immunoassay – CDI) (SAFAR et al. 1998, 2002) ergaben sich weitere Hinweise dafür, dass sich TSE-Stämme anhand ihrer Konformation unterscheiden. Beim CDI wird das Verhältnis der Antikörperbindung an denaturiertes bzw. natives PrP bestimmt. Dadurch konnten acht Scrapiestämme beim Hamster unterschieden werden. Die stammspezifische Konformation wird auch durch die Bindung von Kupfer an PrP^{Sc} beeinflusst (WADSWORTH et al. 1999). Diese Unterschiede in der Konformation könnten nicht nur die Grundlage für verschiedene PK-Schnittstellen und somit verschiedene Molekularmassen und Immunoreaktivitäten darstellen, sondern auch die Basis der gesamten TSE-Stammeigenschaften bilden.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Schafe

Bei allen verwendeten Scrapieisolaten handelte es sich um deutsche Feldisolate, die in Deutschland in den Jahren 2002 bis 2004 im Rahmen des aktiven Überwachungsprogramms kleiner Wiederkäuer auf das Vorhandensein des Scrapieerregers ermittelt wurden.

Einen Überblick über die verwendeten Isolate klassischer Scrapie geben Tabelle 3.1 und 3.2. Von diesen klassischen Isolaten wurden acht für Übertragungsversuche in Mäusen verwendet. 36 klassische Scrapieisolate wurden einer Typisierung zur Unterscheidung BSE/Scrapie mit Hilfe des FLI-Test unterzogen. Als BSE-Kontrolle für den FLI-Test diente eine Rinderprobe (R 128/04), die im BioRad Elisa ein reaktives Ergebnis erbracht hatte und bei der im Rahmen der diagnostischen Immunhistologie am Friedrich-Loeffler-Institut eindeutig PrP^{Sc}-Ablagerungen nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Positivkontrolle stellte der ‚BSE Diagnostikpool‘ dar, eine Mischung aus mehreren Hirnstammproben von Rindern, bei denen im Jahr 2004 BSE diagnostiziert worden war. Als ovine BSE Kontrolle im FLI-Test diente der Hirnstamm eines experimentell mit BSE infizierten Schafes mit dem Genotyp ARQ/ARQ, welcher von der VLA in Weybridge (England) zur Verfügung gestellt wurde (PG1693/03) und der Hirnstamm eines experimentell mit BSE infizierten Schafes, welcher von der INRA in Tours (Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde.

Einen Überblick über die verwendeten atypischen Scrapieisolate geben Tabelle 3.3 und 3.4. 11 der 12 atypischen Scrapieisolate wurden für Übertragungsexperimente in Mäusen verwendet, fünf Isolate wurden weitergehend biochemisch charakterisiert. Als Kontrolle für die weitergehenden biochemischen Untersuchungen (Untersuchungen zur PK-Stabilität, Deglykosylierung, Antikörperbindungsverhältnis, Epitopcharakterisierung) diente ein klassisches Scrapiefeldisolat, S 33/02, und ein BSE-Isolat, R 128/04.

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Schafisolate mit klassischer Scrapie

* Nummer der Ausbrüche fortlaufend ab 2002 für Ausbrüche mit klassischer Scrapie.

** Von dem Scrapieisolat S 34/02 war nur formalinfixiertes Material vorhanden, so dass weder der Genotyp bestimmt werden konnte noch andere biochemische Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

*** Alle Schafe des Ausbruchs Nummer 11 stammten aus einer Herde in Sachsen-Anhalt, einige der Tiere wurden jedoch nach Niedersachsen verkauft, wo auch das erste Schaf dieses Ausbruches an Scrapie erkrankte.

Ausbruch*	Bezeichnung	Landkreis, Bundesland	PrP-Allel	FLI-Test	Inokulation in Mäuse
1	S 3/02	Borken, NRW	ARQ/ARQ	x	x
	S 5/02	Borken, NRW	ARQ/ARQ	x	x
	S 7/02	Borken, NRW	ARQ/ARQ	x	
2	S 12/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	
	S 13/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ		x
	S 17/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	x
	S 21/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	
	S 23/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	
	S 29/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	x
	S 30/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ		x
	S 33/02	Güstrow, MV	ARQ/ARQ	x	x
3	S 32/02	Hochsauerlandkreis, NRW	ARQ/ARQ	x	x
4**	S 34/02	Neumarkt i.d.O., BY	n.a.		
5	S 6/03	Holzminden, NS	ARQ/ARQ	x	
6	S 15/03	Minden Lübbecke, NRW	ARQ/ARQ	x	
	S 17/03	Minden Lübbecke, NRW	ARQ/ARQ	x	
	S 18/03	Minden Lübbecke, NRW	ARQ/ARQ	x	
	S 27/03	Minden Lübbecke, NRW	ARQ/ARQ	x	
7	S 20/03	Saale-Holzland, TH	ARQ/AHQ	x	
8	S 24/03	Viersen, NRW	ARQ/ARQ	x	
	S 28/03	Viersen, NRW	ARQ/ARQ	x	
	S 33/03	Viersen, NRW	ARQ/AHQ	x	
9	S 12/04	Leer, NS	VRQ/ARQ	x	
	S 13/04	Leer, NS	VRQ/ARH	x	
10	S 14/04	Borken, NRW	ARQ/ARQ	x	
11	S 11/04	Anhalt-Zerbst, ST (NS)***	ARQ/ARQ	x	
	S 17/04	Anhalt-Zerbst, ST (NS)***	ARQ/ARQ	x	
	S 29/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
	S 44/04	Anhalt-Zerbst, ST (NS)***	ARQ/ARQ	x	
	S 45/04	Anhalt-Zerbst, ST (NS)***	ARQ/ARQ	x	
	S 46/04	Anhalt-Zerbst, ST (NS)***	ARQ/ARQ	x	
	S 47/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
	S 77/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
	S 82/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
	S 86/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
	S 104/04	Anhalt-Zerbst, ST	ARQ/ARQ	x	
12	S 52/04	Greiz, TH	ARQ/VRQ	x	
13	S 60/04	Bad Doberan, MV	ARQ/ARQ	x	
14	S 107/04	Havelland, BB	ARQ/ARQ	x	

Tab. 3.2: Weitere Informationen über die für die Inokulation verwendeten Schafisolat klassischer Scrapie

	Alter	Rasse	Todesart	BioRad Platelia	Prionics LIA	Prionics Western Blot	Enfer	IHC FLI	O.I.E. WB FLI
S 3/02	k.A.	Suffolk	TBA	+++	+++	++	n.d.	+++	++
S 5/02	k.A.	Suffolk	TBA, Bestandskeulung	+++	++	+	n.d.	++	++
S 13/02	3 Jahre	Suffolk	TSE-Symptome, Euthanasie, TBA	+++	++	++	++	+	++
S 17/02	3 Jahre	Suffolk	TBA, Bestandskeulung	++	-	-	+	++	++
S 29/02	3 Jahre	Suffolk	TBA, Bestandskeulung	++	+	+	n.d.	++	++
S 30/02	4 Jahre	Suffolk	TBA, Bestandskeulung	+	-	-**	n.d.	+	++
S 32/02	>18 M	Suffolk	TBA, verendet*	+++	n.d.	++	n.d.	+	++
S 33/02	4 Jahre	Suffolk	TBA, Bestandskeulung	+++	++	+	+	+	n.d.

* Es wurden keine spezifischen TSE-Symptome vom Schafhalter beobachtet.

** Mangels Material konnten nur weniger als 0,5 g Gehirnmateriale zur Herstellung eines 10%igen Homogenates verwendet werden.

IHC FLI Immunhistologie am Friedrich-Loeffler-Institut

O.I.E. WB FLI SAF-Immunoblot am Friedrich-Loeffler-Institut

+	geringgradig positiv	k.A.	keine Angaben verfügbar
++	mittelgradig positiv	n.d.	nicht durchgeführt
+++	hochgradig positiv	TBA	Tierkörperbeseitigungsanlage
-	negativ	M	Monate

Tab. 3.3: Übersicht über die für die Inokulation verwendeten Schafisolate atypischer Scrapie

Ausbruch*	Bezeichnung	Landkreis, Bundesland	PrP-Allel	Alter	Rasse	Kohorte	Todesart	I.	B.U.
1	S 10/02	Fulda, HE	ARR/ARR	2 J	Texel	nein	TBA	x	
2	S 15/02	Tuttlingen, BW	AHQ/AHQ	k.A.	Merinolandschaf	nein	TBA	x	
3	S 18/02	Groß-Gerau, HE	ARR/AHQ	4 J	Texel	nein	Schlachtung	x	x
4	S 25/02	Fulda, HE	AHQ/AHQ	2 J	Merinolandschaf	nein	Schlachtung	x	
5	S 36/02	Freudenstadt, BW	AHQ/ARQ	5-8 J	Merinolandschaf	nein	Schlachtung	x	
6	S 37/02	Tübingen, BW	AHQ/ARR	>18 M	Merinolandschaf	nein	Schlachtung	x	
7	S 38/02	Göppingen, BW	ARQ/ARQ	4 J	Coburger Fuchs	nein	Schlachtung	x	
8	S 39/02	Heidenheim/Brenz, BW	AHQ/ARR	>5 J	Merinolandschaf	ja (2)	Schlachtung	x	x
9	S 40/02	Roth, BY	AHQ/ARQ	>18 M	Merinolandschaf	nein	TBA, verendet**	x	
19	S 14/03	Baden-Baden, BW	ARR/ARR	8-10 J	Pommernkreuzung	nein	Schlachtung	x	x
20	S 26/03	Löbau-Zittau, SN	ARQ/ARQ	4-5 J	Merinolandschaf	ja (2)	Schlachtung	x	x
31	S 40/04	Rottweil, BW	AHQ/ARQ	k.A.	k.A.	ja (3)	TBA		x

* Nummer der Ausbrüche fortlaufend ab 2002 für Ausbrüche mit atypischer Scrapie.

** Es wurden keine spezifischen TSE-Symptome vom Schafhalter beobachtet.

k.A. keine Angaben verfügbar TBA Tierkörperbeseitigungsanlage

I. Inokulation in Mäuse B.U. Biochemische Untersuchung

J Jahre M Monate

Tab. 3.4: Ergebnisse der durchgeführten Schnelltestuntersuchungen und der Bestätigungsuntersuchungen am FLI bei den atypischen Scrapieisolaten

Ausbruch	Bezeichnung	BioRad Platelia	Prionics LJA	Prionics Western Blot	Enfer	IHC FLI	O.I.E. WB FLI
1	S 10/02	+	-	-	-	+	+
2	S 15/02	++	-	-*	n.d.	+	+
3	S 18/02	++	-	-	-	n.a.	++
4	S 25/02	+	-	-	n.d.	+	+
5	S 36/02	++	-	-	-	-	++
6	S 37/02	++	-	+	-	n.a.	+
7	S 38/02	++	-	-	-	+	+
8	S 39/02	++	-	-	-	+	+
9	S 40/02	+	-	-*	n.d.	n.a.	+
19	S 14/03	+	-	-	-	-	+
20	S 26/03	++	n.d.	n.d.	n.d.	-	+
31	S 40/04	++	-	n.d.	n.d.	**	+

* Mangels Material konnten nur weniger als 0,5 g Gehirnmateriale zur Herstellung eines 10%igen Homogenates verwendet werden.

** Dieses Isolat war in der Immunhistologie im Obex negativ, im Kleinhirn aber positiv.

IHC FLI Immunhistologie am Friedrich-Loeffler-Institut O.I.E. WB FLI SAF-Immunoblot am Friedrich-Loeffler-Institut

+ geringgradig positiv n.a. nicht auswertbar

++ mittelgradig positiv n.d. nicht durchgeführt

+++ hochgradig positiv - negativ

3.1.2 Mäuse

3.1.2.1 Mauslinien

Für die Durchführung der Tierversuche wurden die drei Inzuchtmausstämme RIII, VM95 und C57Bl6 und eine transgene Mauslinie, Tgshp XI, verwendet. Diese transgene Mauslinie überexprimiert im Gehirn das ovine Prionprotein 4- bis 8 fach im Vergleich zum Schafsgehirn und besitzt deshalb eine höhere Empfänglichkeit für den Scrapieerreger als konventionelle RIII-Mäuse (Anne Buschmann, pers. Mitteilung, Insel Riems, 27.02.2006). Die Inzucht-Mauslinien stammen ursprünglich vom Institute for Animal Health in Edinburgh, während die transgene Mauslinie Tgshp XI an der BFAV Tübingen entwickelt wurde. Der größte Teil der Tierversuche fiel unter das beim Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Sitz: Rostock, am 17.12.2002 angezeigte Tierversuchsvorhaben Nr. 902 (Diagnostischer Nachweis und Typisierung von Scrapie- bzw. der BSE-Feldisolaten - Aktenzeichen LVL M-V/310-4/7221.3-2.1-027/02). Dabei sollten 90 Mäuse pro Isolat und maximal 1800 Mäuse pro Jahr infiziert werden. Der Tierversuch startete am 01.03.2003 und wurde unbefristet genehmigt. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 1054 Mäuse infiziert. Einige der verwendeten Kontrollen und ein Isolat, S 3/02, fallen unter das noch beim Regierungspräsidium Tübingen am 16.05.1997 angezeigte Tierversuchsvorhaben Nr. 166 (Diagnostischer Nachweis der Traberkrankheit bzw. der BSE) bzw. unter das vom Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Sitz Rostock, am 19.11.2002 genehmigte Tierversuchsvorhaben Nr. 502 (BSE/Scrapie-Stämme und Speziesbarrieren: Analyse der diese Phänomene bestimmenden Faktoren mit Hilfe transgener Mauslinien, die artfremde oder artifizielle Prionproteine exprimieren – Aktenzeichen LVL-MV/310-4/7221.3-1.1-034/02).

3.1.2.2 Tierhaltung

Alle Mauslinien wurden in der Kleintierzucht des FLI auf der Insel Riems vermehrt. Die Infektionsversuche erfolgten in dem Isolierstallgebäude L3** des FLI, wo die Mäuse in Räumen mit konstanter Temperatur, einem Lichtprogramm von 12 Stunden und kontinuierlicher Belüftung gehalten wurden. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren, getrennt nach Geschlecht, gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Zuchtfutterpellets. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen wurden für die Inokulationsversuche mit dem Scrapie- oder BSE-Erreger getrennte Stallungen verwendet.

3.1.2.3 Kontrollen

Zur Vermeidung und Reduktion von Tierversuchen wurden bei den Positivkontrollen (BSE Höxter) und Negativkontrollen (isotonische Kochsalzlösung, negatives Schafsgehirn) in den RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen auf in der Arbeitsgruppe (JUNGHANS 2004) durchgeführte Versuche zurückgegriffen. Mit diesem Material wurden alle histologischen und proteomik-biochemischen Methoden zum Nachweis der Reproduzierbarkeit und zum Ausgleich methodisch bedingter Abweichungen erneut durchgeführt. Die Tgshp XI Mäuse wurden für diese Arbeit mit Positivkontrollen (Scrapiestamm Chandler, BSE Höxter, BSE BBP12/92) und Negativkontrollen (isotonische Kochsalzlösung, negatives Schafsgehirn) inokuliert. Als zwei weitere Positivkontrollen (BSE BBP12/92, ovine BSE) bei den Tgshp Mäusen wurde auf in der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche zurückgegriffen.

3.1.2.4 Inokulate

Aus dem Gehirn Scrapie-erkrankter Schafen wurde ein 10 % (w/v) Homogenat in isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Bei den Isolaten S 15/02 und S 30/02 mussten aus Mangel an Material niedrigere Konzentrationen des Gehirnhomogenates verwendet werden. Das Material für die Homogenatherstellung wurde unter sterilen Bedingungen aus dem Bereich des Obex entnommen, nur für das Schaf S 14/03 wurde Kleinhirn verwendet. Die entsprechende Menge Gehirnmateriale wurde abgewogen, mit dem Skalpell zerkleinert und mit dem entsprechenden Volumen isotoner Kochsalzlösung vermischt, um dann durch Kanülen mit einem Durchmesser von 0,9 mm und anschließend 0,6 mm solange gezogen zu werden, bis man eine homogene Flüssigkeit erhielt. Danach wurden die Proben mit maximaler Amplitude drei Minuten ultrabeschallt und, wenn möglich, am gleichen Tag inokuliert. Standen nicht alle Mauslinien in der entsprechenden Tierzahl an einem Tag zur Verfügung, wurde das Inokulat bei -70°C eingefroren, zur nächsten Inokulation wieder aufgetaut und erneut ultrabeschallt. Die Homogenate der Gehirne, die eine hochgradige Autolyse zeigten und nach Ausstrich auf einer Blutagarplatte eine hochgradige bakterielle Kontamination anzeigten, wurden zur Reduktion der bakteriellen Kontamination 10 min bei 70°C erhitzt. Einen Überblick über die erfolgten Inokulationen, die Konzentration der Inokulate und die je nach Zustand des Gehirnes erfolgte Erhitzung gibt die Tabelle 3.5.

3.1.2.5 Durchführung der Tierversuche

Für die Inokulation wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden in einem geschlossenen Glastopf mit Diethylether betäubt. Den Mäusen wurden $30\ \mu\text{l}$ des 10 %igen Gehirnhomogenates mit einer Metallkanüle intraze-

rebral im Schnittpunkt der gedachten Verbindungslinie zwischen medialem Augenwinkel und lateralem Ohrgrund appliziert. Von den Isolaten S 3/02 und S 14/03 wurden zusätzlich 100 µl intraperitoneal injiziert. Je 15 Tiere der Mauslinien RIII, VM95 und Tgshp XI wurden mit den entsprechenden klassischen Scrapieisolaten inokuliert. Neben diesen 3 Mauslinien wurden für die atypischen Scrapieisolate noch 15 C57Bl6-Mäuse inokuliert. Einen Überblick über die Inokulationen gibt Tabelle 3.5.

Nach der Inokulation wurden die Mäuse mindestens dreimal pro Woche auf das Auftreten klinischer Symptome untersucht.

Die Klinik ist gekennzeichnet durch ein gestörtes Allgemeinbefinden, Abmagerung, Ataxien in der Hinterhand bis zum Festliegen, stumpfes und gestäubtes Fell, getrübbte Augen, einen gekrümmten Rücken, Pruritus und zum Teil Blutungen und Nekrosen am Schwanz. Mäuse mit eindeutigen klinischen Symptomen wurden durch CO₂-Intoxikation euthanasiert.

Tab. 3.5: Überblick über die Inokulationen

Isolat	Mauslinie				c (%)	Medium	70°C, 10 min	i.c. (µl)	i.p. (µl)
	R III	C57Bl6	VM 95	Tgshp XI					
S 3/02	20	20	20	-	10	NaCl	nein	20	100
S 5/02	15	-	15	15	10	NaCl	nein	30	-
S 10/02	15	15	15	15	10	NaCl	ja	30	-
S 13/02	15	-	15	15	10	NaCl	nein	30	-
S 15/02	10	10	15	10	5	NaCl	ja	30	-
S 17/02	20	15	20	15	10	NaCl	nein	30	-
S 18/02	15	15	15	13	10	NaCl	ja	30	-
S 25/02	16	11	15	13	10	NaCl	nein	30	-
S 29/02	15	-	15	14	10	NaCl	ja	30	-
S 30/02	15	15	15	15	5	NaCl	ja	30	-
S 32/02	15	-	15	15	10	NaCl	ja	30	-
S 33/02	13	-	15	15	10	NaCl	ja	30	-
S 36/02	15	15	15	15	10	NaCl	ja	30	-
S 37/02	15	15	15	15	10	NaCl	nein	30	-
S 38/02	15	15	15	15	10	NaCl	ja	30	-
S 39/02	15	15	15	13	10	NaCl	ja	30	-
S 40/02	-	10	15	10	10	NaCl	ja	30	-
S 14/03	15	15	16	15	10	NaCl	ja	20	100
S 26/03	15	15	15	15	10	NaCl	ja	30	-

c Konzentration

i.c. intrazerebral

i.p. intraperitoneal

3.1.2.6 Probenentnahme

Mit einer kleinen Schere wurde vom Foramen occipitale ausgehend der Schädel an der rechten Seite aufgeschnitten und das Gehirn herauspräpariert. Mit einem Skalpell wurde das Gehirn in Längsrichtung, circa 2 mm neben dem Sulcus longitudinalis, von dorsal nach ventral gerade durchgeschnitten. Der größere Teil des Gehirns wurde für die Histologie verwendet und dafür in 4 %igem Formalin fixiert. Der kleinere Teil wurde für die Untersuchungen im Western Blot verwendet und bei -20°C gelagert. Für die Entnahme der Milz wurde das Fell auf der linken Seite des Tierkörpers aufgeschnitten, mit einer sterilen Schere die Bauchhöhle eröffnet und die Milz herauspräpariert. Eine Hälfte der Milz wurde in 4 %igem Formalin fixiert, die andere Hälfte bei -20°C gelagert. Für die Entnahme der Gehirne und der Milz wurde für jede Maus ein frisches, autoklaviertes Besteck verwendet, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

3.1.2.7 Inkubationszeiten

Die Inkubationszeit ist definiert als die Zeit von der Infektion (Inokulation) bis zum Auftreten der ersten Krankheitserscheinungen. Bei diesen Versuchen wurde das Ende der Inkubationszeit als der Tag definiert, an dem die Maus aufgrund der klinischen Symptome euthanasiert wurde oder tot aufgefunden wurde. Für jede Tiergruppe wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler der Inkubationszeiten aller positiven Mäuse berechnet (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Formeln zur Ermittlung von Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Formel	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	$s_{\bar{x}} = S.E.M. = \frac{s}{\sqrt{n}}$

n Anzahl der Proben

x Einzelwert des jeweiligen Tieres

Zur Darstellung einer möglichen Übertragung der atypischen Scrapieisolate auf die Mäuse trotz fehlendem PrP^{Sc}-Nachweis wurde neben der Inkubationszeit aller PrP^{Sc}-positiven Mäuse (IZ-PrP^{Sc}) auch noch die klinische Inkubationszeit (IZ-KL) aus den Mittelwerten aller mit klinischen Symptomen getöteten Mäuse berechnet. Aus den Inkubationszeiten aller inokulierten Mäuse in einem Versuch, unabhängig davon, aus welchem Grund sie euthanasiert oder tot aufgefunden wurden, wurde die mittlere Lebensdauer nach Inokulation (MLD) ermittelt. Mäuse, die in einem Zeitraum von 150 Tagen nach der Inokulation verstarben, wurden in diese Berechnung jedoch nicht mit hineinbezogen, da in diesem Zeitraum meist die Inokulation selber oder andere Ursachen als eine Scrapieinfektion die Todesursache darstellen.

Die mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Mäuse wurden nur stichprobenartig getestet, um Material für eventuell notwendige Subpassagen zur Verfügung zu haben. Dazu bildeten die zwei Mäuse mit der kürzesten bzw. der längsten Inkubationszeit, die in der Immunhistologie oder im Western Blot positiv getestet worden waren, die Grenzen für ein sogenanntes Inkubationszeitintervall. Wenn weitere vier Mäuse, deren Inkubationszeiten gleichmäßig über dieses Intervall verteilt waren, in der Immunhistologie oder im Western Blot positiv getestet wurden, galten alle anderen Tiere, die eindeutige klinische Symptome zeigten und in diesem Intervall lagen, auch ohne Durchführung von Immunhistologie oder Western Blot als positiv. Tot aufgefundene Mäuse wurden in die Ermittlung der Inkubationszeit mit einbezogen, wenn bei ihnen PrP^{Sc} nachgewiesen wurde oder sie im Inkubationszeitintervall verstorben waren. Bei den atypischen Scrapieisolaten war die stichprobenartige Testung wegen der vermuteten geringeren Übertragungsraten nicht ausreichend, so dass alle Mäuse in der Histologie und im Western Blot auf vorhandenes PrP^{Sc} untersucht wurden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Gehirnhomogenaten

Je nach Tierart wurden unterschiedliche Verfahren verwendet, um 10%ige Gehirnhomogenate herzustellen. Beim Schaf wurden 150 mg Gehirn aus dem Bereich des Obex in einem Ribolyserrohrchen abgewogen und mit dem neunfachen Volumen (w/v) an Sucrose-DOC-NP40-Lysispuffer versetzt. Die Homogenisierung erfolgte in einem Ribolyser mit Unwucht (2 Zyklen, Geschwindigkeitseinheit 6.5, Zeit 45 Sekunden) und wurde durch die Keramikkügelchen in dem Ribolyserrohrchen erzielt. Das Homogenat wurde für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand entweder direkt in die PTA-Fällung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Bei der Maus wurden 50-80 mg Gehirnmateriale ebenfalls im neunfachen Volumen Sucrose-DOC-NP40-Lysispuffer aufgenommen, durch mehrmaliges Aufziehen in Spritzen mit Kanülen mit einem Durchmesser von 0,9 und 0,6 mm homogenisiert und anschließend für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, um Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand konnte entweder direkt für die nachfolgenden Versuche verwendet werden oder wurde bei -20°C eingefroren.

3.2.2 Einfacher Proteinase K-Verdau

Für den einfachen Proteinase K (PK)-Verdau wurden die Gehirne der Mäuse verwendet, die mit klassischen Scrapieisolaten infiziert waren. 50 µl des 10%igen Gehirnhomogenates wurden mit 2,5 µl PK-Stammlösung (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt und bei 37°C (RIII-,

VM95-, C57Bl6-Mäuse) bzw. 55°C (Tgshp-Mäuse) eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Der PK-Verdau wurde durch eine Denaturierung für 5 min bei 95°C abgestoppt und die Probe mit 50 µl 2x CVL-Puffer versetzt.

3.2.3 Fällung mit Phosphorwolframsäure (PTA-Fällung)

Die PTA-Fällung dient der spezifischen Anreicherung von PrP^{Sc} (WADSWORTH et al. 2001). Phosphorwolframsäure bildet in Gegenwart von Magnesiumionen und bei neutralem pH-Wert Aggregate spezifisch mit PrP^{Sc}-Molekülen, aber nicht mit PrP^C-Molekülen aus. Die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets bestehen größtenteils aus PrP^{Sc} und ermöglichen so eine starke Anreicherung von PrP^{Sc} aus Gehirnhomogenaten. Bei Mäusen, die mit klassischen Scrapieisolaten infiziert waren und nach einfachem PK-Verdau sehr schwache Signalstärken im Western Blot hatten sowie bei allen Mäusen, die mit den atypischen Scrapieisolaten infiziert waren und zusätzlich bei allen Schafen wurde zur Anreicherung von PrP^{Sc} die PTA-Fällung durchgeführt.

Beim Standardprotokoll wurden 100 µl eines 10%igen Gehirnhomogenates mit 0,5 µl Benzonnase (Endkonzentration 50 Units/ml) und 1,0 µl Magnesiumchlorid (Endkonzentration 1 mM) versetzt und bei 37°C für 30 Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei einer PK-Konzentration von 50 µg/ml bei 55°C für eine Stunde verdaut. Der PK-Verdau wurde durch die Zugabe von 2 µl Pefabloc (Endkonzentration 2 mM) abgestoppt und die Proben bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Nach Zugabe von 100 µl PBS mit 4 % Sarkosyl inkubierten die Proben für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Proben mit 16 µl der PTA-Stammlösung versetzt, um eine Endkonzentration von 0,3 % PTA in der Probe zu erhalten. Nach einer Inkubation bei 37°C für eine Stunde wurden die Proben 30 Minuten bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 30 µl 2 x CVL-Puffer aufgenommen.

Abweichend vom Standardprotokoll wurde bei Schafen und Mäusen mit schwachen Signalstärken im Western Blot und bei allen Mäusen, die mit atypischen Scrapieisolaten infiziert wurden waren, das Ausgangsvolumen des Homogenates auf 500 µl erhöht. Proben aus RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen wurden bei 37°C mit PK verdaut, Proben aus Schafen und Tgshp-Mäusen bei 55°C.

3.2.4 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Mini-Protean II System der Firma BioRad verwendet. Als Gele wurden 16%ige Polyacrylamid-Minigele

verwendet (Tab. 3.7), die je nach Bedarf 0,75 mm dick (Schafmaterial, 10 Proben) oder 1,5 mm dick (Mausmaterial, 15 Proben) waren.

Tab. 3.7: Rezepturen für Trenn- und Sammelgele

	2 Trenngele		2 Sammelgele
A. bidest.	3,0 ml	A. bidest.	6,0 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	3,75 ml	Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid	8,0 ml	Acrylamid	1,3 ml
SDS (10 %)	750 µl	SDS (10 %)	500 µl
APS	100 µl	APS	200 µl
Temed	10 µl	Temed	20 µl

Das Trenngel benötigte etwa 20 Minuten zum Auspolymerisieren, danach konnte das Sammelgel gegossen werden, welches innerhalb von 5 Minuten auspolymerisiert war. Die Proben wurden kurz vor dem Auftragen bei 95°C für 5 min denaturiert. Bei Gelen, die zur Ermittlung der Molekularmasse verwendet wurden, wurden mindestens zweimal randständig und, wenn möglich, noch einmal in der Mitte des Gels 10 µl des Histidin-markierten FLI-Markers aufgetragen (GROSCHUP et al. 2001). Die Proteine wurden bei 100 V im Sammelgel und bei 200 V im Trenngel aufgetrennt.

3.2.5 Western Blot

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot in einer Semi-Dry-Blotting Apparatur auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde für 5 Minuten in Methanol gelegt und anschließend mit 6 Lagen Whatman-Chromatographiepapier und dem Minigel in Blottingpuffer getränkt. In das Semi Dry Blotgerät wurden aufeinander 3 Lagen Whatmanpapier gelegt, darauf die PVDF-Membran, das Minigel und schließlich wieder 3 Lagen Whatmanpapier. Am Blotgerät wurde für 45 Minuten eine Spannung von 15 Volt und eine Stromstärke von 0,3 Ampère pro Minigel eingestellt. Die PVDF-Membran wurde anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 10 ml 5%iger Magermilch für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Der primäre Antikörper wurde in 5%iger Magermilch verdünnt (Verdünnungen siehe Tab. 9.1.1 und 9.1.3) und für 1,5 Stunden oder über Nacht inkubiert. Wurde der Histidin-markierte FLI-Marker auf die Gele geladen, wurde als primärer Antikörper zusätzlich ein anti-Histidin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Wenn die Western Blots mit dem MAK P4 entwickelt wurden, kam ein FLI-Marker zum Einsatz, welcher neben der Histidinmarkierung auch eine Markierung für den MAK P4 trug, so dass kein Histidin-Antikörper zugegeben werden

musste. Dieser P4-FLI-Marker beinhaltet dabei nur die Marker mit 21,5 und 18,0 kDa Molekularmasse. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBS-Tween wurde die Membran mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper, der in 10 ml PBS-Tween verdünnt wurde, für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBS-Tween wurden die Blots 2 mal je 2 Minuten in Assaypuffer inkubiert und anschließend für fünf Minuten mit 1,5 ml CDP-Star Lösung bedeckt. Nach Ablauf der CDP-Star-Lösung von der Membran wurden die Membranen in Klarsichtfolie verpackt, um sie im VersaDoc Imaging System über einen Zeitraum von 120 Sekunden einzuscannen.

3.2.6 Glykosylierungsverhältnisse und Molekularmasse

Die Glykosylierungsverhältnisse, also der Anteil der mono-, di- und unglykosylierten Bande des PK-verdauten PrP^{Sc} am Gesamtsignal und die Molekularmasse des PrP^{Sc} im Western Blot wurde mit Hilfe der Quantity One Software nach Messung im VersaDoc Imaging System bestimmt. Um die Signale für die Glykosylierungsverhältnisse auswerten zu können, musste die Signalintensität im linearen Messbereich des VersaDoc Imaging System zwischen 100.000 und 200.000 counts liegen. Die erforderliche Signalstärke wurde in einem Probelauf bestimmt. Für die Bestimmung der Molekularmasse der di-, mono- und unglykosylierten Bande des PrP^{Sc} wurde der FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 – 12,1 kDa Größe (GROSCHUP et al. 2001) als Standardmarker definiert. Die Einstellungen am VersaDoc Imaging System zur Aufnahme und Auswertung der Western Blots wurden nach Herstellerangaben (VersaDoc Manual) eingerichtet und waren für alle Western Blots gleich.

Am Schafmaterial wurde jedes Scrapieisolat nach PTA-Fällung und nach Bestimmung der erforderlichen Signalstärke auf vier verschiedene Gele geladen. Der Western Blot wurde mit dem MAK L42 entwickelt, der Mittelwert aus diesen Gelläufen ermittelt und die Standardabweichung der Einzelgelläufe berechnet.

Am Mausmaterial wurden pro Scrapieisolat und Mauslinie vier Mäuse, die die erforderlichen Signalstärken im Western Blot hatten, auf je vier Gele aufgetragen und die Western Blots mit dem PAK Ra10 entwickelt. Aus den Mittelwerten der Einzelgelläufe jeder Maus berechnete man den Mittelwert und die Standardabweichung für die Glykosylierungsverhältnisse und die Molekularmasse für jedes Scrapieisolat.

3.2.7 Antikörperbindungsverhältnis

Diese Untersuchung wurde am Schaf- und Mausmaterial durchgeführt. Das Prinzip beruht auf

Antikörpern wie MAK P4, 3B5 und SAF32, die im Bereich der PK-Schnittstelle des PrP^{Sc} binden. Sie detektieren nach PK-Verdau noch das PrP^{Sc} von Scrapie, aber nicht mehr das PrP^{Sc} von BSE. Im Gegensatz dazu erkennen Antikörper wie der MAK L42 bzw. PAK Ra10, die in der ‚core-‘ oder zentralen Region des Prionprotein binden, nach PK-Verdau sowohl das PrP^{Sc} von Scrapie als auch das von BSE.

Am Schafmaterial bei den 36 untersuchten klassischen Scrapieisolaten und den drei untersuchten atypischen Scrapieisolaten wurde das gleiche Probenvolumen jedes Isolates nach der PTA-Fällung auf mindestens vier Gele geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zwei der Western Blots wurden mit dem MAK L42 und zwei mit dem MAK P4 entwickelt. Am VersaDoc wurde mit der Quantity One Software die entsprechenden Signalstärken bestimmt und das Verhältnis der Signalstärke im Western Blot vom MAK P4 zum MAK L42 berechnet. Auf jedes Gel wurde als Kontrolle ein klassisches Scrapieisolat, ein BSE-Isolat und ein Isolat oviner BSE geladen.

Bei den Mäusen wurde diese Untersuchung an den Tgshp- und RIII-Mäusen, die mit den klassischen Scrapieisolaten infiziert wurden waren, durchgeführt. Dabei wurde mit gepooltem Material aus den vier Mäusen, die für die Berechnung der Glykosylierungsverhältnisse und der Molekularmasse verwendet wurden, gearbeitet. Da die Tgshp-Mäuse als Transgen die Proteinsequenz des Schafprionproteins tragen, werden sie von MAK's wie L42 und P4 erkannt. Die Berechnung des Antikörperbindungsverhältnisses erfolgte wie beim Schafmaterial angegeben.

Bei den RIII-Mäusen standen zwei Antikörper zur Abgrenzung des BSE- vom Scrapieerreger zur Verfügung: MAK SAF32 und MAK 3B5. In einem Probegel wurden nach einem einfachen PK-Verdau die Signalstärken der RIII-Mäuse mit dem PAK Ra10 im Western Blot gemessen und das auf das Gel aufgetragene Volumen für jede Mauslinie und jedes Scrapieisolat so gewählt, dass sie mit diesem Antikörper ähnliche Signalstärken im Western Blot zeigten und im linearen Bereich des VersaDoc lagen.

Die so ermittelten Probenvolumina der RIII-Mäuse wurden auf drei Gele geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und der erste Western Blot mit dem PAK Ra10, der zweite mit dem MAK 3B5 und der dritte mit dem MAK SAF32 entwickelt (s. Tab. 9.1.1). Da für jeden dieser drei Antikörper nur ein Gel verwendet werden konnte, wurde das Ergebnis jedoch nicht wie bei den Schafen und den Tgshp-Mäusen als Verhältnis der Signalstärken berechnet, sondern nur der Grad der Detektion angegeben.

3.2.8 Langzeit-Proteinase K-Resistenz

Diese Untersuchung wurde an den Tgshp- und RIII-Mäusen, die mit den klassischen Scrapieisolaten infiziert wurden waren, durchgeführt. Für die Ermittlung der Langzeit-PK-Resistenz wurde mit dem gepoolten Material aus den vier Mäusen, die für die Berechnung der Glykosylierungsverhältnisse und der Molekularmasse verwendet wurden, gearbeitet. Pro Mauslinie und Scrapieisolat wurden drei Ansätze durchgeführt, welche wiederum auf vier Gele aufgetragen wurden. Pro Ansatz wurden 200 µl des gepoolten Homogenates mit 10 µl PK-Stammlösung (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden aus jedem Ansatz 30 µl entnommen, mit demselben Volumen 2x CVL-Puffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Bis zum Auftragen auf das Gel wurden die Proben bei -20°C gelagert. Für alle Zeitpunkte wurde immer das gleiche Volumen auf das Gel geladen. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde die Signalstärke des noch vorhandenen PrP^{Sc} nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h mit der Quantity One Software ermittelt. Die Signalstärke nach einstündigem PK-Verdau wurde mit 100 % angesetzt. Mit der Excel Kalkulationssoftware ermittelte man relativ dazu die Anteile des noch vorhandenen PrP^{Sc} nach 6 h, 24 h und 48 h.

3.2.9 Deglykosylierung

Die Deglykosylierung wurde am Schaf- und als Kontrolle am Rindermaterial nach PTA-Fällung (mit und ohne PK-Verdau) durchgeführt. Als klassisches Scrapieisolat wurde für die Deglykosylierungsversuche das Schaf S 33/02 verwendet, als atypische Scrapieisolate die Schafe S 39/02 und S 40/04 und als BSE-Isolat das Rind R 128/04. Das Pellet, das man aus der PTA-Fällung erhielt, wurde in 60 µl Sucrose-DOC-NP40 Lysispuffer aufgenommen. 54 µl dieser Probe wurden mit 6 µl Denaturierungspuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach wurde die Probe geteilt und je 25 µl der Probe mit 3 µl Natriumphosphat-Puffer und 4 µl PNGase F (Endkonzentration 0,125 Units/µl) bzw. A. bidest. versetzt. Dann wurden die Proben für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, danach mit 30 µl 2x CVL-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das SDS-Gel aufgetragen wurden.

3.2.10 Proteinase K-Stabilität

Zur Ermittlung der PK-Stabilität wurden die Gehirnhomogenate der Scrapie- und BSE-Isolate mit unterschiedlichen PK-Konzentrationen inkubiert. Als klassisches Scrapieisolat wurde für die Untersuchungen zur Ermittlung der Stabilität gegenüber Proteinase K das Schaf S 33/02 verwendet, als atypische Scrapieisolate die Schafe S 39/02 und S 40/04, als BSE-Isolat das

Rind R 128/04 und als Negativkontrolle ein negatives Schaf. 100 µl des jeweiligen Homogenates wurden in die PTA-Fällung eingesetzt und mit PK-Konzentrationen von 0, 25, 50, 250, 500 und 1000 µg/ml für eine Stunde bei 55°C verdaut. Das resultierende Pellet wurde in 2x CVL-Puffer aufgenommen, die gleichen Volumina für die verschiedenen PK-Konzentrationen auf ein SDS-Gel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die größere Hälfte des Mäusehirnes wurde für mindestens 48 Stunden in 4%igem, neutral gepuffertem Formalin fixiert. Danach wurde jede Gehirnhälfte sagittal in fünf Scheiben geschnitten, um die für das „Lesion Profile Scoring“ notwendigen Ebenen zu erhalten (Abb. 3.1). Der Schnitt für die Ebene 1 liegt an der Fissura prima des Kleinhirns, an welcher der Umfang des Kleinhirns am größten ist. Durch diesen Schnitt erhält man die Schnittebenen D und D'. Durch den zweiten Schnitt, der durch die Mitte des vorderen Vierhügels (Colliculus superius) führt, trennt man die Gehirnscheibe ab, welche rostral die Ebene C darstellt. Der dritte Schnitt liegt dorsal ca. 1 mm rostral von der Spitze des Dreiecks, welches die Vierhügelplatte an dieser Stelle bildet, und führt ventral durch die Mitte des Infundibulums, welches als kleiner brauner Punkt sichtbar ist. Durch diesen Schnitt erhält man die Ebene B. Für den vierten Schnitt wird das Gehirn umgedreht und direkt am Chiasma opticum geschnitten, so dass man am kaudalen Teil der letzten Gehirnscheibe Ebene A erhält.

Zur Verringerung der Infektiosität wurden die Proben vor der Einbettung für eine Stunde in 98 %ige Ameisensäure gelegt und anschließend unter fließendem Leitungswasser 45 Minuten gespült. Die Einbettung erfolgte im Entwässerungsautomat ASP 300 nach dem Standardprotokoll (s. Kap. 9.2).

Die fünf Scheiben des Gehirnes und die Milz wurden gemeinsam in ein Paraffinblöckchen eingebettet. Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden von den Paraffinblöcken 3 µm dicke Schnitte für die Immunhistologie und 5 µm dicke Schnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen, getrocknet und für mindestens 48 Stunden in einen Wärmeschrank mit einer Temperatur von 60°C verbracht.

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (s. Kap. 9.2). Die Schnitte für die H.-E.-Färbung wurden anschließend für 2 Minuten in 50 %iges Ethanol gestellt, die Schnitte für die Immunhistologie wurden vorbehandelt. Nach der H.-E.-Färbung

bzw. der Immunhistologie wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (s. Kap. 9.2) differenziert und danach mit Entellan eingedeckt.

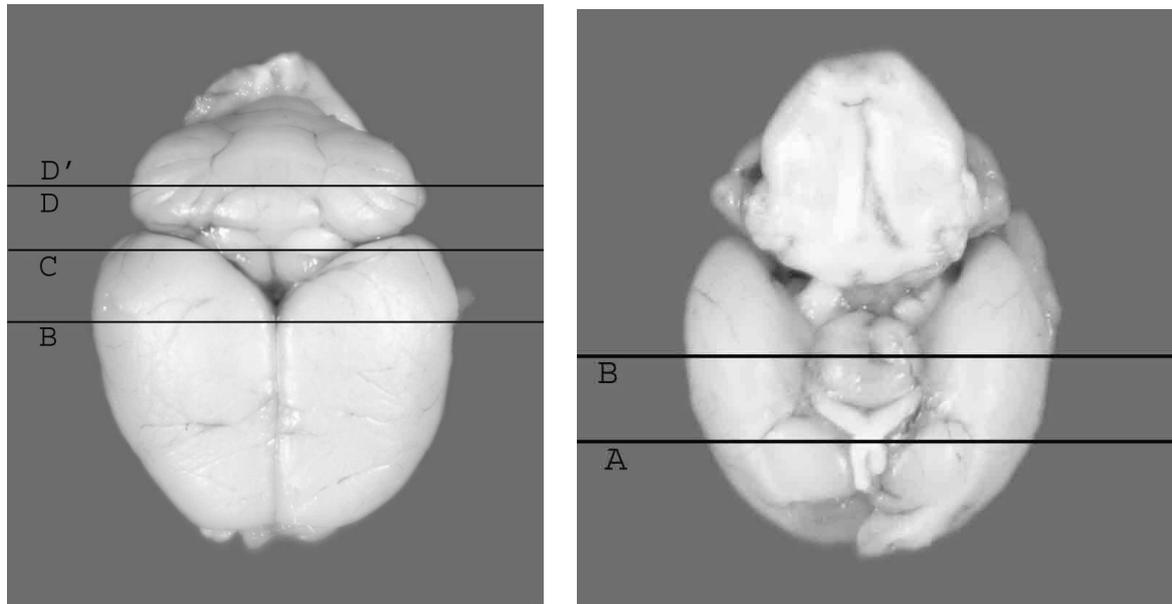


Abb. 3.1: Position der Gehirnschnitte, um die für das „Lesion Profile Scoring“ notwendigen Ebenen zu erhalten (links: Ansicht von dorsal, rechts: Ansicht von ventral).

3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurden die Schnitte für 3 Minuten in A. bidest. inkubiert und dann für 10 Minuten in der filtrierten Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Anschließend erfolgte die Bläuung der Schnitte, indem sie 15 Minuten in Leitungswasser inkubiert wurden. Nach 2minütiger Inkubation in 50%igem Ethanol wurden die Schnitte in Eosin für fünf Minuten gegengefärbt und anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (s. Kap.9.2) entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

3.3.3 Beurteilung der Vakuolisierung (Lesion Profile Scoring)

Zur Bewertung der Gehirnläsionen wurde das zuerst von MOULD et al. (1967) verwendete und später von FRASER und DICKINSON (1968) modifizierte Verfahren, welches auch als „lesion profile scoring“ bzw. „strain typing“ bezeichnet wird, verwendet. Dabei werden neun Regionen der grauen Substanz und drei Regionen der weißen Substanz (Tab. 3.8 und Abb. 3.2 bis 3.7) auf den Grad der Vakuolisierung untersucht. Die Bewertung erfolgt semiquantitativ nach einem Punkteschema von 0 bis 5 Punkten (Tab. 3.9) für die graue Substanz und 0 bis 3 Punkten für die weiße Substanz. Ein Beispiel für jeden Vakuolisierungsgrad ist in Abb.3.2 gezeigt. Neben der Vakuolisierung wurde in der H.E.-Färbung auch das Vorkommen von Plaques und Nervendegenerationen untersucht.

Tab. 3.8: Regionen der grauen und weißen Substanz, die für das Läsionsprofil untersucht wurden

Ebene	graue Substanz		weiße Substanz	
Kleinhirn und Medulla oblongata	1	Nucleus vestibularis medialis und lateralis	1*	Kleinhirn
Kleinhirn und Medulla oblongata	2	Kleinhirnrinde der angrenzenden Folia bis zum 4. Ventrikel		
Mittelhirn	3	Colliculus superior	2*	Decussatio tegmenti dorsalis und ventralis
Zwischenhirn	4	Hypothalamus	3*	Corpus striatum
Zwischenhirn	5	Thalamus		
Zwischenhirn	6	Hippocampus		
Endhirn	7	Septum		
Zwischenhirn	8	Cortex		
Endhirn	9	Cortex		

Tab. 3.9: Bewertung der Gehirnläsionen (MOULD et al. 1967, FRASER und DICKINSON 1968)

Score	Histologisches Bild
0	keine Vakuolen
1	wenige Vakuolen, gleichmäßig verteilt (durchschnittlich 0-4 Vakuolen)
2	wenige Vakuolen, gleichmäßig verteilt (durchschnittlich 10±6 Vakuolen)
3	mäßig viele Vakuolen, gleichmäßig verteilt (durchschnittlich 40±20 Vakuolen)
4	viele Vakuolen, aber nur teilweise konfluierend (durchschnittlich 90±40 Vakuolen)
5	viele Vakuolen, die aber größtenteils konfluieren (durchschnittlich 400±200 Vakuolen)

Die Ähnlichkeit von Läsionsprofilen verschiedener TSE-Stämme kann anhand von Clusteranalysen dargestellt werden (BRUCE et al. 2002). Dabei werden eine bestimmte Anzahl n von Objekten, in diesem Fall die verschiedenen Vakuolisierungsgrade in den 12 Gehirnregionen von jedem TSE-Isolat in jeder Mauslinie, entsprechend ihren Eigenschaften in Gruppen (Cluster) zusammengefasst, so dass die einzelnen Cluster sowohl möglichst homogen sind als auch gut voneinander getrennt werden können. Vergleicht man die Läsionsprofile innerhalb einer Mauslinie, so kommt man auf $n = 12$. Werden die Läsionsprofile eines Isolates in allen drei Mauslinien bewertet, so ergibt sich aus 12 Regionen in drei Mauslinien die Anzahl $n = 36$. Alle Isolate werden anfangs als separate Gruppe betrachtet, nach Berechnung der euklidischen Distanz werden die beiden Gruppen mit dem geringsten Abstand zu einem Cluster zusammengefasst und erneut die euklidische Distanz aller Gruppen berechnet. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis alle Isolate zu einer Gruppe gehören. Der Abstand der verschiedenen Cluster zueinander wird in einem Dendrogramm dargestellt: Je geringer die

Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate. Die Clusteranalyse wurde mit dem Softwarepaket SIMFIT der Universität Manchester durchgeführt (SIMFIT 2006).

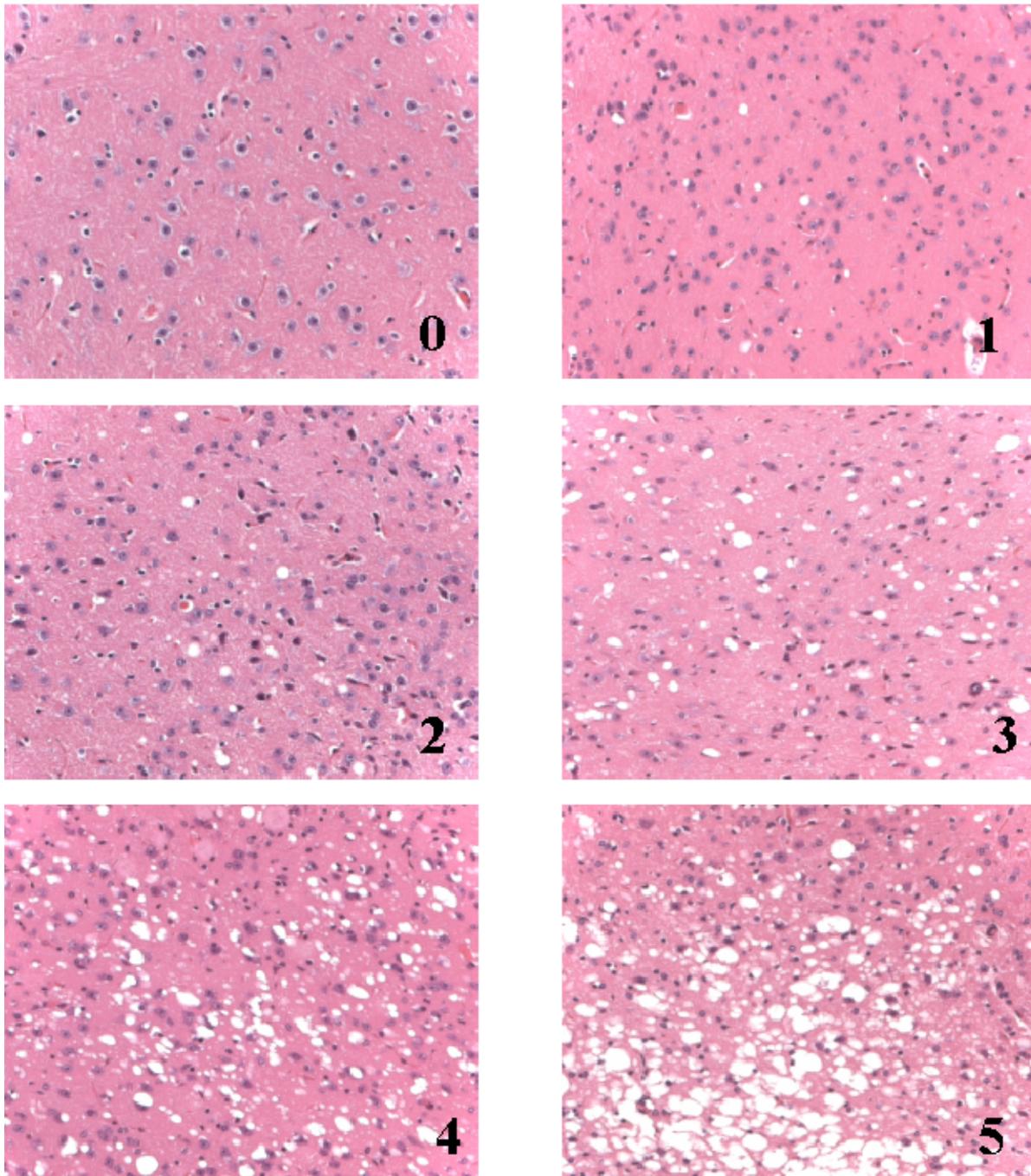


Abb. 3.2: Beispiele für die Beurteilung der Vakuolisierungsgrade in Gehirnen TSE-infizierter Mäuse auf einer Skala von 0 bis 5 Punkten (MOULD et al. 1967, FRASER u. DICKINSON 1968) (eigene Abbildung, H.-E.-Färbung).

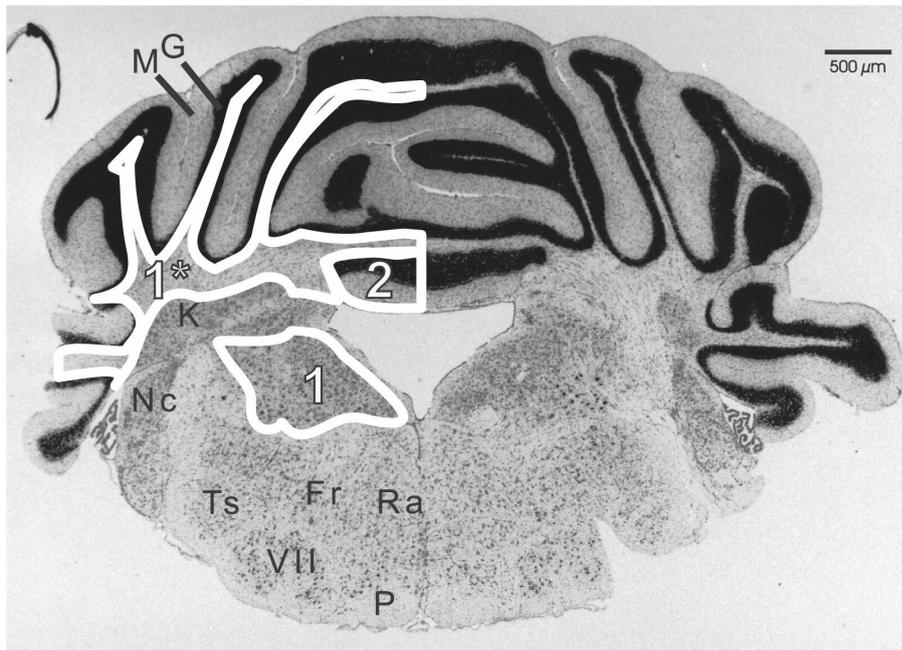


Abb. 3.3: Ebene D, Kleinhirn und Medulla oblongata, Maus (Nissl, Abbildung von F. Junghans). Zahlen und weiße Linien geben die Region zur Bestimmung des Läsionsprofils an, weitere Gehirnregionen sind mit Buchstaben gekennzeichnet.

- | | |
|-----|---|
| 1 | Nucleus vestibularis medialis und lateralis, Nucleus eminentiae medianae, Nuclei tegmenti |
| 2 | Kleinhirnrinde der angrenzenden Folia bis zum 4. Ventrikel (Lingula) |
| 1* | weiße Substanz des Kleinhirns |
| G | Stratum granulare cerebelli |
| M | Stratum medullare cerebelli |
| K | Kleinhirnkerne (Nucleus dentatus, Nucleus emboliformis, Nucleus globosus, Nucleus fastigii) |
| Nc | Nucleus cochlearis dorsalis und ventralis |
| Ts | Nucleus tractus spinalis nervi trigemini |
| Fr | Formatio reticularis |
| Ra | Raphe |
| P | Pyramide |
| VII | Nucleus originis nervi facialis |

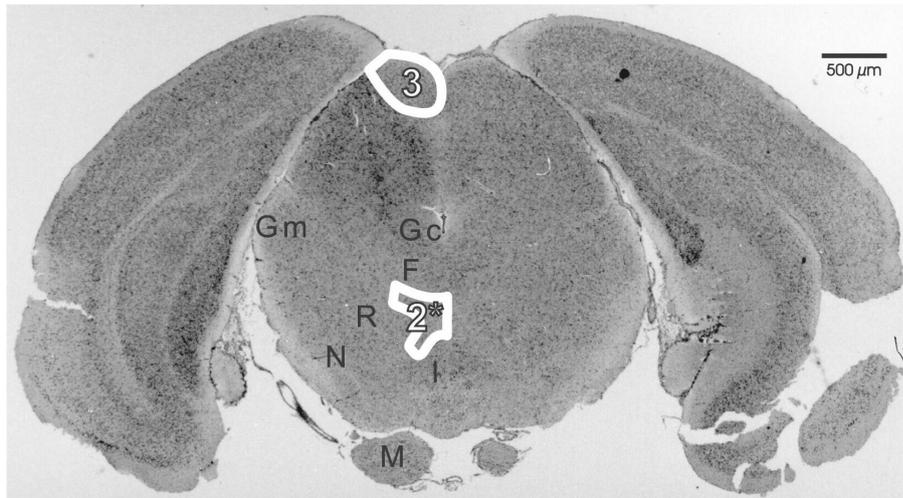


Abb. 3.4: Ebene C, Mittelhirn, Maus (Nissl, Abbildung von F. Junghans). Zahlen und weiße Linien geben die Region zur Bestimmung des Läsionsprofils an, weitere Gehirnregionen sind mit Buchstaben gekennzeichnet.

3	dorsaler Teil des Colliculus superior
2*	Decussatio tegmenti dorsalis und ventralis
Gm	Corpus geniculatum mediale
Gc	Griseum centrale
F	Fasciculus longitudinalis medialis
R	Nucleus ruber
N	Substantia nigra
I	Nucleus interpeduncularis
M	Corpus mamillare

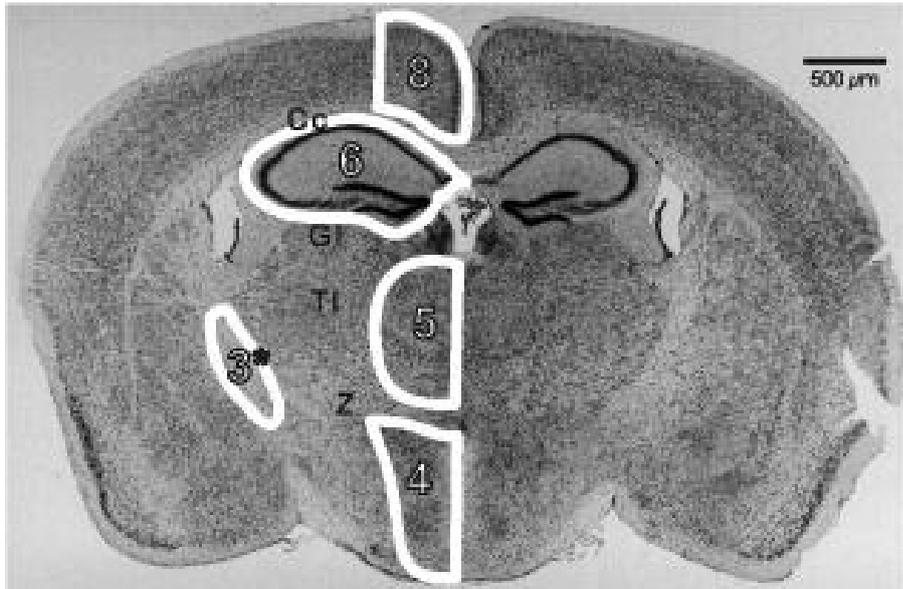


Abb. 3.5: Ebene B, Zwischenhirn, Maus (Nissl, Abbildung von F. Junghans). Zahlen und weiße Linien geben die Region zur Bestimmung des Läsionsprofils an, weitere Gehirnregionen sind mit Buchstaben gekennzeichnet.

- 4 Hypothalamus
- 5 Thalamus, mediale Bereiche
- 6 Hippocampus, bestehend aus Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA1-4), s. Abb.3.5
- 8 Gebiet der Großhirnrinde dorsal des Corpus callosum
- 3* Capsula interna
- Cc Corpus callosum
- Gl Corpus geniculatum laterale
- TI Thalamus, laterale Bereiche
- Z Zona incerta

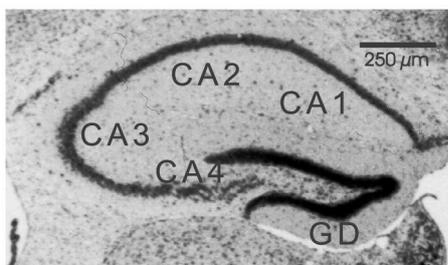


Abb. 3.6: Ausschnitt Ebene B, Hippocampus mit den Bereichen des Cornu ammonis (CA1-4) und Gyrus dentatus (GD), Maus (Nissl, Abbildung von F. Junghans).

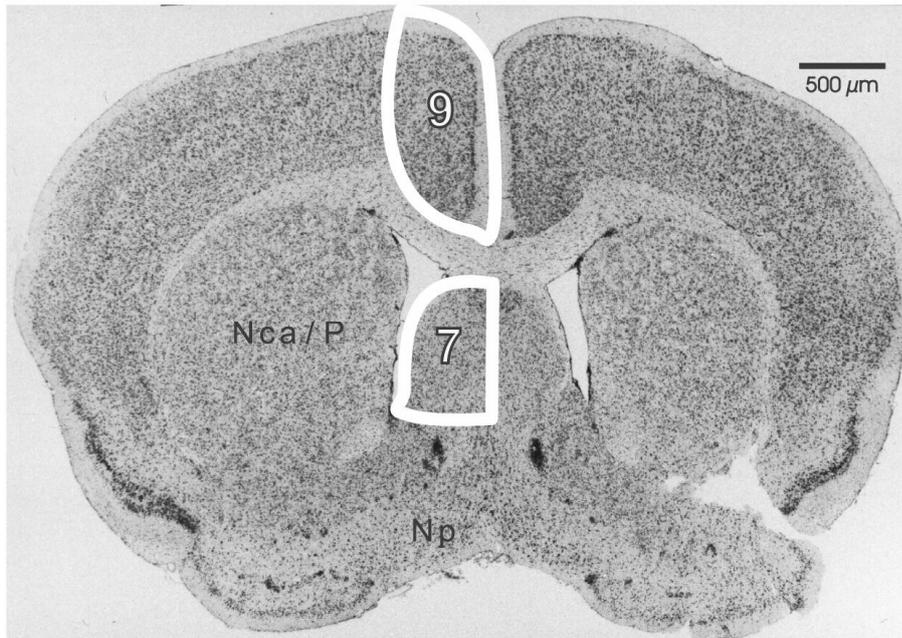


Abb. 3.7: Ebene A, Endhirn, Maus (Nissl, Abbildung von F. Junghans). Zahlen und weiße Linien geben die Region zur Bestimmung des Läsionsprofils an, weitere Gehirnregionen sind mit Buchstaben gekennzeichnet.

7	Septum
9	Gebiet der Großhirnrinde dorsal des Corpus callosum
Nca/P	Nucleus caudatus, Putamen
Np	Nuclei praeoptici

3.3.4 Immunhistologische Methoden

In Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper wurden verschiedene Vorbehandlungen zur Demaskierung der Epitope verwendet. Nach der Entparaffinierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe wurde als erste Vorbehandlung eine 15 minütige Inkubation in 100 %iger Ameisensäure durchgeführt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte danach für fünf Minuten gespült, fünf Minuten im PK-Puffer inkubiert und anschließend für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C und einer PK-Konzentration von 4 μg/ml verdaut. Sofort danach erfolgte ein hydrolytisches Autoklavieren im Dampfkochtopf in A. bidest. bei 121°C für 15 Minuten. Die Schnitte für die GFAP-Färbung wurden nicht mit PK verdaut und anstelle von A. bidest. in 0,1 M Citratpuffer gekocht. Dann fügte man die Objektträger mit einem Tropfen TBS in Coverplates® ein und spülte einmal mit TBS. 100 μl des Primärantikörpers, der in TBS mit 10 % Ziegen Serum und 0,03 % Natriumazid verdünnt wurde (s. Tab. 9.1.2), wurde in die Coverplates® eingebracht und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach

dreimaligem Spülen mit TBS inkubierten die Schnitte für 30 Minuten im 2. Antikörper (biotinylierter Ziege anti Maus bzw. anti Kaninchen s. Tab. 9.1.2, Verdünnung 1:200 bzw. 1:100 für die GFAP-Färbung), der ebenfalls in TBS mit 10 % Ziegen Serum und 0,03 % Natriumazid verdünnt wurde. In der Zwischenzeit wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) angesetzt, da dieser 30 Minuten vor dem Auftragen präinkubieren muß. Pro ml TBS wurden 20 µl der Lösungen A und B zugegeben. Die ABC-Lösung wurde nach dem Spülen der Schnitte aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die Schnitte erneut mit TBS gespült, aus den Coverplates[®] herausgenommen und in eine Küvette gestellt, wo sie für 10 Minuten in der DAB-Lösung inkubierten. Nach dreimaligem Spülen in TBS und kurzem Spülen in A. bidest. wurden die Schnitte 10 Minuten in Hämatoxylin gegengefärbt, 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (s. Kap. 9.2) entwässert und mit Entellan eingedeckelt.

Für die Immunhistologie wurde im allgemeinen Diaminobenzidin (DAB, braun) verwendet, für eine Doppelfärbung wurde außerdem noch Vector-VIP-Substrat (VIP, violett) verwendet. Dabei wurde nach der Inkubation mit dem ABC-Komplex anstelle der DAB-Lösung 100 µl der VIP-Lösung auf die Schnitte aufgetragen und für 10 Minuten inkubiert. Die VIP-Lösung wurde wie folgt angesetzt:

Lösung 1, 4 30 µl pro ml PBS,

Lösung 2, 3 20 µl pro ml PBS.

Als Kontrollen wurden bei jeder immunhistologischen Färbung eine PrP^{Sc}-positive und eine PrP^{Sc}-negative Maus mitgeführt, die einmal mit und einmal ohne ersten Antikörper inkubiert wurden.

3.3.5 Beurteilung der immunhistologischen Präparate

Die Untersuchung der Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop unter Verwendung von 2,5x, 10x, 20x und 40x Objektiven.

Bei der PrP^{Sc}-Färbung wurde das Vorkommen, die Lokalisation und der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerungen beurteilt. Mäuse, welche mit einem klassischen Scrapieisolat inokuliert worden waren und die im Western Blot ein schwaches oder negatives Signal zeigten, wurden in der Immunhistologie auf PrP^{Sc} untersucht. Pro untersuchtem klassischem Scrapieisolat und Mauslinie wurden die PrP^{Sc}-Färbung jedoch an mindestens sechs Mäusen durchgeführt. Bei den atypischen Scrapieisolaten wurden alle Mäuse, bei denen ein Teil des Gehirns in Formalin fixiert worden war, in der Immunhistologie auf PrP^{Sc} untersucht. Da PrP^{Sc} auch schon vor

dem Auftreten von Vakuolen zu finden sein kann und TSE-bedingte Vakuolen nie ohne gleichzeitige PrP^{Sc}-Ablagerungen zu finden sind, dient diese Färbung gleichzeitig zum Ausschluss des alleinigen Auftretens von altersbedingten Vakuolen.

Bei der GFAP-Färbung wird fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP) markiert und dient der Identifizierung von Astrozyten und astrozytären Zellen. GFAP ist ein intrazytoplasmatisches Filamentprotein, welches als Teil des Zellgerüsts in Astrozyten exprimiert wird. Mit Hilfe dieser Färbung kann eine gesteigerte Proliferation von Astrozyten (Gliose) nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten gleichaltrige, uninfizierte Mäuse.

3.4 Erhaltene Dienstleistungen

3.4.1 Schnellteste, Diagnostik

Die Ergebnisse der Schnellteste (BioRad Platelia, Prionics Check LIA, Prionics Check Western Blot, Enfer TSE test) sowie die Ergebnisse in der Immunhistologie und im O.I.E. Western Blot wurden im Rahmen der Routinediagnostik am FLI bei den Scrapieisolaten (s. Tab. 3.2 und 3.4) ermittelt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden sie den entsprechenden Scrapieisolaten im Kapitel 3.1.1 zugeordnet.

3.4.2 Genotypen, Alter, Rasse und Todesart der Scrapieisolate

Die Genotypen der Scrapieisolate sowie die Angaben über Alter, Rasse und Todesart der einzelnen Scrapiefälle (s. Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3) wurden vom Institut für Tierzucht und Genetik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden sie den entsprechenden Scrapieisolaten im Kapitel 3.1.1 zugeordnet.

3.4.3 Kontrollen

Zur Vermeidung und Reduktion von Tierversuchen wurden bei den Positivkontrollen (Scrapie, BSE Höxter) und Negativkontrollen (isotonische Kochsalzlösung, negatives Schafsgehirn) in den RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen auf die im Rahmen einer Dissertation in der Arbeitsgruppe am FLI (JUNGHANS 2004) durchgeführten Versuche zurückgegriffen (Tab. 3.10).

Das Gehirn des PrP^{Sc}-negativen Schafes stammte vom Schlachthof Teterow. Das Schaf hatte den Genotyp ARQ/ARQ. Im O.I.E. Western Blot konnte bei diesem Schaf kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Bei dem BSE-Isolat Höxter handelte es sich um ein Rind der Rasse Galloway, das 1990 aus dem Vereinigten Königreich nach Deutschland importiert worden war. Die Kuh war am

29.3.1989 geboren und verendete am 27.12.1996 im Landkreis Höxter (Nordrhein-Westfalen). Im Januar 1997 wurde das Gehirn dieses Rindes im Rahmen des damaligen Monitoring-Verfahrens an der BFAV in Tübingen im O.I.E. Western Blot untersucht und es konnte eindeutig PrP^{Sc} nachgewiesen werden.

Tab. 3.10: Übersicht über die Inokulationen der Kontrollen in RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen

Inokulat	Mauslinie			c (%)	Medi- um	70°C, 10 min	i.c. (µl)	i.p. (µl)
	RIII	VM95	C57Bl6					
Schaf negativ	9	10	9	10	NaCl	nein	20	100
NaCl	9	9	7	-	NaCl	nein	20	100
BSE Höxter	10	10	9	10	NaCl	nein	20	100
	11	11	10	10	MEM	nein	20	100

c Konzentration i.c. intracerebral i.p. intraperitoneal

MEM Minimum Essential Medium

Bei der BSE-Kontrolle wurde jeweils ein Inokulat mit MEM und eines mit Kochsalzlösung hergestellt. Aufgrund der geringen Abweichungen zwischen den beiden Gruppen wurde auf eine separate Darstellung der beiden Inokulationsgruppen verzichtet.

Die Übertragungsraten und Inkubationszeiten sind zur besseren Vergleichbarkeit bei den Ergebnissen dargestellt. Die histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen wurden zum Nachweis der Reproduzierbarkeit und zum Ausgleich methodisch bedingter Abweichungen erneut durchgeführt.

Aus der Arbeitsgruppe am FLI wurden weiterhin zwei Positivkontrollen für die Tgshp-Mäuse zur Verfügung gestellt (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Erstinfektion von Tgshp-Mäusen mit einem Isolat oviner BSE und Subpassage des BBP12/92 in Tgshp-Mäusen

Inokulat	Mauslinie		c (%)	Medium	70°C, 10 min	i.c. (µl)	i.p. (µl)
	Tgshp XI	Tgshp IX					
BSE Schaf	8	-	10	NaCl	nein	30	-
BBP12/92 in Tgshp IX	-	7	10	NaCl	nein	30	-

c Konzentration i.c. intracerebral i.p. intraperitoneal

Die Übertragungsraten und Inkubationszeiten sind zur besseren Vergleichbarkeit bei den Ergebnissen dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate

4.1.1 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Schaf (FLI-Test)

36 klassische Scrapie-Feldisolate, ein BSE-Isolat aus dem Rind R128/04, die BSE-Positivkontrolle für die Bestätigungsuntersuchungen (ein Gemisch aus mehreren BSE-positiven Hirnstammproben, kurz: ‚BSE-Pool‘) und ein Isolat oviner BSE wurden im FLI-Test untersucht. Dazu wurden die Glykosylierungsverhältnisse, die Molekularmasse und das Antikörperbindungsverhältnis bestimmt (Tab. 9.3.1).

4.1.1.1 Glykosylierungsverhältnisse

Die Glykosylierungsverhältnisse für die einzelnen Isolate sind in Abb. 4.1 dargestellt. Der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande am Gesamtsignal des PrP^{Sc} im Western Blot war bei den bovinen und ovinen BSE-Isolaten deutlich höher als bei den meisten der untersuchten Scrapieisolate. Das Verhältnis der diglykosylierten zur monoglykosylierten PrP^{Sc}-Bande lag bei dem ovinen BSE-Isolat bei 55:32% und bei dem bovinen BSE-Isolat bei 53:32%. Dagegen lag der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande bei 32 der untersuchten Scrapieisolate zwischen 38 und 48% und der Anteil der monoglykosylierten PrP^{Sc}-Bande zwischen 32 und 37%. Nur ein Scrapieisolat, S 32/02, zeigte mit 51% einen sehr hohen Anteil an diglykosyliertem PrP^{Sc}. Bei drei Scrapieisolaten lagen die Signalstärken für die Glykosylierungsverhältnisse unterhalb des linearen Bereichs am VersaDoc Imaging System, so dass bei ihnen die Glykosylierungsverhältnisse nicht bestimmt werden konnten.

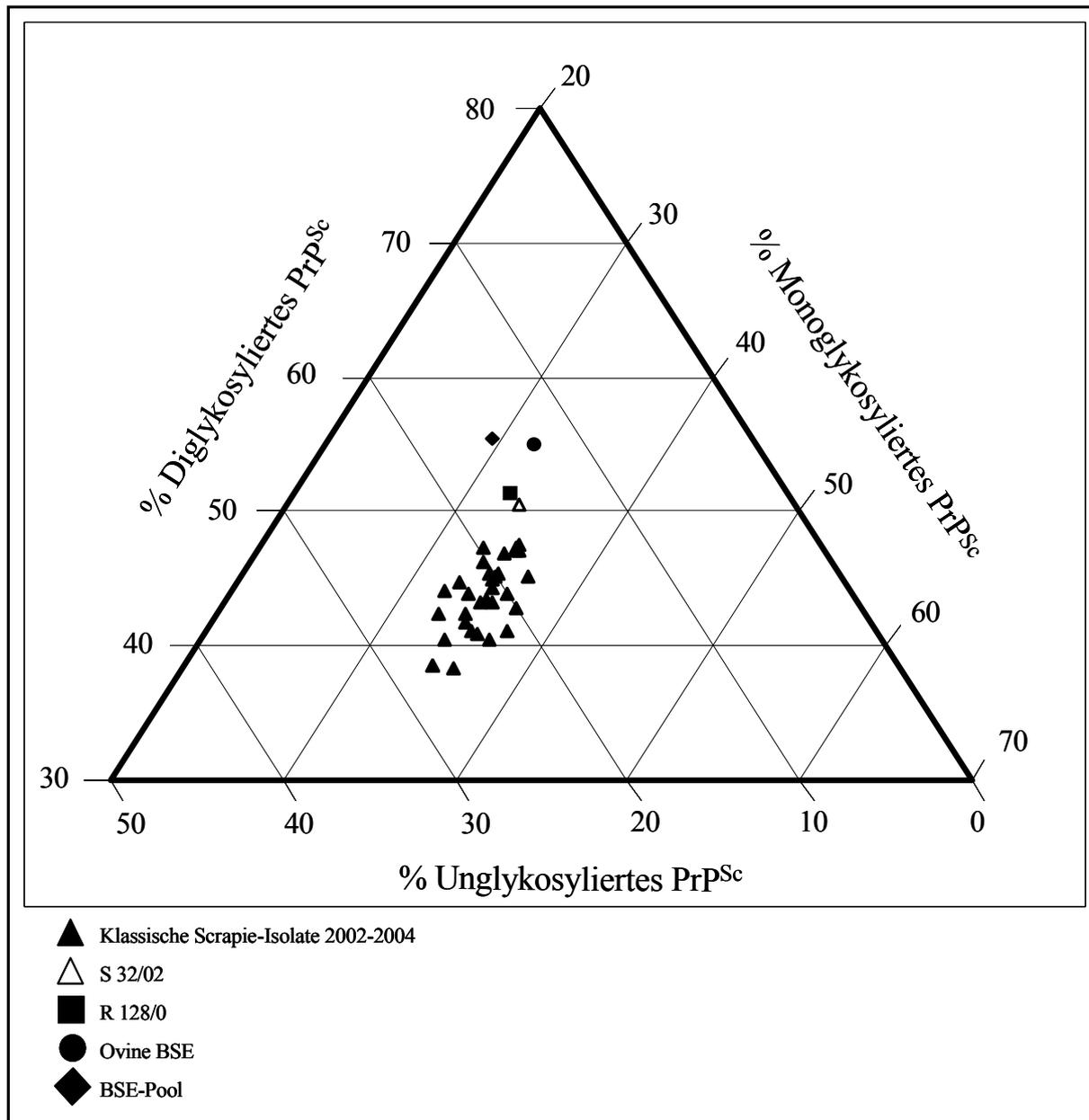


Abb. 4.1: Dreiecksdiagramm der Glykosylierungsverhältnisse des PrP^{Sc} von 33 klassischen Scrapieisolaten, zwei BSE-Isolaten und einem Isolat oviner BSE. Der prozentuale Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande ist auf der linken Achse, der prozentuale Anteil der monoglykosylierten PrP^{Sc}-Bande ist auf der rechten Achse und der prozentuale Anteil der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande auf der horizontalen Achse angegeben.

4.1.1.2 Molekulare Masse

Die Molekularmasse aller untersuchten Isolate ist in den Abb. 4.2 und 4.3 dargestellt. Bei allen 36 untersuchten Scrapieisolaten war die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande höher als bei den Isolaten boviner und oviner BSE. Die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande betrug 17,5 kDa bei dem bovinen BSE-Isolat und 17,4 kDa bei dem ovinen BSE-Isolat. Im Gegensatz dazu lag die molekulare Masse bei allen untersuchten Scrapieisolaten zwischen 17,8 und 19,3 kDa.

4.1.1.3 Antikörperbindungsverhältnis

Der MAK P4 detektiert im Western Blot bovine BSE nicht und ovine BSE nur sehr schwach. Im Gegensatz dazu erkennt er PrP^{Sc} von Scrapie oft sogar noch stärker als der MAK L42 (Abb.4.2).

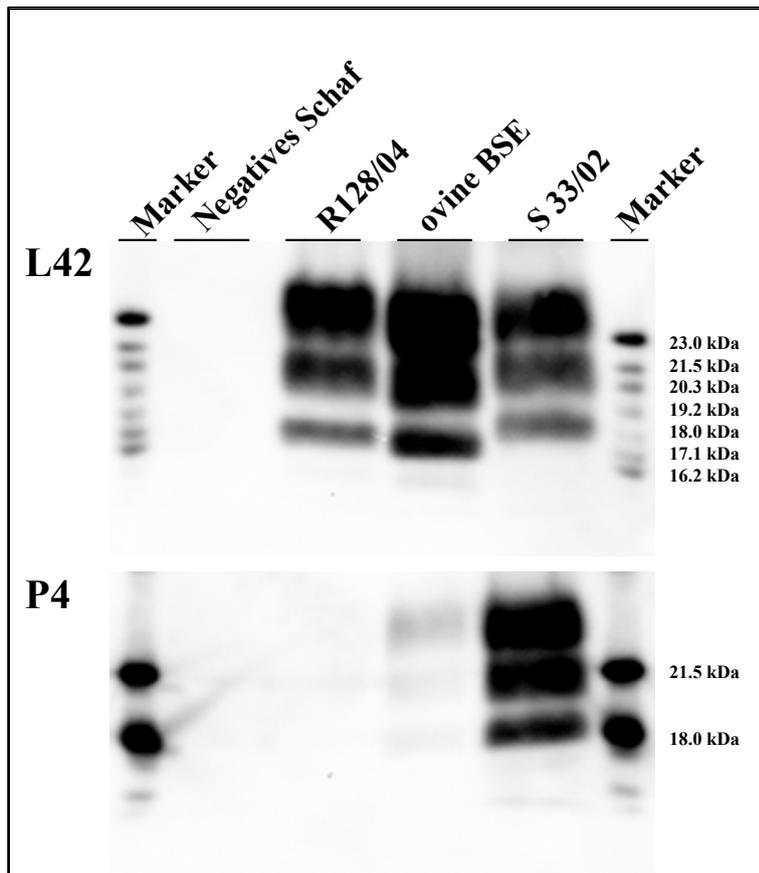


Abb. 4.2: Vergleich der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande und der Antikörperbindung von MAK L42 und MAK P4 bei einem BSE-Isolat (R 128/04), einem Isolat oviner BSE und dem klassischen Scrapieisolat S 33/02 (Western Blot, Antikörper L42 bzw. P4, Marker: Histidin- bzw. P4-markierter FLI-Marker).

Das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 im Western Blot war bei dem bovinen BSE-Isolat und bei dem ovinen BSE-Isolat niedriger als bei allen untersuchten Scrapieisolaten (Abb. 4.4). Der Wert für die bovine BSE betrug 0,1, für die ovine BSE 0,2. Bei 33 der untersuchten Scrapieisolate lag der Wert für das Antikörperbindungsverhältnis zwischen 0,8 und 2,0. Die Scrapieisolate S 23/02 und S 45/04 zeigten einen sehr hohen Wert für das Antikörperbindungsverhältnis mit 3,3 und 2,4. Das Antikörperbindungsverhältnis für das Scrapieisolat S 5/02 betrug dagegen 0,4.

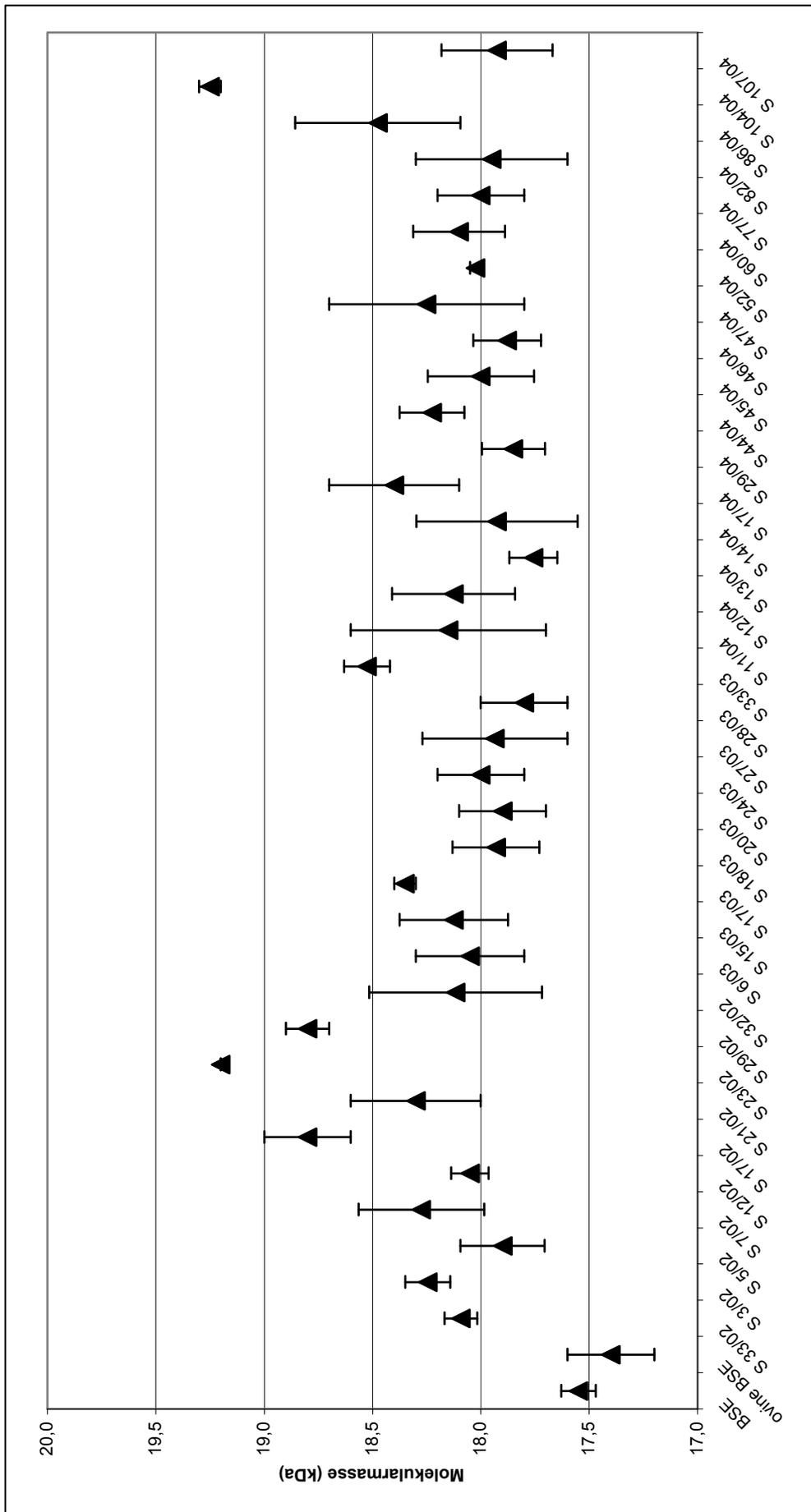


Abb. 4.3: Molekularmasse in kDa der unglykosylierten Bande des PrP^{Sc} von 36 deutschen klassischen Scrapieisolaten, einem BSE-Isolat (R 128/04) und einem Isolat oviner BSE.

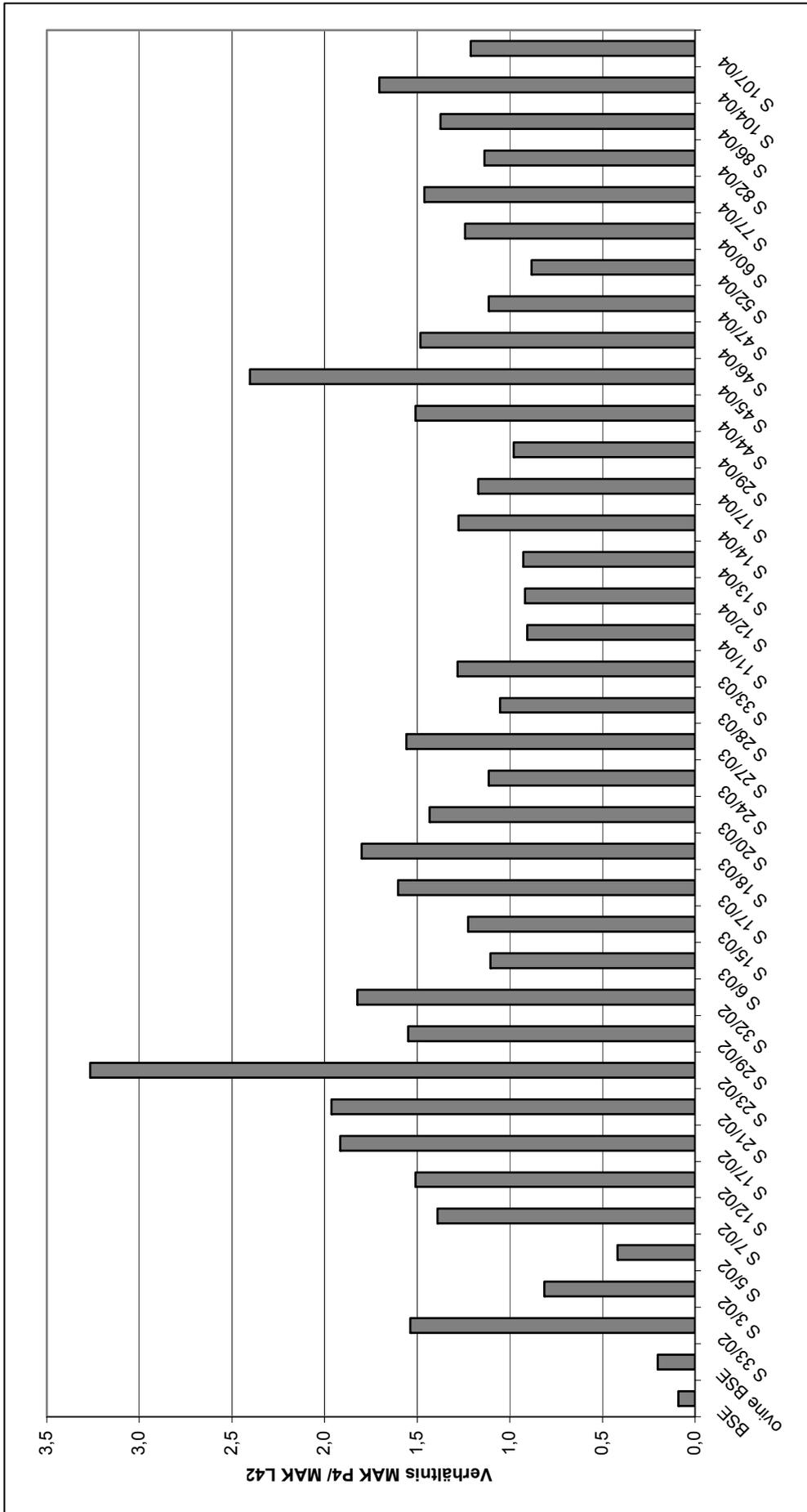


Abb. 4.4: Antikörperbindungsverhältnis MAK P4/ MAK L42 von 36 deutschen klassischen Scrapieisolaten, einem BSE-Isolat (R128/04) und einem Isolat oviner BSE.

4.1.2 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate in der Maus

4.1.2.1 Kontrollen

Bei den Negativkontrollen in den RIII-, VM95- und C75Bl6-Mäusen wurde auf die im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation am FLI durchgeführten Versuche (JUNGHANS 2004) zurückgegriffen. Keine dieser mit NaCl oder negativem Schafsgehirn inokulierten Mäuse zeigte klinische Symptome und es konnte bei diesen Mäusen weder in der Immunhistologie noch im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen wurden außerdem Tgshp-Mäuse mit NaCl und negativem Schafsgehirn inokuliert. Auch in diesen beiden Gruppen zeigte keine Maus klinische Symptome und es konnte bei keiner der Mäuse in der Immunhistologie oder im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Tab. 9.3.2).

Bei den Positivkontrollen in den RIII-, VM95- und C75Bl6-Mäusen wurde auf die im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation am FLI durchgeführten Versuche (JUNGHANS 2004) zurückgegriffen. Da von dem für diese Versuche verwendeten Rind („BSE Höxter“) kein Material mehr zur Verfügung stand, wurde bei den Tgshp-Mäusen ein Gemisch aus britischen BSE-positiven Hirnstämmen („BBP12/92“) verwendet. Für die Etablierung des Langzeit-PK-Verdaus und der Untersuchungen zum Antikörperbindungsverhalten in den Tgshp-Mäusen wurden neben „BBP12/92“ drei weitere BSE-Isolate und ein Scrapieisolat als Positivkontrollen verwendet. Das Material aus den Infektionsversuchen „Ovine BSE in Tgshp XI“ und „BBP12/92 in Tgshp IX“ wurde aus der Arbeitsgruppe am FLI zur Verfügung gestellt.

4.1.2.2 Übertragungsraten und Inkubationszeiten

Die Inkubationszeiten aller mit klassischen Scrapieisolaten inokulierten Mauslinien sind in Abb. 4.5 und Tab. 9.3.3 dargestellt. Die Inkubationszeit war bei allen Isolaten in den Tgshp-Mäusen am kürzesten. Die kürzesten Inkubationszeiten wurden mit 150 Tagen nach Übertragung des Isolats S 5/02 und mit 180 Tagen nach Übertragung der Isolate S 13/02 und S 33/02 beobachtet. Darauf folgt das Isolat S 32/02 mit 245 Tagen Inkubationszeit und die drei Isolate S 17/02, S 29/02 und BSE BBP12/92 mit etwa 300 Tagen. Lediglich das Isolat S 30/02 wies in den Tgshp-Mäusen mit 500 Tagen eine sehr lange Inkubationszeit auf, die nur geringfügig kürzer als in den RIII-Mäusen war. Die Inkubationszeiten in den RIII-Mäusen lagen zwischen 300 und 540 Tagen, in den VM95-Mäusen zwischen 390 und 630 Tagen und bei den vier Isolaten, welche in C57Bl6-Mäuse inokuliert worden waren, lagen die Inkubationszeiten zwischen 400 und 600 Tagen. Auffällig waren die sehr kurzen Inkubationszeiten des Isolates S 13/02 und die langen Inkubationszeiten des Isolates S 30/02 in allen Mauslinien.

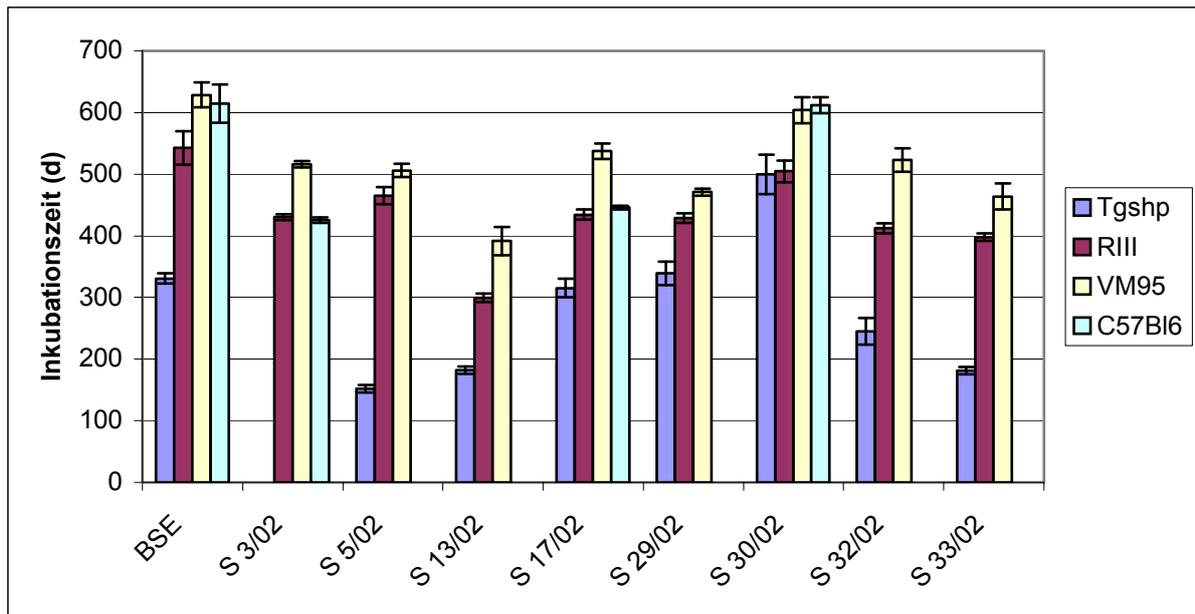


Abb. 4.5: Mittlere Inkubationszeiten der mit BSE und klassischen Scrapieisolaten inokulierten Mauslinien Tgshp, RIII, VM95 und C57Bl6. Die Längsbalken geben den Standardfehler an.

Der Standardfehler der Inkubationszeiten lag bei den Tgshp-Mäusen bei vier Isolaten und bei den RIII-Mäusen bei sechs Isolaten in der Erstpassege deutlich unter 10 %, bei den VM95- und C57Bl6-Mäusen betraf es nur zwei Isolate (Abb. 4.5 und Tab. 9.3.3). Auffällig war der geringe Standardfehler der Inkubationszeiten mit 4 bis 5 % bei dem Isolat S 3/02 in allen inokulierten Wildtypmauslinien.

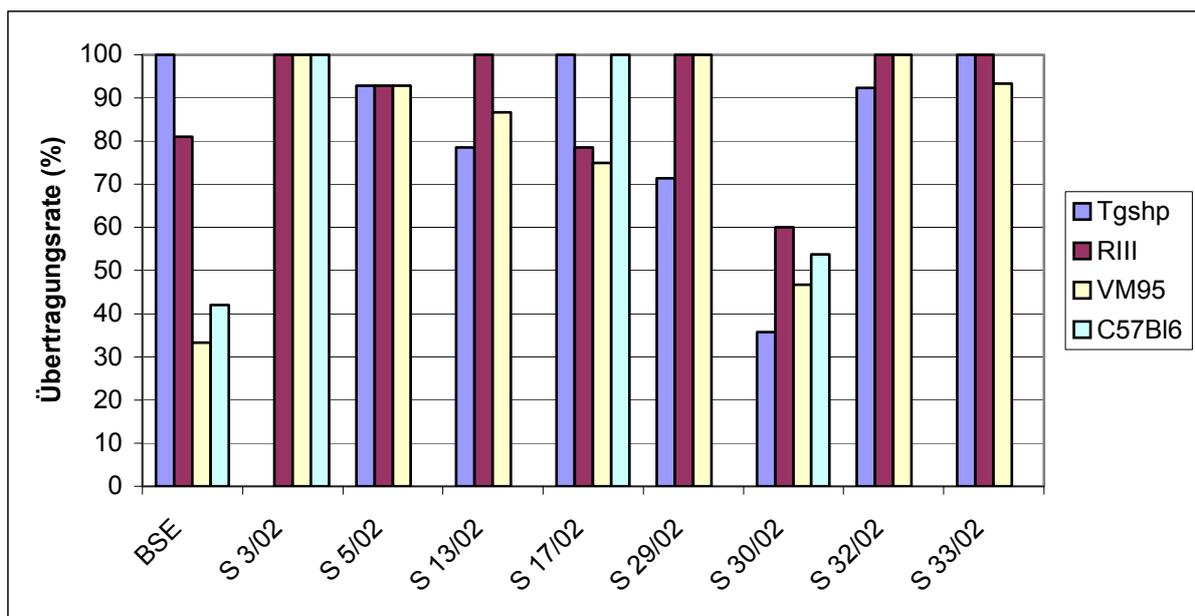


Abb. 4.6: Übertragungsraten der mit BSE und klassischen Scrapieisolaten inokulierten Mauslinien Tgshp, RIII, VM95 und C57Bl6.

Die Übertragungsraten lagen bei allen Isolaten in allen Mauslinien bis auf zwei Ausnahmen zwischen 70 und 100 % (Abb. 4.6 und Tab. 9.3.3). Das Isolat S 3/02 zeigte in allen Mauslinien eine Übertragungsrate von 100 %. Bei dem Isolat S 30/02 traten in allen Mauslinien sehr geringe Übertragungsraten zwischen 30 und 60 % auf. Auch das BSE-Isolat zeigte in den Wildtypmauslinien geringe Übertragungsraten und sehr lange Inkubationszeiten.

In fast allen Mauslinien wurden vereinzelt Tiere mit klinischen Symptomen beobachtet, bei denen der PrP^{Sc}-Nachweis negativ war (Tab. 9.3.3). Bei dem Isolat S 30/02 traten bei 12 von 14 inokulierten Tgshp-Mäusen klinische Symptome auf, nur bei fünf Tieren konnte jedoch PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Auffällig war dabei, dass die Tiere mit klinischen Symptomen ohne nachweisbares PrP^{Sc} Inkubationszeiten von 216 bis 262 Tagen aufwiesen, die Tiere mit klinischen Symptomen und PrP^{Sc}-Nachweis jedoch deutlich längere Inkubationszeiten mit 419 bis 611 Tagen zeigten. Andererseits gab es auch Tiere, die aufgrund anderer Ursachen euthanasiert wurden, ohne klinische Symptome zu zeigen, bei denen der PrP^{Sc}-Nachweis jedoch gelang.

Die Differenz der mittleren Inkubationszeiten von RIII- zu C57Bl6-Mäusen wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch anhand der Isolate BSE Höxter, S 3/02, S 17/02 und S 30/02 ermittelt. Das BSE-Isolat zeigte eine Differenz von etwa 70 Tagen zwischen den Inkubationszeiten von RIII- zu C57Bl6-Mäusen (Abb. 4.7). Die VM95-Mäuse zeigten die längste Inkubationszeit. Bei den Isolaten S 3/02 und S 17/02 reagierten die beiden Mauslinien RIII und C57Bl6 mit kürzeren Inkubationszeiten als die Mauslinie VM95. Der Abstand der Inkubationszeiten von RIII- zu C57Bl6-Mäusen betrug 5 bzw. 12 Tage, der Abstand zu den VM95-Mäusen etwa 90 Tage. Die Inkubationszeit der VM95-Mäuse bei dem Isolat S 30/02 lag zwischen den Inkubationszeiten der RIII- und der C57Bl6-Mäuse.

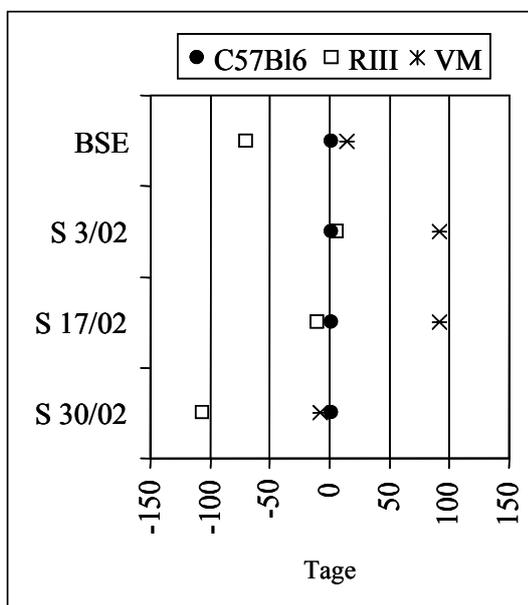


Abb. 4.7: Differenz der Inkubationszeiten von RIII- und VM95-Mäusen zu der Inkubationszeit der C57Bl6-Mäuse. Das BSE-Isolat zeigt den typischen Abstand von 70 Tagen zwischen RIII- und C57Bl6-Mäusen. Das BSE-Isolat, die Isolate S 3/02 und S 17/02 reagieren sinc-homolog, d.h. die Inkubationszeiten der sinc-Mauslinien RIII und C57Bl6 sind kürzer als die Inkubationszeit der VM95-Mäuse.

4.1.2.3 Proteinbiochemische Charakterisierung

Für die Stammdifferenzierung mittels proteinbiochemischer Untersuchung wurden die Gehirne der RIII- und Tgshp-Mäuse genutzt. Da die RIII-Mäuse im Western Blot stärkere Signale als die Tgshp-Mäuse zeigten, wurden die proteinbiochemischen Untersuchungen bei den RIII-Mäusen nach einfachem PK-Verdau, bei den Tgshp-Mäusen nach Anreicherung mittels PTA-Fällung durchgeführt. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind in den Tab. 9.3.5 und 9.3.6 zusammenfassend dargestellt.

Molekularmasse Die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande lag bei mit sieben klassischen Scrapieisolaten infizierten RIII-Mäusen zwischen 18,8 und 19,2 kDa und bei mit fünf klassischen Scrapieisolaten und dem Scrapiestamm Chandler inokulierten Tgshp-Mäusen zwischen 18,7 und 19,3 kDa (Abb. 4.8 und 4.9, Tab. 9.3.5 und 9.3.6). Bei den mit BSE Höxter inokulierten Mäusen betrug die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande 18,5 kDa bei den RIII- und 18,1 kDa bei den Tgshp-Mäusen, bei den mit BSE BBP12/92 inokulierten Tgshp-Mäusen 18,3 kDa. Die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande war bei BSE somit in beiden Mauslinien niedriger als bei den inokulierten klassischen Scrapieisolaten. Auffällig war weiterhin, dass innerhalb der Scrapieisolate, auch wenn sie aus demselben Ausbruch stammten, Unterschiede in der Molekularmasse auftraten.

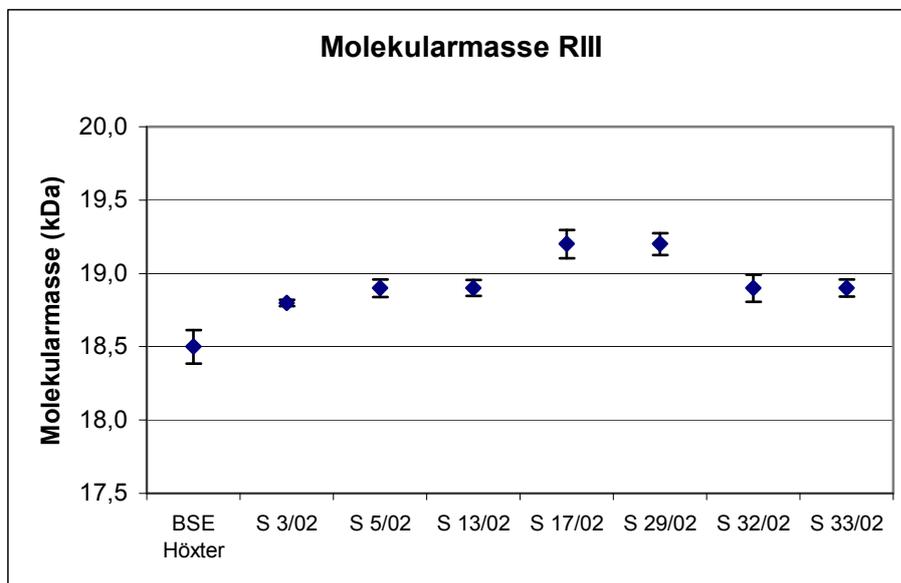


Abb. 4.8: Vergleichende Darstellung der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande von mit BSE Höxter bzw. verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen (Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers).

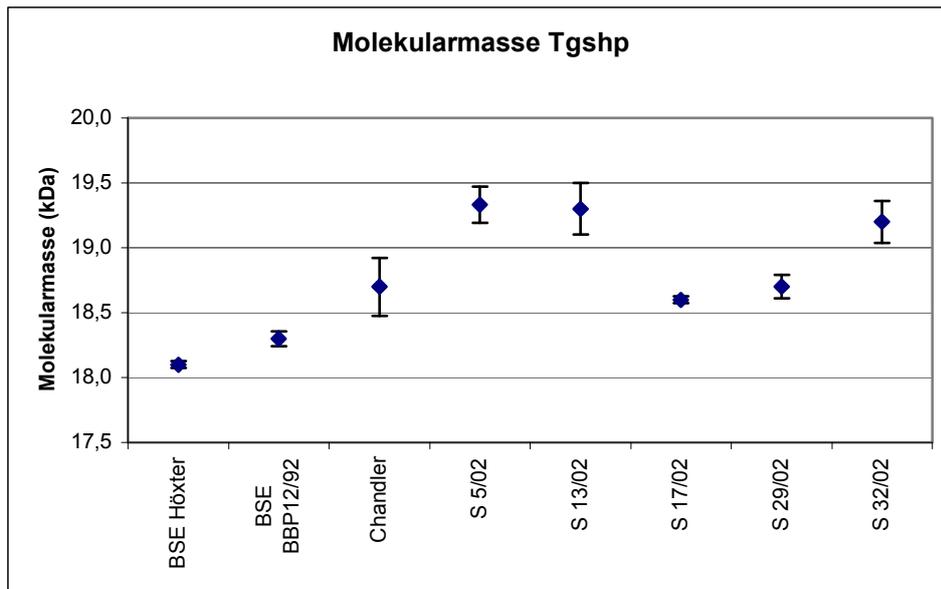


Abb. 4.9: Vergleichende Darstellung der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande von mit BSE Höxter, BSE BBP12/92 bzw. verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen (Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers).

Glykosylierungsverhältnis Der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande war bei den mit BSE Höxter inokulierten RIII-Mäusen mit 52,6 % deutlich höher als bei allen mit sieben klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen (Abb. 4.10 und Tab. 9.3.5), bei denen der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande zwischen 41,5 und 46,4 % variierte.

Bei den Tgshp-Mäusen war diese Abstufung jedoch nur graduell: Neben den beiden BSE-Isolaten BSE Höxter und BSE BBP12/92 zeigten auch die drei Scrapieisolate S 5/02, S 13/02 und S 32/02 eine Dominanz der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande mit mehr als 50 % (Abb. 4.10 und Tab. 9.3.6). Der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande war bei den beiden BSE-Isolaten mit 55,3 bzw. 57,3 % geringfügig höher als bei den drei genannten Scrapieisolaten. Bei den beiden Scrapieisolaten S 17/02 und S 29/02 betrug der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande 44,7 % bzw. 45,8 %. Der Scrapie-Stamm Chandler war das einzige Isolat, bei dem der Anteil der monoglykosylierten Bande mit 39,9 % größer als der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande mit 32,0 % war.

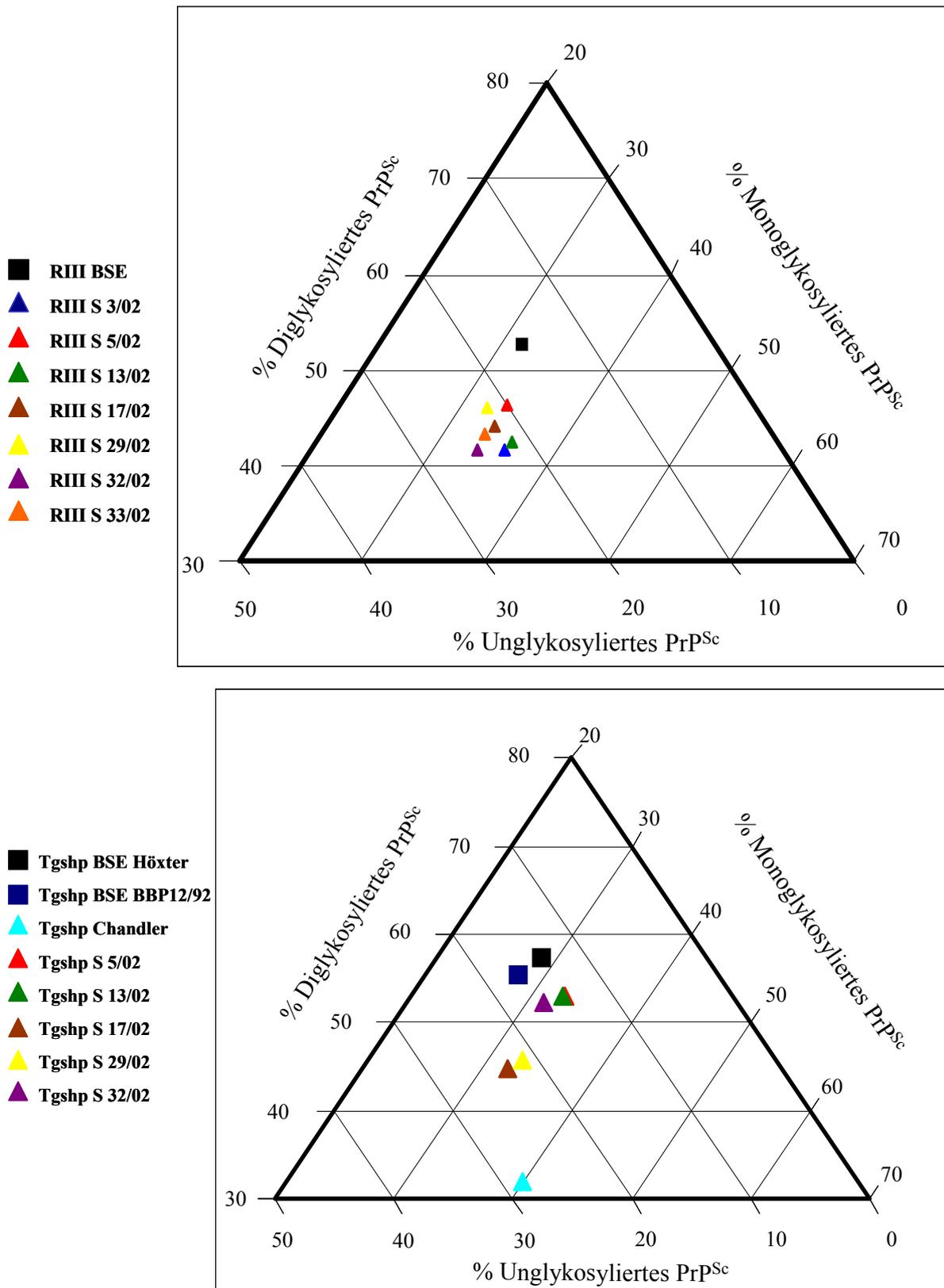


Abb. 4.10: Dreiecksdiagramm zur vergleichenden Darstellung der Glykosylierungsverhältnisse von mit BSE bzw. verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen (obere Abb.) und Tgshp-Mäusen (untere Abb.). Auf der linken Achse ist der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande, auf der rechten Achse der Anteil der monoglykosylierten und auf der unteren Achse der Anteil der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande am Gesamtsignal im Western Blot dargestellt.

Antikörperbindungsverhältnis Die Proben aller mit sieben klassischen Scrapieisolaten und dem BSE-Isolat inokulierten RIII-Mäuse wurden vom PAK Ra10 erkannt. Die MAKs SAF32 und 3B5 detektierten jedoch nur die Proben der mit klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäuse, nicht jedoch die der mit dem BSE-Isolat inokulierten Mäuse (Abb. 4.11 und Tab. 9.3.5).

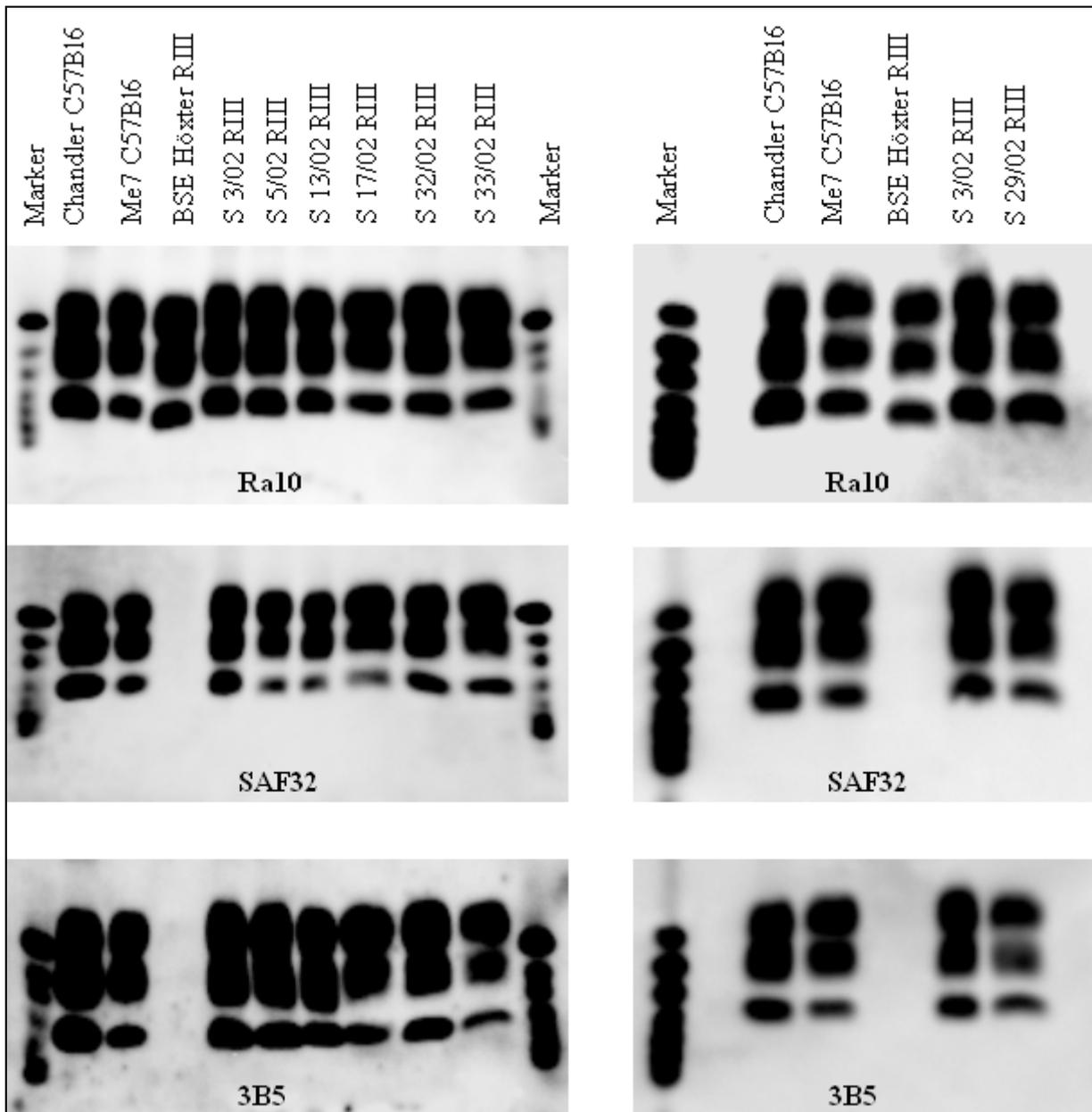


Abb. 4.11: Darstellung des Antikörperbindungsverhaltens der Antikörper SAF32 und 3B5, die im Bereich der PK-Schnittstelle binden, im Gegensatz zum Antikörper Ra10 bei mit BSE Höxter und verschiedenen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen. Die Scrapieisolate Chandler und Me7, welche als Kontrollen verwendet wurden, wurden in C57B16-Mäusen vermehrt (Western Blot, PAK Ra10, MAK SAF32, MAK 3B5; Marker: Histidin-markierter FLI-Marker: 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

Bei den Tgshp-Mäusen wurden die Proben von den drei BSE-Isolaten, dem Isolat oviner BSE, dem Scrapie-Stamm Chandler und den sechs klassischen Scrapieisolaten vom MAK L42 erkannt (Abb. 4.12 und Tab. 9.3.6). Der MAK P4 detektierte eindeutig die Proben der mit dem Scrapie-Stamm Chandler und den Isolaten S 13/02, S 17/02, S 29/02, S 32/02 und S 33/02 inokulierten Tgshp-Mäuse, das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4/L42 lag zwischen 0,8 und 1,4 (Abb. 4.13 und Tab 9.3.6). Die Proben der drei BSE-Isolate, dem Isolat oviner BSE und dem Scrapieisolat S 5/02 wurden vom MAK P4 nur sehr schwach detektiert, das Antikörperbindungsverhältnis lag bei 0,2 bzw. 0,3 bei S 5/02.

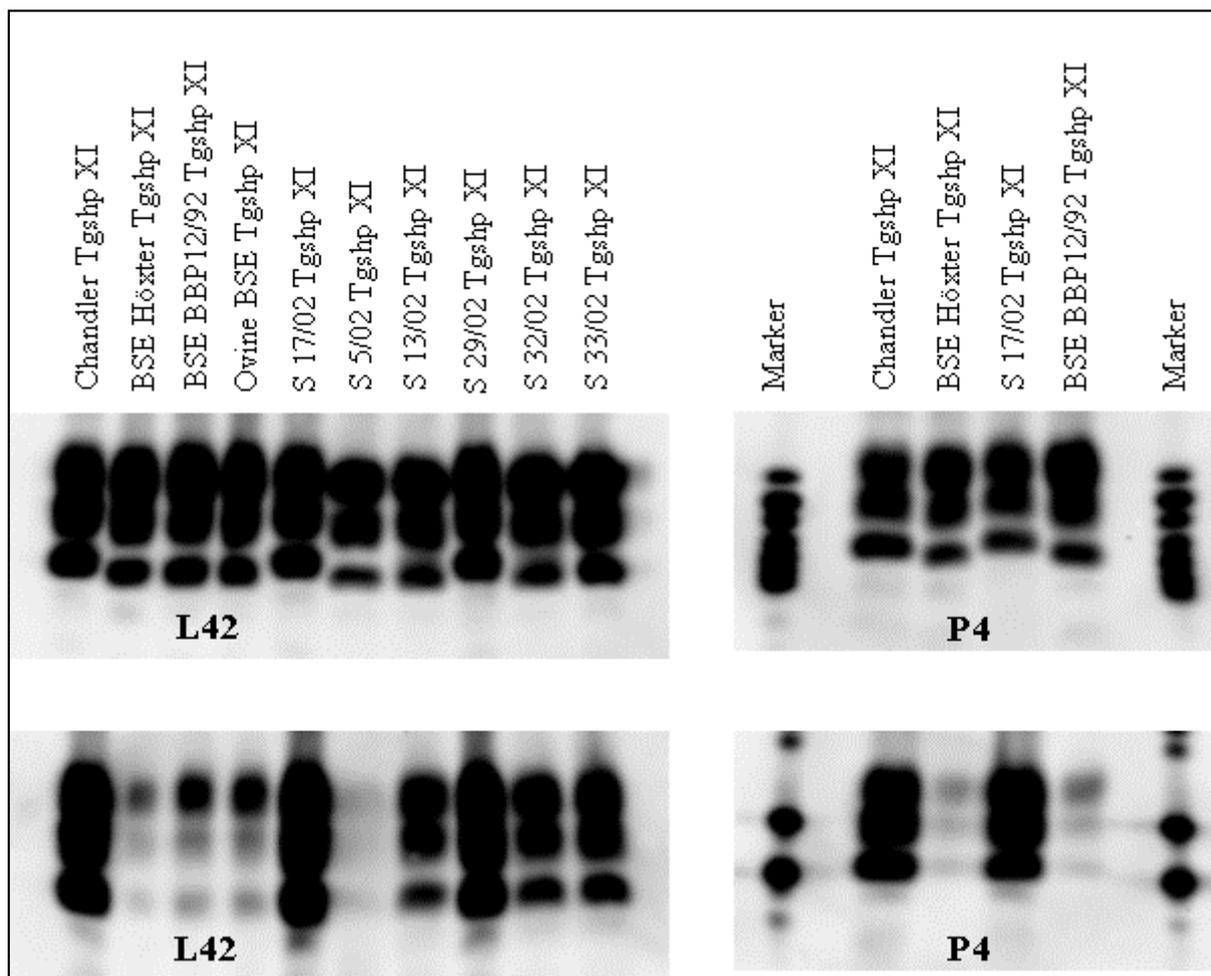


Abb. 4.12: Darstellung des Antikörperbindungsverhaltens des Antikörpers P4, der im Bereich der PK-Schnittstelle bindet, im Gegensatz zum Antikörper L42 bei mit verschiedenen BSE- und Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen (Western Blot, MAK L42, MAK P4; Marker: Histidin-markierter FLI-Marker: 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

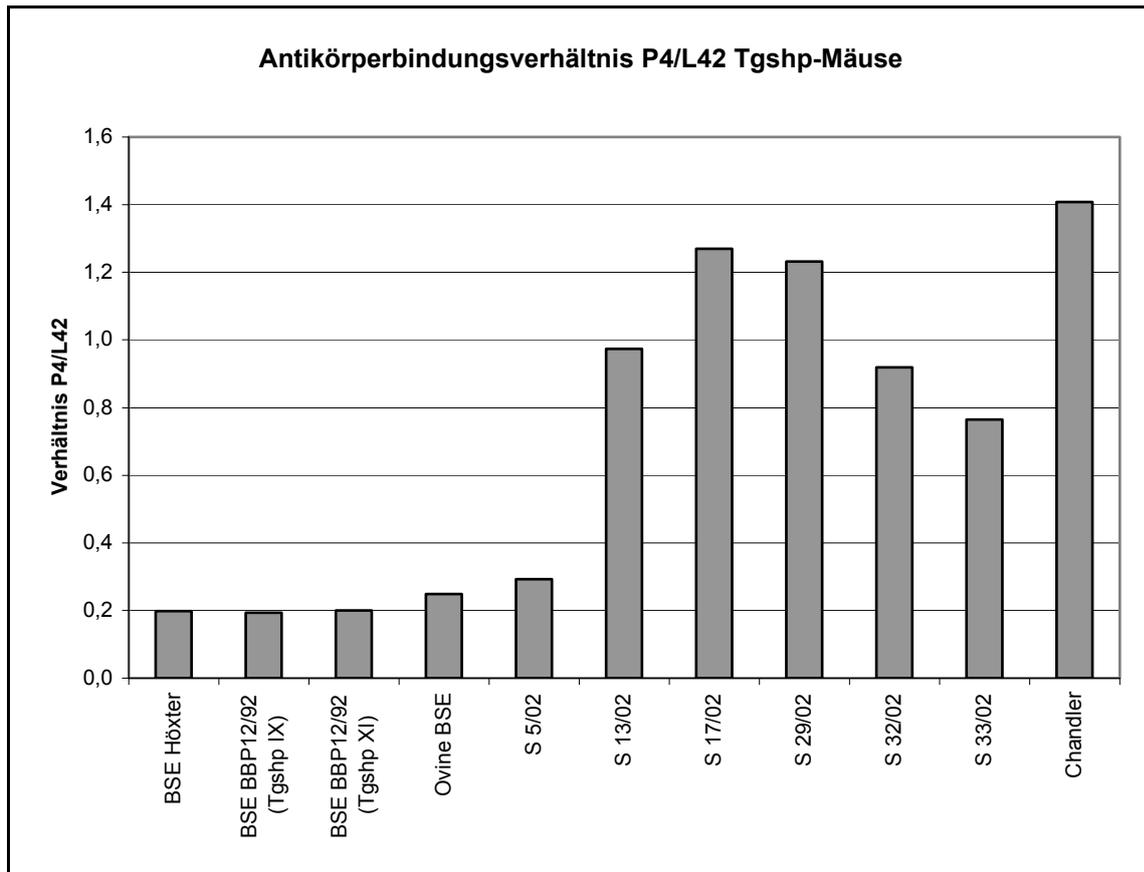


Abb. 4.13: Vergleichende Darstellung des Antikörperbindungsverhältnisses MAK P4/L42 von mit unterschiedlichen BSE-Isolaten bzw. verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen (Mittelwerte aus zwei Gelläufen).

Langzeit-Proteinase K-Verdau In den Proben der RIII-Mäuse zeigte das BSE-Isolat nach 48 Stunden eine deutliche Reduktion der Signalintensität auf 10 % im Gegensatz zu den sieben inokulierten klassischen Scrapieisolaten, welche nach 48 Stunden noch eine Signalintensität von 67 bis 86 % aufwiesen (Abb. 4.14 und Tab. 9.3.5). Anhand der Proben der RIII-Mäuse war die Differenzierung vom BSE- zum Scrapie-Erreger mittels des Langzeit-PK-Verdau eindeutig möglich.

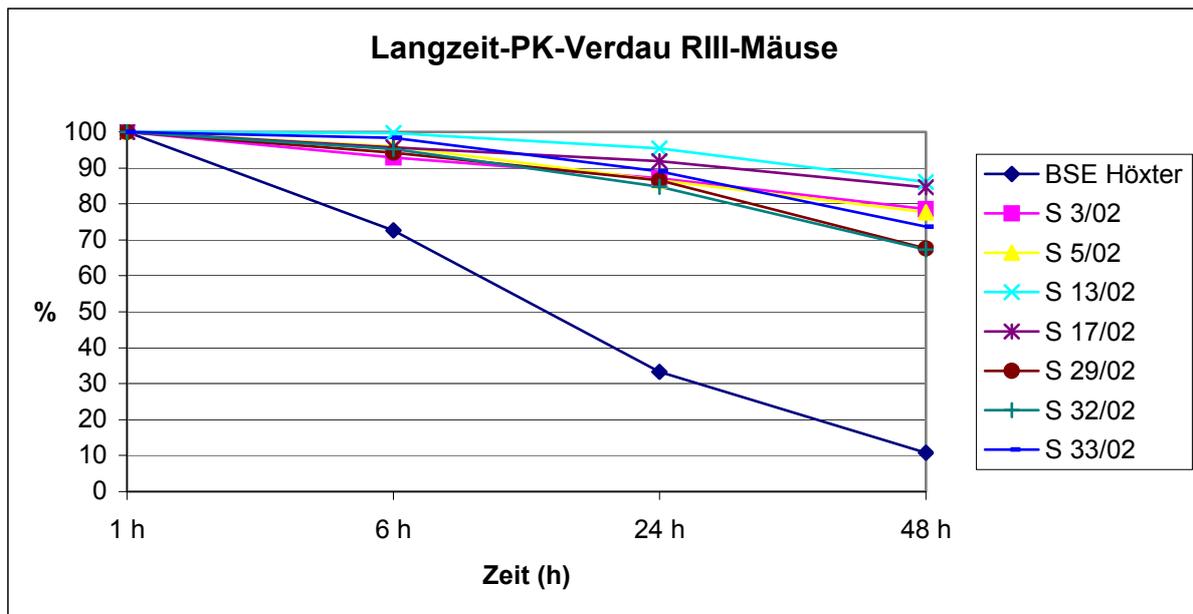


Abb. 4.14: Vergleichende Darstellung der Stabilität des PrP^{Sc} von mit BSE Höxter bzw. verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen. Im Diagramm wird der prozentuale Anteil (Y-Achse) der Signalstärke im Western Blot nach 6, 24 und 48 h (X-Achse) am Gesamtsignal nach einer Stunde PK-Verdau angegeben (Mittelwerte aus 4 Gelläufen, auf die Darstellung des Standardfehlers wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

Bei den Tgshp-Mäusen trat ein davon verschiedenes Verhalten auf: Während bei dem Scrapiestamm Chandler und den Isolaten S 5/02, S 13/02 und S 32/02 eine Verminderung der Signalintensität auf 15 bis 26 % der Ausgangssignalstärke zu erkennen war, trat bei den zwei Scrapieisolaten S 17/02 und S 29/02 eine Verminderung auf 65 bzw. 67 % der Ausgangssignalstärke auf (Abb. 4.15, 4.16 und Tab. 9.3.6). Bei drei untersuchten BSE-Isolaten lag das Restsignal bei 76 bis 77 % und bei dem Isolat oviner BSE bei 70 %. Somit scheint anhand des Langzeit-PK-Verdau bei den Tgshp-Mäusen keine Unterscheidung zwischen BSE und Scrapie möglich zu sein. Auffällig war weiterhin, dass die drei Isolate S 13/02, S 17/02 und S 29/02 aus einem Ausbruch (Güstrow, Mecklenburg Vorpommern) stammten und trotzdem ein voneinander abweichendes Verhalten bei dem Langzeit-PK-Verdau in den Tgshp-Mäusen zeigten.

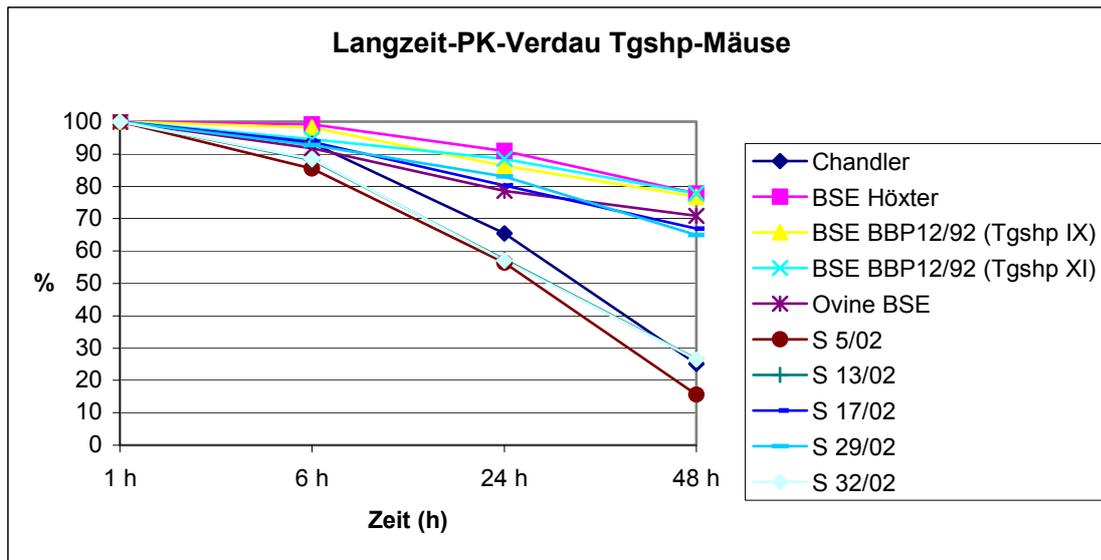


Abb. 4.15: Vergleichende Darstellung der Stabilität des PrP^{Sc} von mit verschiedenen BSE-Isolaten und verschiedenen klassischen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen. Im Diagramm wird der prozentuale Anteil (Y-Achse) der Signalstärke im Western Blot nach 6, 24 und 48 h (X-Achse) am Gesamtsignal nach einer Stunde PK-Verdau angegeben (Mittelwerte aus 4 Gelläufen, auf die Darstellung des Standardfehlers wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

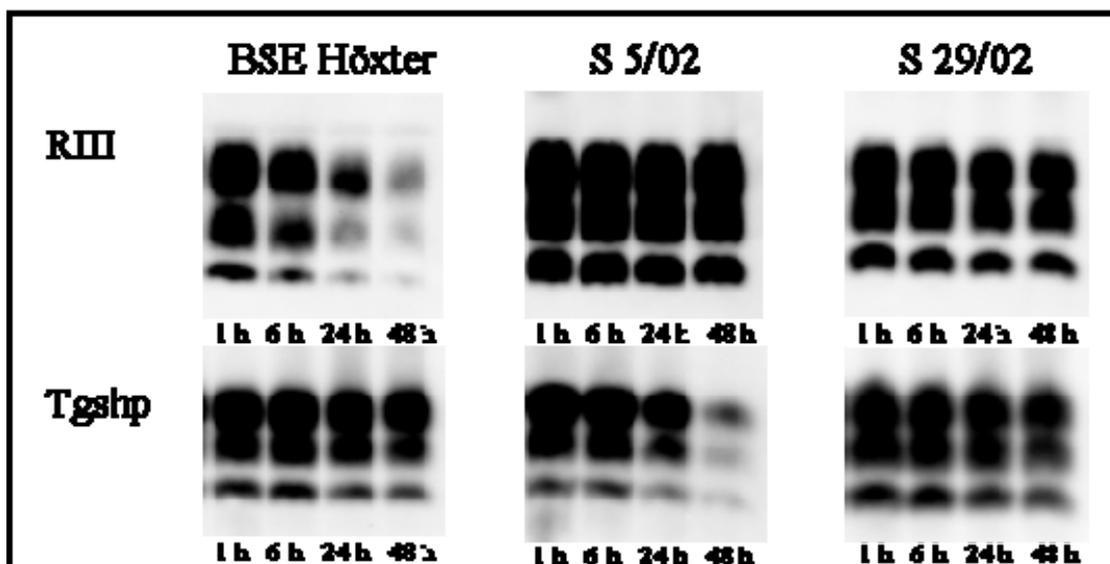


Abb. 4.16: Darstellung der Stabilität des PrP^{Sc} nach PK-Verdau von mit BSE Höxter und den klassischen Scrapieisolaten S 5/02 und S 29/02 inokulierten RIII- und Tgshp-Mäusen nach Inkubationszeiten von 1, 6, 24 und 48 h. Während bei den RIII-Mäusen durch die deutliche Reduktion der Signalstärke bei BSE im Gegensatz zu den klassischen Scrapieisolaten eine Differenzierung zwischen BSE und Scrapie möglich ist, zeigt sich das PrP^{Sc} von BSE bei den Tgshp-Mäusen sehr stabil. Bei den klassischen Scrapieisolaten kam es bei den Tgshp-Mäusen entweder zu einer deutlichen Reduktion der Signalstärke auf 15 bis 25 % (S 5/02) oder zu einer Reduktion auf etwa 65 % der Signalstärke, wie es bei S 29/02 der Fall war (Western Blot, PAK Ra10 (RIII-Mäuse) bzw. MAK L42 (Tgshp-Mäuse)).

4.1.2.4 Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung

Aufgrund der Komplexität der erhaltenen Ergebnisse werden die histopathologischen und immunhistochemischen Befunde zuerst für jedes Isolat einzeln und danach alle Ergebnisse für die klassischen Scrapieisolate vergleichend dargestellt. Der Vakuolisierungsgrad wird anhand der Läsionsprofile sowie in den Tabellen 9.3.7, 9.3.8 und 9.3.9 beschrieben.

Negativkontrollen Bei Wildtypmäusen treten ab einem Alter von etwa zwei Jahren sogenannte Altersvakuolen auf. Sie können als große, unregelmäßige Vakuolen in der weißen Substanz vom Kleinhirn oder seltener in der Decussatio tegmenti oder als kleine, kreisrunde Vakuolen, die über alle Ebenen gleichmäßig verteilt sind, in Erscheinung treten. Bei den mit NaCl oder negativem Schafsgehirn inokulierten Tgshp-Mäusen fanden sich diese Vakuolen schon bei Mäusen ab einem Alter von 300 bis 400 Tagen (Abb. 9.52, 9.54). Die Gliose aller euthanasierten Kontrolltiere diente als altersspezifische Kontrolle (Abb. 9.47).

Positivkontrollen Die mit ‚BSE Höxter‘ (RIII-, VM95-Mäuse) bzw. ‚BBP12/92‘ (Tgshp-Mäuse) infizierten Mauslinien wiesen eine geringe bis mäßige Vakuolisierung auf. Die Läsionsprofile der Einzeltiere waren bei den RIII- und VM95-Mäusen sehr homogen, bei den Tgshp-Mäusen kamen in einzelnen Regionen Abweichungen von bis zu vier Punkten vor.

Das Läsionsprofil der RIII-Mäuse zeigte die Maxima der Vakuolisierung in den Kerngebieten der dorsalen Medulla, im Thalamus und im Septum (Abb. 4.17). Daneben war eine deutliche Vakuolisierung in der Granularschicht des Kleinhirns, im Nucleus ruber und in der Substantia nigra sowie in den lateralen Gebieten des Thalamus nachweisbar. Die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen waren granulär in der Medulla, dorsal im Hypothalamus, im Septum sowie zellulär in den Nuclei vestibulares darstellbar.

Bei den VM95-Mäusen lagen die Maxima der Vakuolisierung in der Medulla oblongata, im Thalamus und im Septum. Eine deutliche Vakuolisierung fand sich weiterhin in der Substantia nigra und im Nucleus interpeduncularis. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster stellte sich vorwiegend granulär dar und betraf Medulla, Hypothalamus und Thalamus sowie deren lateralen Kerngebiete als auch das Septum.

Die dorsalen Kerngebiete der Medulla waren bei den Tgshp-Mäusen am stärksten vakuolisiert, daneben aber auch Hypothalamus und Septum. Die Vakuolisierung trat dabei oft lokal begrenzt auf. In der Medulla waren auch Formatio reticularis und die Raphe deutlich vakuolisiert, auf Ebene C das Gebiet dorsal und ventral der Decussatio tegmenti und die Substantia nigra. Im Corpus callosum fanden sich zahlreiche, oft konfluierende Plaques, die von einer lokalen Vakuolisierung umgeben waren (Abb. 9.1 und 9.3). Die pathologischen Veränderun-

gen griffen z.T. auf den Hippocampus über, vereinzelt waren dort auch Plaques nachweisbar. Bei drei Tieren waren große, unregelmäßige Vakuolen in der weißen Substanz des Kleinhirns darstellbar (Abb. 9.4). Die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen traten in den Nuclei vestibulares und in der Raphe, im Hypothalamus und den Nuclei habenulares, im Corpus callosum als Plaques (Abb. 9.2) und im Septum auf. Die Gliose korrelierte zur PrP^{Sc}-Ablagerung (Abb. 9.5 und 9.6).

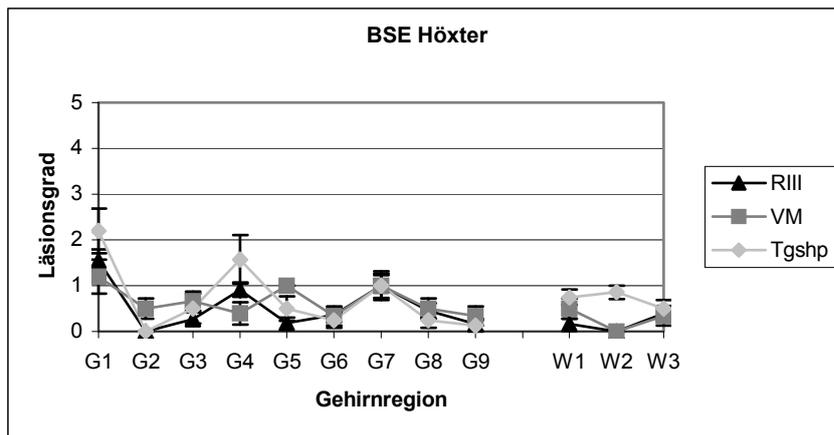


Abb. 4.17: Läsionsprofil der mit ‚BSE Höxter‘ inokulierten Mauslinien.

In neun Gehirnregionen der grauen Substanz (G1 bis G9) und drei Gehirnregionen der weißen Substanz (W1 bis W3) wird der Grad der Vakuolisierung auf einer Skala von 0 bis 5 Punkten angegeben (Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers).

Isolat S 3/02 Die Gehirne der RIII-Mäuse stellten sich weniger vakuolisiert als die der VM95-Mäuse dar. Das Läsionsprofil der RIII-Mäuse zeigte starke Schwankungen mit Abweichungen von bis zu 4 Punkten, wobei allerdings vor allem die Regionen 1, 2, 4 und 5 betroffen waren (Abb. 4.18). Das Läsionsprofil der VM95-Mäuse war mit Abweichungen von bis zu 2 Punkten relativ homogen, mit Ausnahme von drei Mäusen, die in der Region 5 einen Vakuolisierungsgrad von 0 bzw. 1 zeigten.

Bei den Gehirnen der RIII-Mäuse traten die stärksten Vakuolisierungen in der Medulla, im Hypothalamus und im dorsalen Septum auf. Daneben waren auch der Thalamus und der Hippocampus mäßig vakuolisiert. Im Hypothalamus (Abb. 9.7) und Thalamus trat die Vakuolisierung eher lokal als weit verteilt in Erscheinung. Auffällig war weiterhin die deutliche Vakuolisierung der Granularschicht vom Kleinhirn sowie die starke Vakuolisierung der Ebene C, wobei besonders die Gebiete dorsal und ventral der Decussatio tegmenti als auch der Nucleus interpeduncularis und die Substantia nigra betroffen waren. In der Ebene B trat eine Vakuolisierung lokal im Corpus callosum und im lateralen Thalamus auf; in beiden Gebieten

waren vereinzelt Plaques nachweisbar (Abb. 9.10). Granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen traten vor allem in Ebene D in der Granularschicht vom Kleinhirn und in der Medulla, in der Ebene B im Nucleus habenularis lateralis, im Hypothalamus, lateralen Thalamus, als Plaques im Corpus callosum (Abb. 9.12) und im dorsalen Septum auf. Die Gehirne der VM95-Mäuse waren bis auf die Ebenen 2 und 4 und die weiße Substanz hochgradig vakuolisiert. Daneben trat eine deutliche Vakuolisierung in der Granularschicht vom Kleinhirn und in Ebene C dorsal und ventral der Decussatio tegmenti und im Stratum pyramidale subiculi auf. In der Ebene B war vor allem die Molekularschicht des Cornu ammonis aber auch das Corpus geniculatum laterale und die lateralen Gebiete von Hypothalamus und Thalamus deutlich vakuolisiert. Klassische Plaques traten vereinzelt im Corpus callosum auf, daneben kamen einfache Plaques in der Nervenzellschicht des Ammonshorns vor. Auch das Indusium griseum in Ebene A zeigte eine deutliche Vakuolisierung. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster war durch das Auftreten zahlreicher granulär erscheinender Plaques, die weit verteilt über alle Ebenen verstreut lagen, gekennzeichnet. Lediglich in der Molekular- und Granularschicht vom Kleinhirn und in den Vestibulariskernen trat die PrP^{Sc}-Ablagerung vorwiegend granulär in Erscheinung.

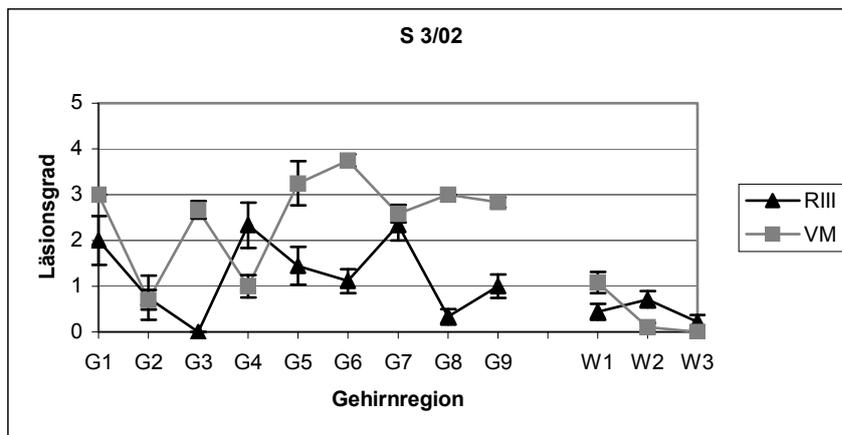


Abb. 4.18: Läsionsprofil der mit S 3/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Isolat S 5/02 Die Läsionsprofile waren bei allen drei Mauslinien relativ homogen und die Gehirne waren insgesamt nur geringgradig vakuolisiert (Abb. 4.19).

Die Gehirne der RIII-Mäuse waren am stärksten von den drei Mauslinien vakuolisiert und die Maxima der Vakuolisierung waren in der Medulla, im Thalamus und im Septum zu finden. Eine deutliche Vakuolisierung trat daneben auf der Ebene C dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, im Nucleus interpeduncularis und in der Substantia nigra auf. Die im Hippocampus auftretende Vakuolisierung war bei zwei Tieren lokal auf den Gyrus dentatus beschränkt

(Abb. 9.9), bei einer Maus war im Hippocampus ein Plaque nachweisbar. Bei zwei weiteren Tieren traten im Corpus callosum neben einer lokalen Vakuolisierung Plaques auf. Die weiße Substanz war bis auf wenige Tiere nicht vakuolisiert. Neben der Vakuolisierung trat auch das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster vorwiegend lokal in Erscheinung. Dabei waren Nuclei vestibulares als auch der Nucleus cochlearis, der Nucleus ruber und die Substantia nigra, das Corpus callosum und der Hypothalamus (Abb. 9.8) sowie die dorsalen und ventralen Gebiete vom Septum stärker betroffen. Die auftretende Gliose korrelierte zu den Bereichen mit stärkster PrP^{Sc}-Ablagerung.

Die Gehirne der VM95-Mäuse waren sehr gering vakuolisiert und nur in der Medulla, im Thalamus und im Hippocampus war eine mäßige Vakuolisierung sichtbar. Die Maus mit der längsten Inkubationszeit zeigte die stärkste Vakuolisierung. Einfache Plaques kamen im Thalamus, in den lateralen Thalamusgebieten (Abb. 9.11) und in der Nervenzellschicht des Ammonshorns vor. Die PrP^{Sc}-Ablagerung war nur bei einem Tier hochgradig, bei den anderen Tieren geringgradig ausgeprägt. Das grundsätzlich granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster stellte sich bei dem stark positiven Tier als granulär erscheinende Plaques dar (Abb. 9.14).

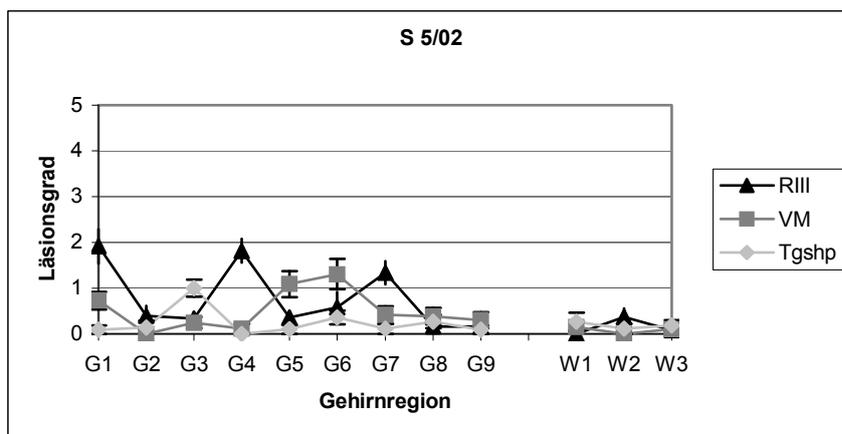


Abb. 4.19: Läsionsprofil der mit S 5/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Auch die Gehirne der Tgshp-Mäuse waren nur schwach vakuolisiert. Die stärkste Vakuolisierung fand sich im Colliculus superior. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster trat zellulär in Erscheinung und war vor allem in den Kleinhirnkernen (Abb. 9.13), im Nucleus vestibularis medialis und in der Medulla nachweisbar.

Isolat S 13/02 Die Gehirne der RIII-Mäuse waren am stärksten, die der Tgshp-Mäuse am wenigsten vakuolisiert (Abb. 4.20). Die Läsionsprofile der Einzeltiere waren bei den VM95-Mäusen sehr unterschiedlich im Vakuolisierungsgrad, ein Teil der Tiere zeigte in einigen

Regionen gar keine Vakuolisierung, während bei anderen Tieren eine deutliche Vakuolisierung auftrat.

Die Gehirne der RIII-Mäuse waren hochgradig vakuolisiert, nur in Ebene 2 war keine Vakuolisierung nachweisbar und die Vakuolisierung der weißen Substanz war bis auf die Capsula interna eher gering. Neben den für das Läsionsprofil erfassten Regionen trat eine deutliche Vakuolisierung auch im Nucleus cochlearis, in den Gebieten dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, in der Substantia nigra, in den lateralen Thalamusgebieten, im Corpus geniculatum laterale und im Putamen auf. Zahlreiche Vakuolen waren auch im Stratum pyramidale subiculi der Ebene C und im Globus pallidus der Ebene B nachweisbar. Die PrP^{Sc}-Ablagerung trat vorwiegend granulär in Erscheinung, lediglich im Stratum pyramidale subiculi und im Globus pallidus war sie in Form kleiner Plaques nachweisbar. Insgesamt war die PrP^{Sc}-Ablagerung sehr stark und betraf vor allem auf Ebene B den Hippocampus (CA4), den Hypothalamus und den Thalamus sowie auf Ebene A das Septum.

Bei den VM95-Mäusen lag das Maximum der Vakuolisierung in Ebene 5, doch auch die Regionen 6 bis 9 waren deutlich vakuolisiert. Die weiße Substanz war im Gegensatz dazu nicht vakuolisiert. Im lateralen Thalamus trat die Vakuolisierung bei drei Tieren lokal begrenzt, beim Rest der Tiere weit verteilt in Erscheinung. Eine deutliche Vakuolisierung war weiterhin in den Gebieten dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, in der Substantia nigra, im Nucleus interpeduncularis sowie im Corpus geniculatum laterale und in den lateralen Gebieten von Hypothalamus und Thalamus und im Indusium griseum nachweisbar. Bei drei Tieren traten einfache Plaques in der Granular- und Molekularschicht vom Hippocampus auf. Die PrP^{Sc}-Ablagerung war hochgradig. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster war granulär, je stärker der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung jedoch war, umso mehr trat es in Form weit verteilter, kleiner Plaques in Erscheinung (Abb. 9.21b). Dies war vor allem im Cortex von Ebene A und B nachweisbar. Auffällig war weiterhin das Vorkommen fein-granulärer Plaques in der Granularschicht vom Kleinhirn und die starke PrP^{Sc}-Ablagerung im Indusium griseum.

Die Gehirne der Tgshp-Mäuse waren am wenigsten vakuolisiert. Die Maxima der Vakuolisierung lagen im Colliculus superior und im Thalamus. Zahlreiche, z.T. konfluierende Plaques waren im Corpus callosum bei fast allen Mäusen in der H.-E.-Färbung und in der Immunhistologie nachweisbar (Abb. 9.21a). Daneben traten PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nervenzellen des Nucleus vestibularis lateralis, der Kleinhirnerne, der Medulla (Abb. 9.18) und im Nucleus ruber auf.

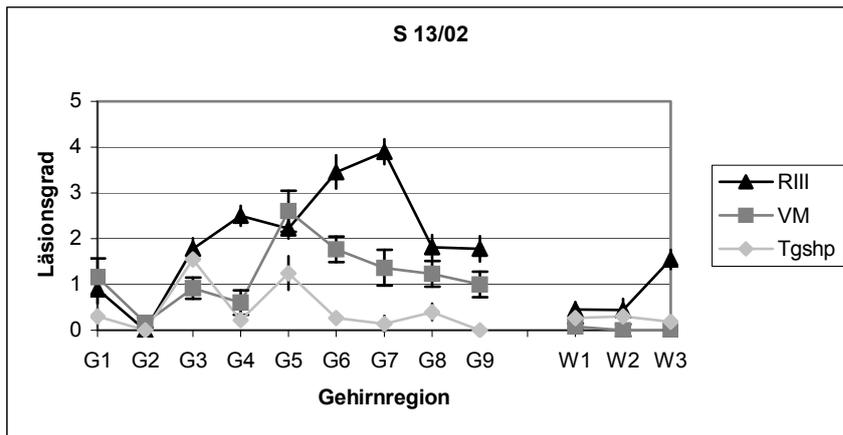


Abb. 4.20: Läsionsprofil der mit S 13/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Isolat S 17/02 Die Gehirne der mit S 17/02 inokulierten Mauslinien wiesen insgesamt nur eine geringgradige Vakuolisierung auf (Abb. 4.21). Die Läsionsprofile der Einzeltiere einer Mauslinie zeigten in der Regel maximal zwei Punkte Abweichung voneinander, bei jeder Mauslinie gab es jedoch einzelne Tiere, die schwach vakuolisiert waren und in einzelnen Regionen drei Punkte Abweichung zu den stärker vakuolisierten Tieren zeigten.

Bei den RIII-Mäusen war das Septum deutlich vakuolisiert, daneben waren Vakuolen auch in den Nuclei vestibulares, im Colliculus superior und im Hypothalamus vorhanden. Im Thalamus trat bei einer Maus ein Status spongiosus auf (Abb. 9.15a, b), im Gegensatz dazu war bei allen anderen Tieren in dieser Region keine Vakuolisierung nachweisbar. In der Ebene C trat eine Vakuolisierung dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, im Nucleus interpeduncularis und in der Substantia nigra auf, in der Ebene B im lateralen Hypothalamus. Die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen waren im Septum und in Ebene B im Hypothalamus, in den lateralen Thalamusgebieten und in den Nuclei habenulares vorhanden. Das grundsätzlich granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster wurde durch Plaques im Corpus callosum ergänzt.

Bei den VM95-Mäusen war die stärkste Vakuolisierung in Ebene B zu verzeichnen: Neben Thalamus und Hippocampus waren auch die lateralen Thalamusgebiete deutlich vakuolisiert. Auch im Indusium griseum und in den Regionen dorsal und ventral der Decussatio tegmenti sowie der Substantia nigra war eine Vakuolisierung nachweisbar. Einfache Plaques traten in den medialen und lateralen Gebieten des Thalamus (Abb. 9.17) sowie in der Granularzellschicht des Hippocampus auf (Abb. 9.19). Das PrP^{Sc}-Reaktionsmuster zeigte sich primär granulär (Abb. 9.20), je stärker PrP^{Sc}-positiv das Einzeltier war, um so mehr traten kleine PrP^{Sc}-Plaques in Erscheinung. Betroffen war vor allem der Cortex in den Ebenen A, B und C

(Abb. 9.16) sowie Thalamus und Hippocampus.

Die Gehirne der Tgshp-Mäuse waren nur gering vakuolisiert, lediglich bei den drei Tieren mit der längsten Inkubationszeit war eine stärkere Vakuolisierung im Thalamus und auf Ebene C nachweisbar. Bei drei Tieren traten Plaques im Corpus callosum auf. PrP^{Sc}-Ablagerungen waren vor allem in den Gebieten um den Aquaeductus, in der Substantia nigra und im Nucleus ruber, in den Nuclei habenulares und als Plaques im Corpus callosum sowie im Septum vorhanden.

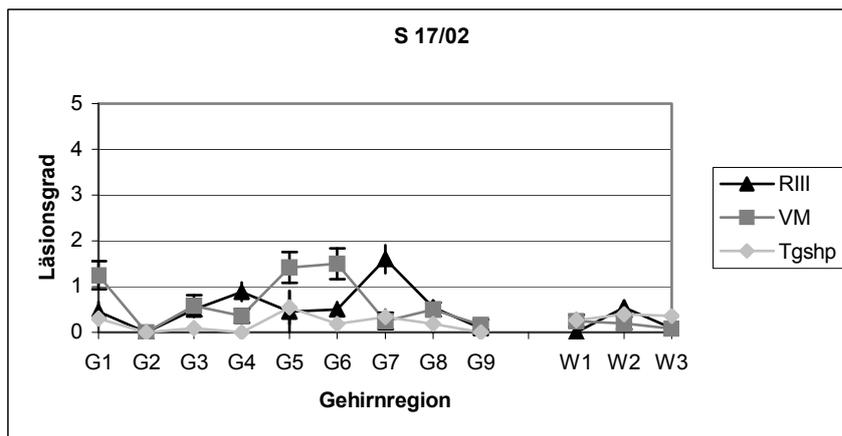


Abb. 4.21: Läsionsprofil der mit S 17/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Isolat S 29/02 Die Gehirne der drei mit S 29/02 infizierten Mauslinien waren bis auf den Thalamus und den Hippocampus bei den VM95-Mäusen und den Thalamus bei den Tgshp-Mäusen nur wenig vakuolisiert (Abb. 4.22). Die Läsionsprofile der Einzeltiere waren relativ homogen, lediglich im deutlich vakuolisierten Thalamus und Hippocampus kam es zu Abweichungen von mehr als zwei Punkten.

Die Gehirne der RIII-Mäuse waren nur wenig vakuolisiert. Bei der Hälfte der Tiere trat in den Nuclei vestibulares und im Hippocampus, bei zwei Mäusen im Hypothalamus und bei einer Maus im Thalamus eine deutliche Vakuolisierung auf. Auch in den anderen, nicht für das Läsionsprofil verwendeten Ebenen war nur in wenigen Fällen eine Vakuolisierung nachweisbar. Lediglich in der Substantia nigra und im Nucleus interpeduncularis kam bei einigen Tieren eine deutliche Vakuolisierung vor. Der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung war gering- bis mittelgradig. In der Ebene D waren vor allem in den Nuclei vestibulares, in der Raphe und in der Medulla granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen nachweisbar. Bei stärker positiven Mäusen traten PrP^{Sc}-Ablagerungen auch in der Molekular- und Granularschicht des Kleinhirns auf. Im Mittelhirn war die PrP^{Sc}-Ablagerung granulär und weit verteilt, im Zwischenhirn kamen lokal

eng begrenzte PrP^{Sc}-Ablagerungsnester vor (Abb. 9.26). Im Septum waren PrP^{Sc}-Ablagerungen vor allem dorsal und ventral lokalisiert.

Bei den VM95-Mäusen traten die Maxima der Vakuolisierung im Thalamus und Hippocampus auf. Während die Vakuolisierung im Thalamus bei der Hälfte der Tiere lokal und bei der anderen Hälfte weit verteilt war, betraf die Vakuolisierung im Hippocampus lokal das CA3 und hierbei vor allem die lakunare Molekularschicht. Eine deutliche Vakuolisierung war in der Substantia nigra und im Nucleus interpeduncularis sowie in den lateralen Gebieten von Thalamus und Hypothalamus, im Corpus geniculatum laterale und im Indusium griseum nachweisbar. Einfache Plaques traten bei drei Tieren im Thalamus sowie in der Granularschicht des Hippocampus (Abb. 9.23) auf. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster stellte sich granulär dar, je stärker die PrP^{Sc}-Ablagerungen jedoch waren, umso stärker wurde das granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster von zahlreichen Plaques überlagert. Diese traten vor allem im Cortex und im Zwischenhirn auf. Auffällig war weiterhin die PrP^{Sc}-Ablagerung in der Granularschicht des Kleinhirns und des Tectums sowie im Indusium griseum (Abb. 9.25).

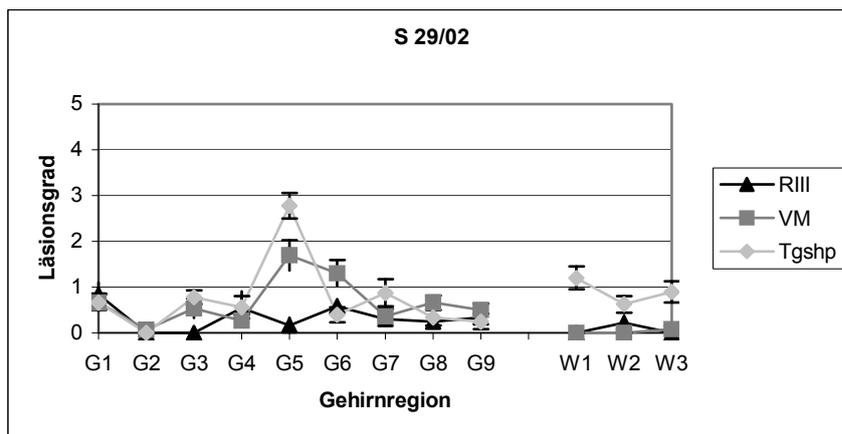


Abb. 4.22: Läsionsprofil der mit S 29/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Bei den Tgshp-Mäusen waren Hypothalamus und Septum deutlich, der Thalamus hochgradig vakuolisiert. Daneben traten zahlreiche Vakuolen in der Region dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, im Nucleus ruber, in der Substantia nigra und in den lateralen Thalamusgebieten auf. Klassische Plaques waren in der H.-E.-Färbung bei zwei Mäusen (Abb. 9.24) und multizentrische Plaques bei einer Maus im Thalamus (Abb. 9.22) und immunhistologisch bei einer Maus im Corpus callosum nachweisbar. In der weißen Substanz des Kleinhirns kamen bei der Hälfte der Mäuse große, unregelmäßige Vakuolen vor. Die PrP^{Sc}-Ablagerung war granulär in der Medulla, weit verteilt auf Ebene C (Abb. 9.27), im Cortex, Corpus callosum,

Hypothalamus und Thalamus der Ebene B sowie im Septum und Nucleus caudatus der Ebene A darstellbar.

Isolat S 30/02 Die Läsionsprofile waren relativ homogen, doch bei jeder Mauslinie war bei einem Teil der Tiere trotz PrP^{Sc}-Nachweis in der Immunhistologie die Vakuolisierung deutlich schwächer als bei anderen Tieren dieser Inokulationsgruppe (Abb. 4.23).

Bei den RIII-Mäusen waren bis auf die Nuclei vestibulares, das Tectum und die weiße Substanz alle anderen Ebenen des Läsionsprofils ähnlich stark vakuolisiert. Daneben fand sich eine deutliche Vakuolisierung auf der Ebene C in der Substantia nigra, im Stratum pyramidale subiculi und dorsal der Decussatio tegmenti und auf Ebene B im Globus pallidus und in den lateralen Gebieten von Hypothalamus und Thalamus. Die PrP^{Sc}-Ablagerung trat vorwiegend granulär in Erscheinung, lediglich im Stratum pyramidale subiculi und im Hippocampus war sie in Form kleiner Plaques nachweisbar. Bei einem Tier waren im Corpus callosum Plaques vorhanden. Insgesamt war die PrP^{Sc}-Ablagerung relativ gering und betraf vor allem auf Ebene B den Hippocampus (CA4), den Hypothalamus und den Thalamus sowie auf Ebene A das Septum.

Die Maxima der Vakuolisierung waren bei den VM95-Mäusen im Thalamus, Hippocampus und Cortex zu finden. Daneben zeigten auch die Substantia nigra, der Nucleus interpeduncularis, das Stratum pyramidale subiculi, die lateralen Gebiete von Hypothalamus und Thalamus sowie das Indusium griseum eine deutliche Vakuolisierung. Bei einem Tier traten einfache Plaques in der Granularschicht des Hippocampus auf. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster war einerseits granulär, jedoch andererseits durch das Auftreten zahlreicher feiner Plaques gekennzeichnet, die vor allem im Cortex und weit verteilt in allen Regionen der Ebene B zu finden waren.

Die Gehirne der Tgshp-Mäuse waren insgesamt nur wenig vakuolisiert. Nur im Thalamus, im Hippocampus und im Cortex war eine mäßige Vakuolisierung bei der Hälfte der Tiere nachweisbar. In der weißen Substanz des Kleinhirns traten große, unregelmäßige Vakuolen auf. Von den fünf im Western Blot PrP^{Sc}-positiven Tgshp-Mäusen waren in der Immunhistologie nur vier positiv. Von diesen vier Mäusen zeigten zwei Tiere eine PrP^{Sc}-Ablagerung in den Nuclei vestibulares und im Thalamus, bei einem Tier traten zwei Plaques im Corpus callosum auf und nur ein Tier zeigte eine über alle Ebenen verteilte granuläre bis plaqueartige PrP^{Sc}-Ablagerung.

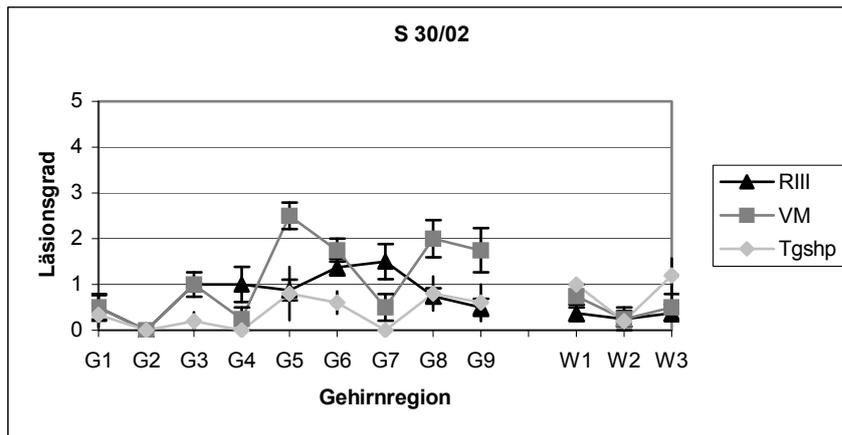


Abb. 4.23: Läsionsprofil der mit S 30/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Isolat S 32/02 Die Läsionsprofile der Einzeltiere waren sehr uneinheitlich, in den stärker vakuolisierten Regionen war bei Einzeltieren eine Abweichung von bis zu 4 Punkten möglich. Die Gehirne der RIII- und Tgshp-Mäuse waren nur gering, die der VM95-Mäuse etwas stärker vakuolisiert (Abb. 4.24).

Bei den RIII-Mäusen trat die stärkste Vakuolisierung im Thalamus auf. Daneben war eine deutliche Vakuolisierung in der Granularschicht vom Kleinhirn, in der dorsalen Medulla (Abb. 9.28), im Nucleus cochlearis und auf Ebene C im Gebiet dorsal der Decussatio tegmenti sowie in der Substantia nigra und im Nucleus interpeduncularis zu beobachten. Bei einem Tier fand sich im Corpus callosum ein von Vakuolen umgebenes Nest von fibrillären Plaques. Die PrP^{Sc}-Ablagerung war geringgradig und vor allem auf Medulla, Hypothalamus und Septum konzentriert.

Je länger die Inkubationszeit bei den VM95-Mäusen war, umso stärker trat die Vakuolisierung in Erscheinung. Die Maxima lagen im Thalamus und im Hippocampus (CA3). Daneben zeigten auch die Raphe, die Substantia nigra, der Nucleus interpeduncularis, das Stratum pyramidale subiculi, die lateralen Gebiete vom Thalamus sowie das Indusium griseum eine deutliche Vakuolisierung. Klassische Plaques traten im Corpus callosum bei zwei Tieren auf, einfache Plaques kamen im Thalamus und Hippocampus bei drei Mäusen vor (Abb. 9.29 und 9.30). Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster war granulär bis plaqueartig und betraf vor allem die Ebene B (Abb. 9.39).

Das Maximum der Vakuolisierung bei den Tgshp-Mäusen lag im Thalamus und trat vor allem lokal in Erscheinung. Eine deutliche Vakuolisierung kam daneben in der Formatio reticularis, in der Raphe, auf Ebene C und in Zona incerta sowie Corpus geniculatum laterale vor. Im

Corpus callosum waren bei der Hälfte der Tiere Plaques nachweisbar. Bei zwei Tieren traten große, unregelmäßige Vakuolen in der weißen Substanz des Kleinhirns auf. Die PrP^{Sc}-Ablagerung stellte sich eher gering dar und war dabei granulär in der Medulla und weit verteilt auf Ebene C, zellulär in den Kleinhirnkernen (Abb. 9.37a), den Nuclei vestibulares, dem Nucleus cochlearis, dem Nucleus ruber und den Nuclei habenulares sowie als Plaques im Corpus callosum (Abb. 9.35) vorhanden.

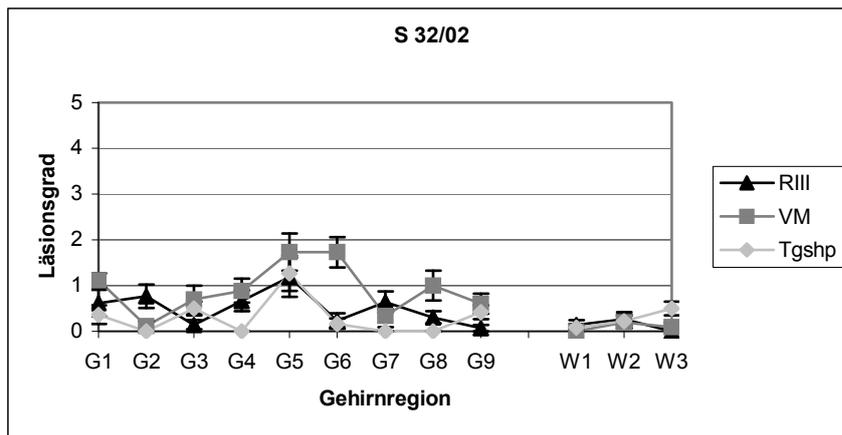


Abb. 4.24: Läsionsprofil der mit S 32/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Isolat S 33/02 Die Gehirne der RIII- und VM95-Mäuse waren deutlich, die der Tgshp-Mäuse mäßig vakuolisiert (Abb. 4.25). Die Läsionsprofile der Einzeltiere waren bei den RIII- und VM95-Mäusen sehr uneinheitlich, in den stärker vakuolisierten Regionen war bei Einzeltieren eine Abweichung von bis zu 4 Punkten möglich.

Bei den RIII-Mäusen lagen die Maxima der Vakuolisierung im Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus und Septum, wobei die Vakuolisierung in Thalamus und Hippocampus lokal eng begrenzt auftrat. Weiterhin trat eine deutliche Vakuolisierung in der Granularschicht des Kleinhirns (Abb. 9.31), dorsal und ventral der Decussatio tegmenti, in der Substantia nigra und im Nucleus interpeduncularis auf. Im Corpus callosum fanden sich bei zwei Tieren von Vakuolen umgebene Plaques, wobei die pathologischen Veränderungen schon teilweise auf den Hippocampus übergriffen (Abb. 9.32). Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster zeigte sich einerseits granulär in Medulla, Mittelhirn und Septum, andererseits in Form kleiner Plaques im Zwischenhirn und als Plaquenester im Corpus callosum.

Weit verteilt im Thalamus und lokal auf das CA3 des Hippocampus beschränkt zeigten sich die Maxima der Vakuolisierung bei den VM95-Mäusen. Neben den für das Läsionsprofil untersuchten Ebenen fand sich ein mittlerer Vakuolisierungsgrad auch in Substantia nigra und

Nucleus interpeduncularis, im lateralen Thalamus und im Indusium griseum (Abb. 9.38a). Einfache Plaques kamen im medialen und lateralen Thalamus, im Hippocampus und bei einem Tier im Cortex und im Putamen vor. Fibrilläre Plaques traten vereinzelt im Corpus callosum auf (Abb. 9.33). Die von Tier zu Tier sehr unterschiedlich ausgeprägte PrP^{Sc}-Ablagerung war in Medulla, Mittelhirn und Indusium griseum (Abb. 9.38b) vorwiegend granulär, in Zwischenhirn und Endhirn und dabei besonders im Cortex in Form feiner Plaques darstellbar. Die Gliose korrelierte zur PrP^{Sc}-Ablagerung (Abb. 9.34, 9.36).

Die Gehirne der Tgshp-Mäuse waren nur gering vakuolisiert, eine geringgradige Vakuolisierung trat im Colliculus superior und im Thalamus auf. Bei den zusätzlich untersuchten Gehirnregionen waren die Formatio reticularis, das Gebiet dorsal und ventral der Decussatio tegmenti sowie Nucleus ruber, Substantia nigra und Zona incerta deutlich vakuolisiert. Bei vier Tgshp-Mäusen traten große, unregelmäßige Vakuolen in der weißen Substanz des Kleinhirns auf. Auffällig war das Vorkommen zahlreicher Plaques im Corpus callosum bei fast allen untersuchten Tieren. Diese Plaques waren entweder amorph, fibrillär oder sie zeigten eine wirbelige Anordnung, z.T. konfluieren dabei nebeneinander liegende Plaques. Die PrP^{Sc}-Ablagerungen waren hochgradig und betrafen die Zellen der Kleinhirnkerne, der Medulla und des Nucleus ruber (Abb. 9.37b), waren weit verteilt und granulär im Mittelhirn nachweisbar und im Zwischenhirn als Plaques im Corpus callosum (Abb. 9.40) darstellbar.

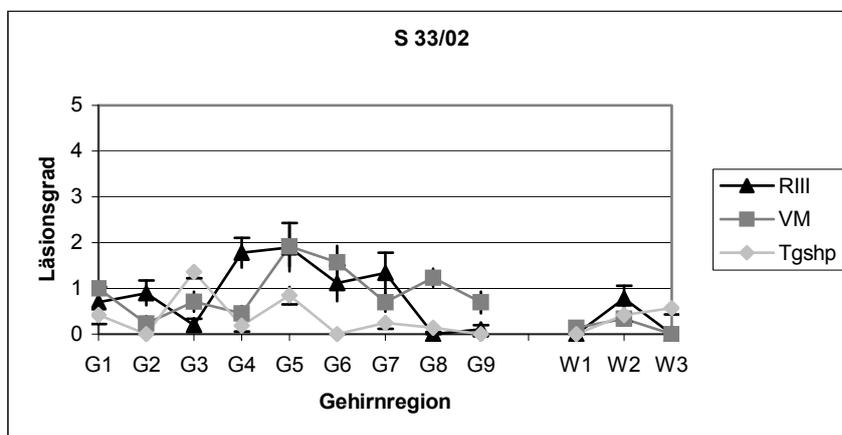


Abb. 4.25: Läsionsprofil der mit S 33/02 inokulierten Mauslinien (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Histopathologische Charakterisierung, vergleichende Darstellung und Clusteranalyse

RIII-Mäuse Die Maxima der Läsionsprofile bei den RIII-Mäusen lagen bei dem BSE-Isolat in den Regionen G1, G4 und G7 (Abb. 4.26). Auch die beiden Scrapieisolate S 3/02 und S 5/02 aus dem Ausbruch Borken zeigten ihre Maxima in diesen Regionen. Der Grad der Vakuolisierung im Bereich dieser drei Regionen war bei den beiden Scrapieisolaten allerdings deutlich stärker ausgeprägt als bei dem BSE-Isolat, weiterhin waren die Region G2 und bei der S Probe 3/02 die Regionen G5, G6 und G9 zusätzlich vakuolisiert.

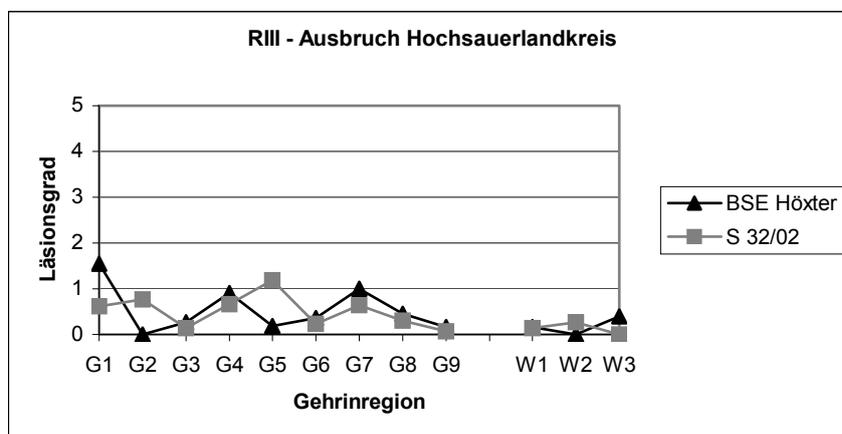
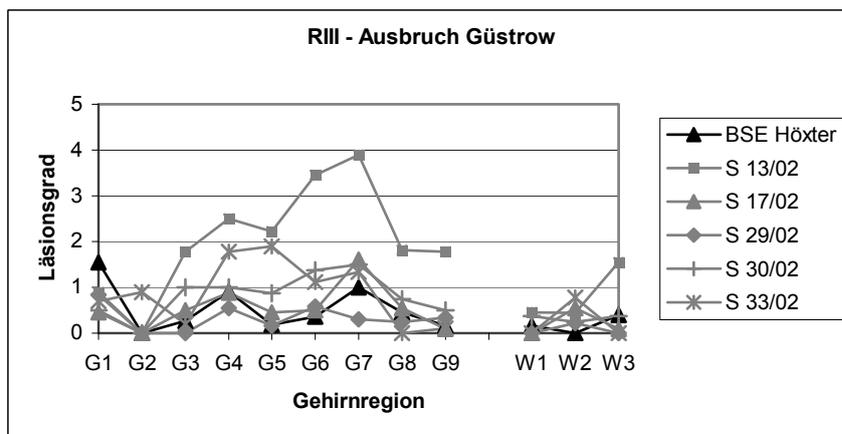
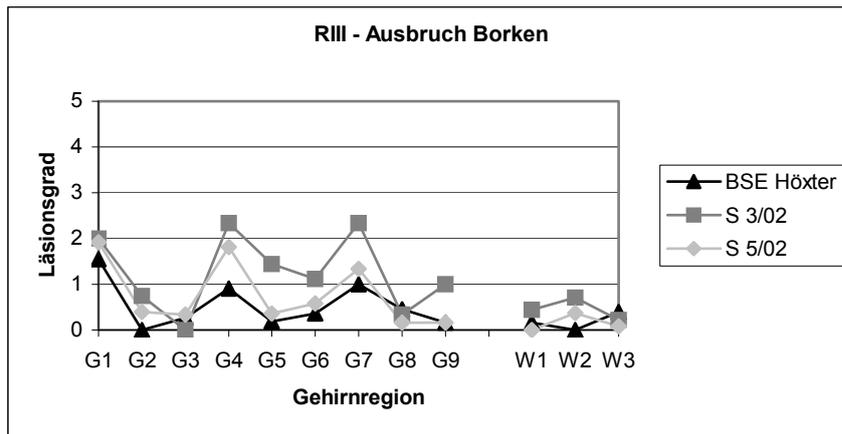


Abb. 4.26: Läsionsprofil klassischer Scrapieisolate in RIII-Mäusen nach Ausbrüchen geordnet. Als Vergleich ist das Läsionsprofil des BSE-Isolates hinterlegt (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Von den fünf Isolaten aus dem Ausbruch Güstrow erzeugte das Isolat S 13/02 die stärkste Vakuolisierung in RIII-Mäusen, die Gehirne der mit den Isolaten S 30/02 und S 33/02 infizierten Mäuse waren weniger deutlich vakuolisiert und die mit S 17/02 und S 29/02 infizierten Mäuse sogar nur geringgradig vakuolisiert. Obwohl es deutliche Unterschiede im Grad der Vakuolisierung gab, zeigte sich eine gewisse Ähnlichkeit der Läsionsprofile, da in den Regionen G3 bis G7 ein Plateau im Läsionsprofil zu erkennen war, welches bei den Isolaten S 17/02 und S 29/02 allerdings deutlich geringer ausfällt. Die Region G2 war außer bei den mit dem Isolat S 33/02 infizierten Mäusen nicht vakuolisiert. Anhand der Läsionsprofile ließen sich alle Isolate des Ausbruchs Güstrow vom BSE-Erreger abgrenzen. Die hohe Ähnlichkeit von BSE und dem Isolat S 29/02 nach der Clusteranalyse (Abb. 4.27) lässt sich durch die geringe Vakuolisierung der mit diesem Isolat infizierten Mäuse begründen: Zwei der Maxima liegen zwar in den Regionen G1 und G4, das dritte Maximum liegt allerdings in der Region G6 und nicht in der Region G7, wie es für den BSE-Erreger zu erwarten wäre.

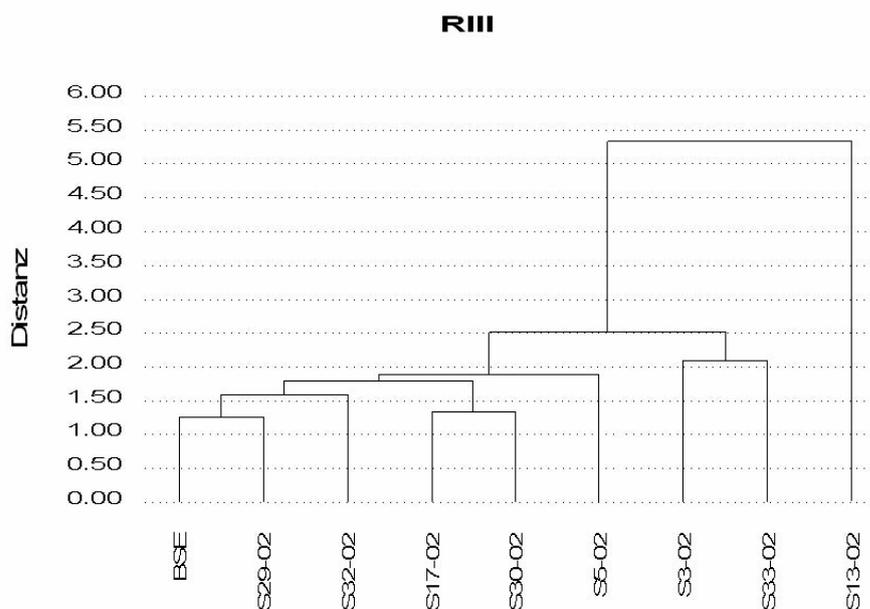


Abb. 4.27: Dendrogramm zur Darstellung der Ähnlichkeit der Läsionsprofile bei RIII-Mäusen nach Inokulation mit acht deutschen klassischen Scrapieisolaten und einem BSE-Isolat. Je geringer die Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate.

Das Isolat S 32/02 ließ sich deutlich vom BSE-Erreger abgrenzen, da die Maxima der Vakuolisierung in den Regionen G2, G5 und G7 lagen.

VM95-Mäuse Die Maxima des Läsionsprofils lagen bei den mit BSE inokulierten VM95-Mäusen in den Regionen Medulla (G1), Thalamus (G5) und Septum (G7). In den VM95-Mäusen ließen sich alle acht untersuchten klassischen Scrapieisolate vom BSE-Erreger unter-

scheiden, da sie alle eine deutliche Vakuolisierung im Hippocampus (G6) aufwiesen, welche bei dem BSE-Isolat nicht zu beobachten war (Abb. 4.28).

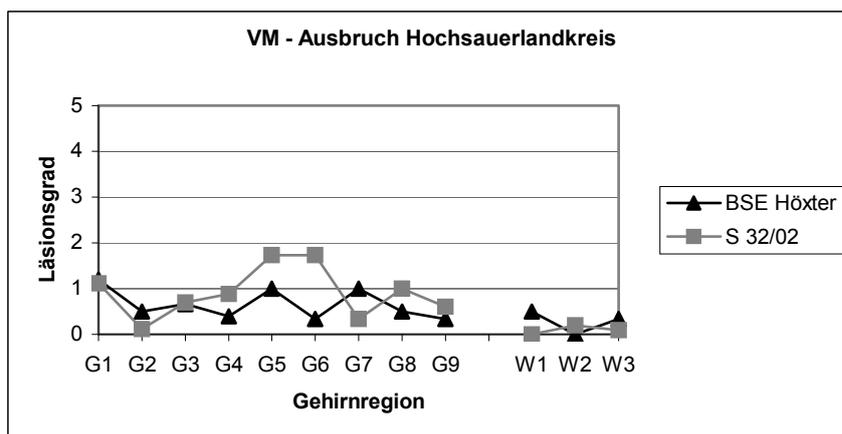
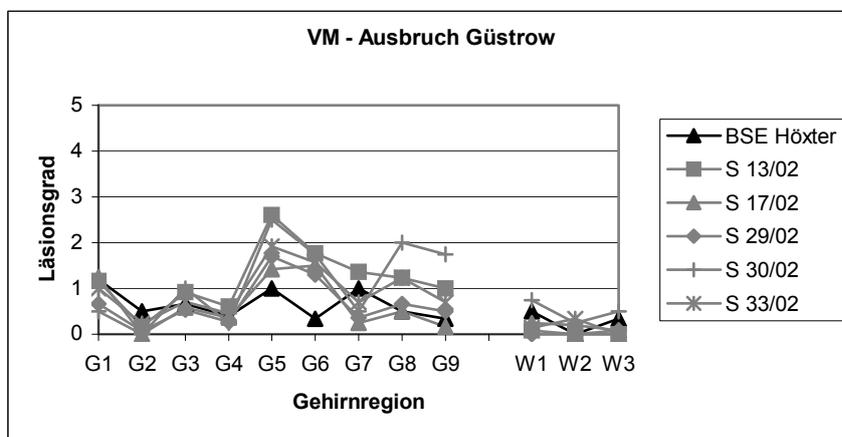
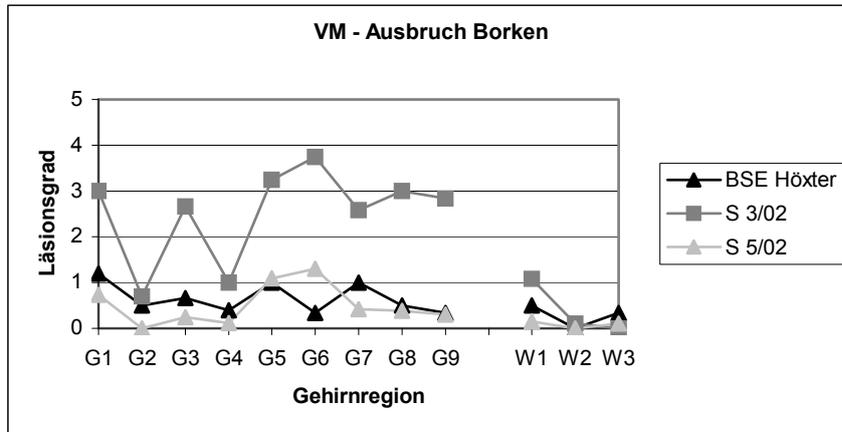


Abb. 4.28: Läsionsprofil klassischer Scrapieisolate in VM95-Mäusen nach Ausbrüchen geordnet. Als Vergleich ist das Läsionsprofil des BSE-Isolates hinterlegt (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Bei den beiden Isolaten aus dem Ausbruch Borken, S 3/02 und S 5/02, waren die Maxima der Vakuolisierung in den infizierten VM95-Mäusen in den Regionen G1 und G3 sowie G5 und

G6 zu finden. Der Verlauf des Läsionsprofils war bei beiden Isolaten relativ ähnlich, die in fast allen Regionen um etwa zwei Vakuolisierungsgrade stärkere Ausprägung des Läsionsprofils bei der S 3/02 erklärt jedoch den deutlichen Abstand beider Isolate in der Clusteranalyse.

Die fünf Scrapieisolate aus der Herde in Güstrow waren ebenfalls in den Regionen G1, G3, G5 und G6 am deutlichsten vakuolisiert, Unterschiede im Läsionsprofil waren dagegen in den Regionen G7, G8 und G9 zu erkennen. Die Isolate S 13/02 und S 30/02 einerseits und die Isolate S 17/02 und S 29/02 andererseits sind innerhalb dieses Ausbruchs dabei untereinander am ähnlichsten, was sich aus dem Läsionsprofil ableiten lässt und durch die Clusteranalyse bestätigt wird (Abb. 4.29).

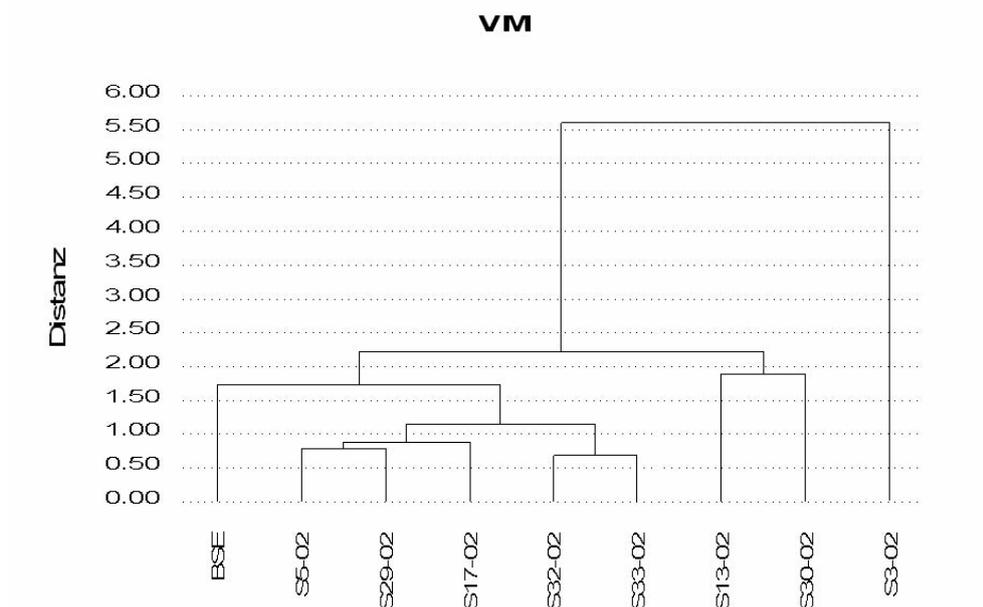


Abb. 4.29: Dendrogramm zur Darstellung der Ähnlichkeit der Läsionsprofile bei VM95-Mäusen nach Inokulation mit acht deutschen klassischen Scrapieisolaten und einem BSE-Isolat. Je geringer die Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate.

Auffällig ist die hohe Ähnlichkeit zwischen S 32/02 und S 33/02: Obwohl es sich um zwei Scrapieisolate aus verschiedenen Ausbrüchen handelt, stimmen die Läsionsprofile mit den Maxima G1, G5, G6 und G8 auffallend überein und erklären den geringen Abstand von ca. 0,7 in der Clusteranalyse.

Tgshp-Mäuse Bei den mit BSE inokulierten Tgshp-Mäusen traten die gleichen Maxima der Vakuolisierung in den Regionen Medulla, Hypothalamus und Septum wie nach Erstpassage in RIII-Mäusen auf. Aus dem Ausbruch Borken wurde nur das Isolat S 5/02 in Tgshp-Mäuse inokuliert. Dieses konnte anhand seiner Vakuolisierungsmaxima in den Regionen G3 und G6 deutlich vom BSE-Isolat abgegrenzt werden.

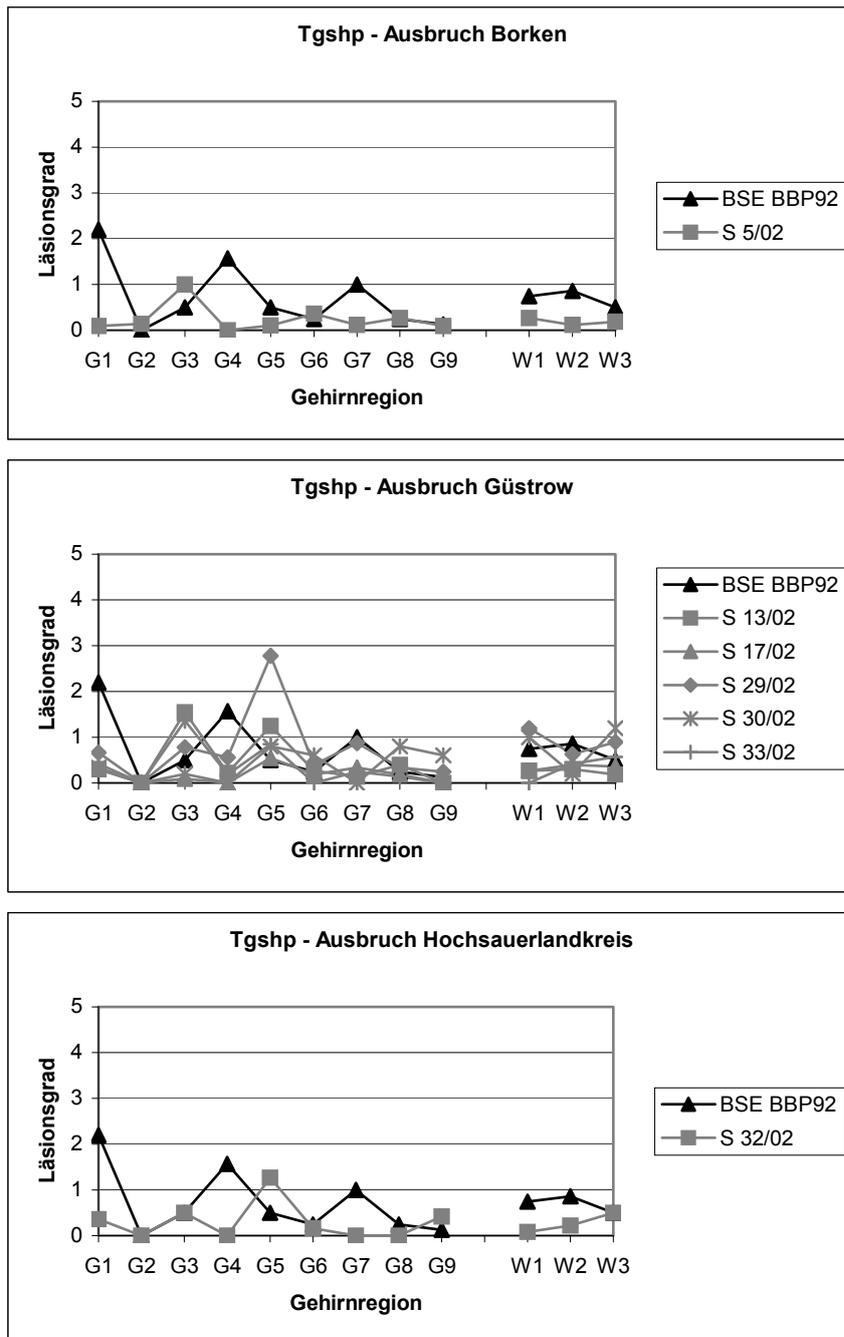


Abb. 4.30: Läsionsprofil klassischer Scrapieisolate in Tgshp-Mäusen nach Ausbrüchen geordnet. Als Vergleich ist das Läsionsprofil des BSE-Isolates hinterlegt (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Die Läsionsprofile der fünf Scrapieisolate aus dem Ausbruch Güstrow wichen in einigen Regionen deutlich voneinander ab, Gemeinsamkeiten waren in der Vakuolisierung der Regionen G3 und G5 zu beobachten. Bei den mit dem Isolat S 32/02 infizierten Mäusen waren die Regionen G3 und G5 ebenfalls am deutlichsten vakuolisiert. Anhand der Läsionsprofile konnten alle Scrapieisolate in den Tgshp-Mäusen vom BSE-Erreger abgegrenzt werden, da bei diesem die Maxima in den Regionen G1, G4 und G7 vorhanden waren, die Scrapieisolate

dagegen durch eine hohe Vakuolisierung in den Regionen G3 und G5 bzw. G6 gekennzeichnet waren (Abb. 4.30). Diese Unterscheidung lässt sich durch die Clusteranalyse bestätigen (Abb. 4.31).

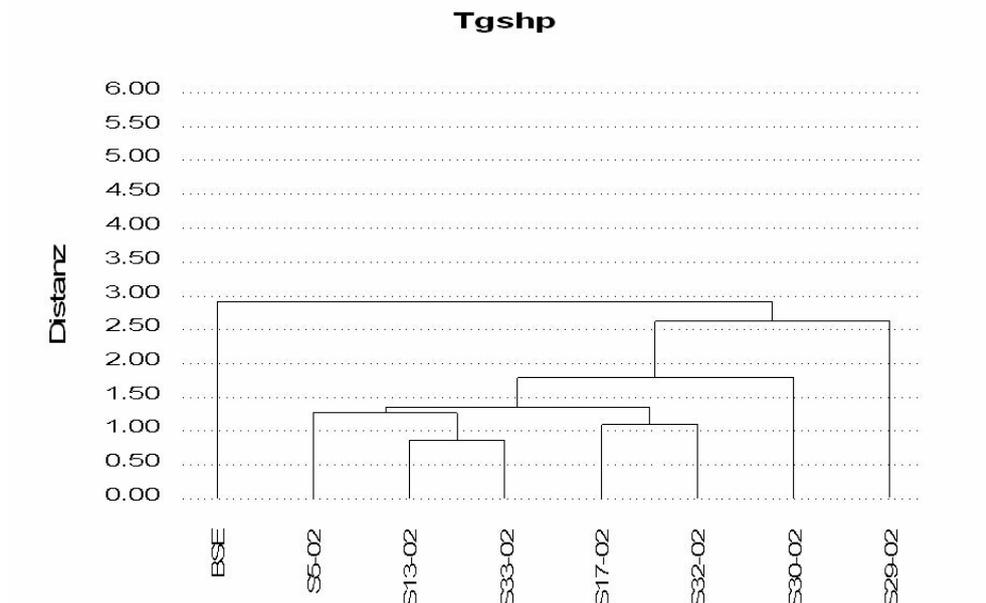


Abb. 4.31: Dendrogramm zur Darstellung der Ähnlichkeit der Läsionsprofile bei Tgshp-Mäusen nach Inokulation mit sieben deutschen klassischen Scrapieisolaten und einem BSE-Isolat. Je geringer die Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate.

Vergleich aller Mauslinien Wurden die Läsionsprofile aller drei Mauslinien in die Clusteranalyse einbezogen, so konnte gezeigt werden, dass sechs der untersuchten deutschen Scrapieisolaten untereinander sehr ähnlich sind und deutlich vom BSE-Erreger abgegrenzt werden können (Abb. 4.32). Eine Ausnahme stellt das Isolat S 13/02 dar: Da es von allen Isolaten in den RIII- und VM95-Mäusen die stärkste Vakuolisierung hervorrief, ist ihr Abstand zu diesen sechs Scrapieisolaten sowie zu dem BSE-Isolat in der Clusteranalyse sehr groß.

Das Isolat S 3/02 konnte in der vergleichenden Clusteranalyse nicht mit bewertet werden, da es nicht in die Tgshp-Mäuse inokuliert worden war.

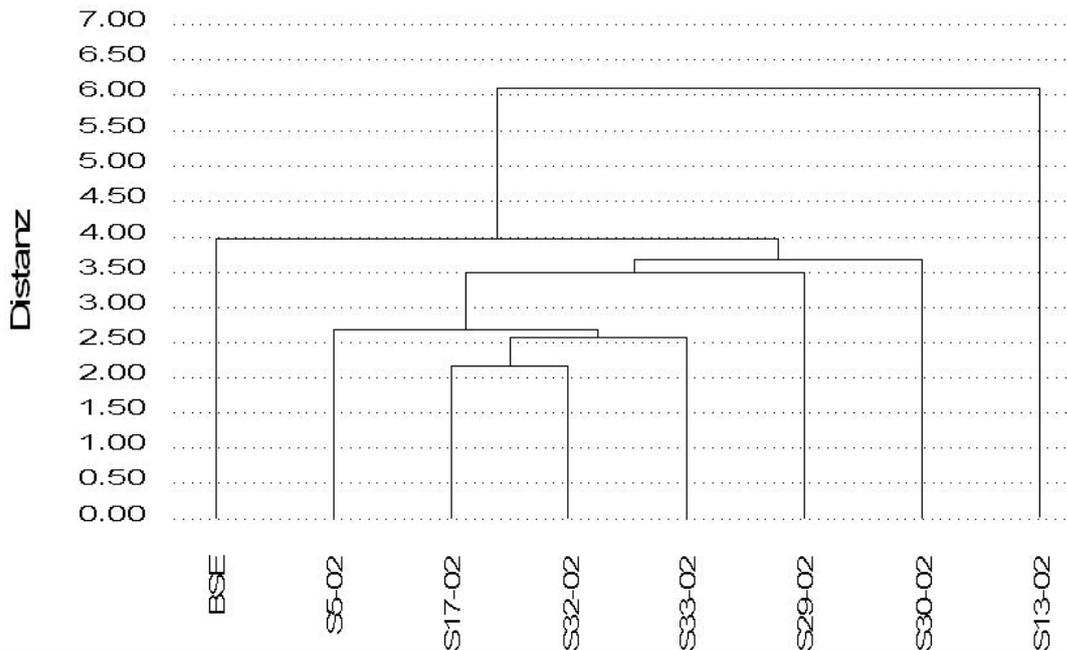


Abb. 4.32: Dendrogramm zur Darstellung der Ähnlichkeit der Läsionsprofile unter Einbeziehung aller drei verwendeten Mauslinien nach Inokulation mit sieben deutschen klassischen Scrapieisolaten und einem BSE-Isolat. Je geringer die Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate.

4.2 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate

4.2.1 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Schaf

Bei vier atypischen Scrapieisolaten (S 18/02, S 39/02, S 14/03 und S 40/04) wurde das PrP^{Sc}-Bandenmuster und die Molekularmasse der PrP^{Sc}-Banden bestimmt. Das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 konnte an drei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02, S 14/03 und S 40/04) analysiert werden. Für die Untersuchungen zur PK-Stabilität, zur Deglykosylierung und zur Epitopcharakterisierung wurden die zwei atypischen Scrapieisolate S 39/02 und S 40/04 verwendet. Sieben weitere in die Mauslinien inokulierten atypischen Scrapieisolate konnten aufgrund ihrer geringen Signalstärke im Western Blot nicht für proteomische Untersuchungen verwendet werden. Als Kontrollen dienten ein klassisches Scrapieisolat (S 33/02), ein BSE-Isolat (R128/04) und ein negatives Schaf.

4.2.1.1 PrP^{Sc}-Bandenmuster und Molekularmasse

Im Gegensatz zu den klassischen Scrapieisolaten wiesen die atypischen Scrapieisolate im Western Blot mehr als drei PrP^{Sc}-Banden auf. Trotz der Anreicherung und Aufreinigung in der PTA-Fällung war das PrP^{Sc}-Bandenmuster oft undeutlich und die Signalstärken im Western Blot lagen oft unterhalb des auswertbaren Bereiches. Aus diesem Grund konnten die

Glykosylierungsverhältnisse (bzw. der prozentuale Anteil der Einzelbanden am Gesamtsignal) und Molekularmasse nur bei vier Isolaten bestimmt werden. Bei diesen vier atypischen Scrapieisolaten waren im Western Blot (Abb. 4.33) anstelle der drei Banden der klassischen Scrapie mindestens drei undeutlich voneinander abgrenzbare Banden sowie eine zusätzliche Bande mit einer Molekularmasse von etwa 11 kDa zu detektieren. Bei dem Isolat S 40/04 war außerdem eine fünfte Bande mit einer Molekularmasse von 27,8 kDa zu sehen. Auch zeigten die drei Banden, die im Bereich der klassischen PrP^{Sc}-Banden lagen, nicht genau die gleiche Molekularmasse wie diese (Abb. 4.33 und Tab. 4.1).

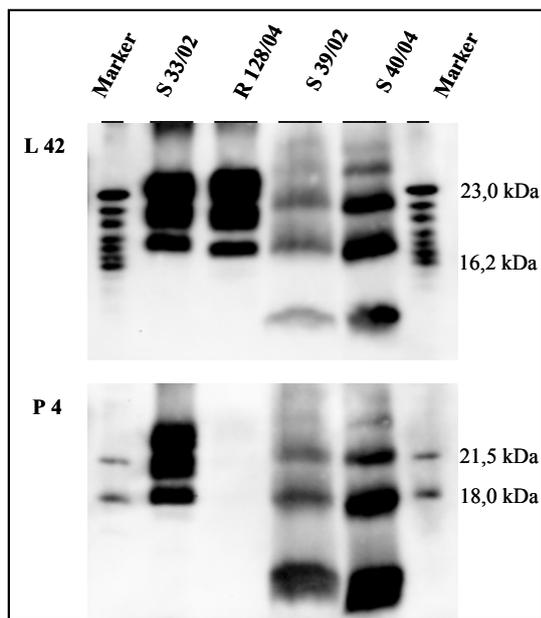


Abb. 4.33: PrP^{Sc}-Bandenmuster und Molekularmasse sowie Antikörperbindung von MAK L42 und MAK P4 bei einem klassischen Scrapieisolat (S 33/02), einem BSE-Isolat (R 128/04) und zwei atypischen Scrapieisolaten S 39/02 und S 40/04 (Western Blot, Antikörper L42 bzw. P4, Marker: Histidin- bzw. P4-markierter FLI-Marker).

Weiterhin waren wegen der zusätzlichen 11 kDa Bande auch die Anteile der Banden am Gesamtsignal im Western Blot anders als die Glykosylierungsverhältnisse der klassischen Scrapie (Tab. 4.1). Da bei den atypischen Scrapieisolaten noch nicht untersucht wurde, ob es sich dabei um verschieden glykosylierte Banden des PrP^{Sc} handelt, wurden diese Banden vorläufig als Banden I bis IV bezeichnet.

Tab. 4.1: PrP^{Sc}-Bandenmuster und Molekularmasse der PrP^{Sc}-Banden bei einem klassischen (S 33/02) und vier atypischen Scrapieisolaten

			S 33/02 (K)	S 18/02 (A)	S 39/02 (A)	S 14/03 (A)	S 40/04 (A)
MM (kDa)	diglykosyliert	I	23,4 (0,0)	25,6 (0,6)	25,4 (0,4)	24,8 (0,2)	25,1(0,1)
	monoglykosyliert	II	20,9 (0,1)	22,0 (0,4)	21,9 (0,2)	21,3 (0,1)	21,7 (0,1)
	unglykosyliert	III	18,1 (0,1)	17,8 (0,2)	18,2 (0,3)	17,5 (0,2)	17,9 (0,2)
	“11 kDa Bande”	IV	-	11,2 (0,7)	11,1 (0,5)	10,9 (0,8)	11,0 (0,2)
GV (%)	diglykosyliert	I	43,2 (0,8)	9,1 (0,3)	8,0 (0,8)	11,5 (0,5)	6,3 (0,6)
	monoglykosyliert	II	35,6 (0,5)	21,4 (1,0)	23,9 (2,1)	21,3 (0,4)	22,0 (0,8)
	unglykosyliert	III	21,1 (0,6)	37,6 (0,5)	39,5 (2,9)	38,2 (1,2)	37,5 (1,9)
	“11 kDa Bande”	IV	-	31,8 (1,5)	28,6 (5,2)	29,1 (1,3)	34,3 (1,0)

Legende zu Tab. 4.1:

GV Glykosylierungsverhältnis bzw. Anteil der Einzelbande am Gesamtsignal im Western Blot

MM Molekularmasse K Klassische Scrapie

() Standardfehler A Atypische Scrapie

4.2.1.2 Epitopbestimmung mittels verschiedener PrP-Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung der Epitope, welche bei den atypischen Scrapieisolaten vor und nach PK-Verdau im Gegensatz zu den klassischen Scrapie- und den BSE-Isolaten noch detektiert werden können, wurden 19 monoklonale Antikörper verwendet (Tab. 9.1.3). Die Untersuchungen erfolgten an den atypischen Scrapieisolaten S 39/02 und S 40/04. Als Kontrolle diente das klassische Scrapieisolat S 33/02 und das BSE-Isolat R 128/04. Die Proben wurden nach PTA-Fällung und SDS-PAGE im Western Blot mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen.

Nach den Ergebnissen im Western Blot konnten diese Antikörper in fünf Gruppen eingeteilt werden (Tab. 4.2):

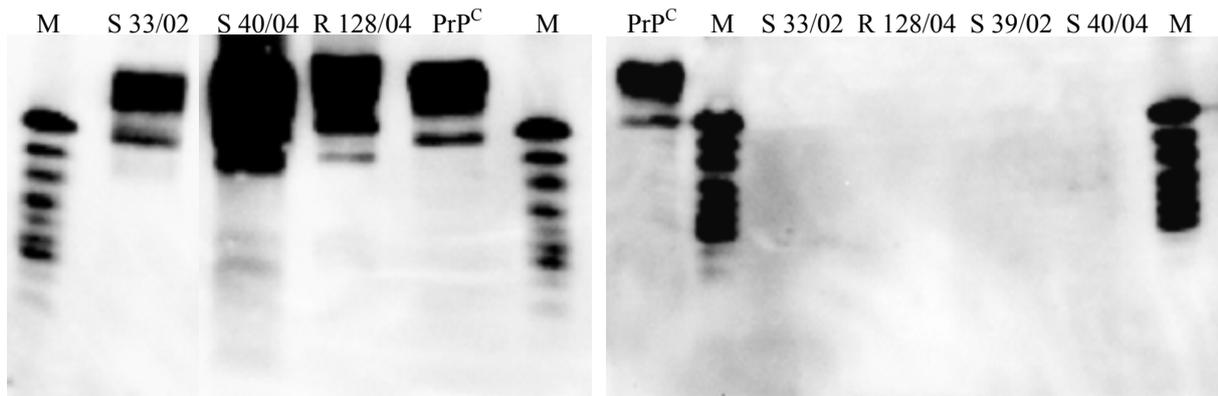


Abb. 4.34: Western Blot eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04) und von zwei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02 und S 40/04) mit einem Antikörper der Gruppe 1, MAK FH11. Linke Abbildung: unverdautes PrP^{Sc}, rechte Abbildung: PK-verdautes PrP^{Sc}. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen (M: Marker: Histidin-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

Gruppe 1: Diese Antikörper, welche am N-Terminus des Prionproteins binden, erkannten vor PK-Verdau das PrP der klassischen und atypischen Scrapieisolate und des BSE-Isolates. Die 11 kDa Bande der atypischen Scrapieisolate wurde nur sehr schwach oder gar nicht erkannt. Nach PK-Verdau wurden von diesen Antikörpern weder die Scrapie- noch die BSE-Isolate erkannt (Abb. 4.34).

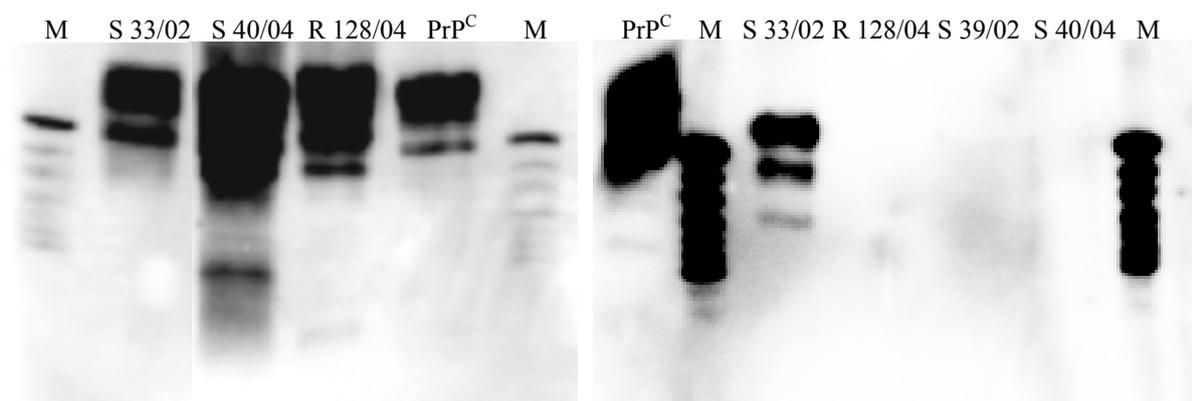


Abb. 4.35: Western Blot eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04) und von zwei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02 und S 40/04) mit dem Antikörper der Gruppe 2, MAK 3B5. Linke Abbildung: unverdautes PrP^{Sc}, rechte Abbildung: PK-verdautes PrP^{Sc}. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen (M: Marker: Histidin-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

Gruppe 2: In diese Gruppe gehört nur der MAK 3B5. Er detektierte vor dem PK-Verdau die Scrapieisolate und das BSE-Isolat, die 11 kDa Bande der atypischen Scrapieisolate wurde aber auch hier nur sehr schwach oder gar nicht erkannt. Nach PK-Verdau erkannte dieser Antikörper nur die klassischen Scrapieisolate, nicht aber die atypischen Scrapieisolate oder das BSE-Isolat (Abb. 4.35).

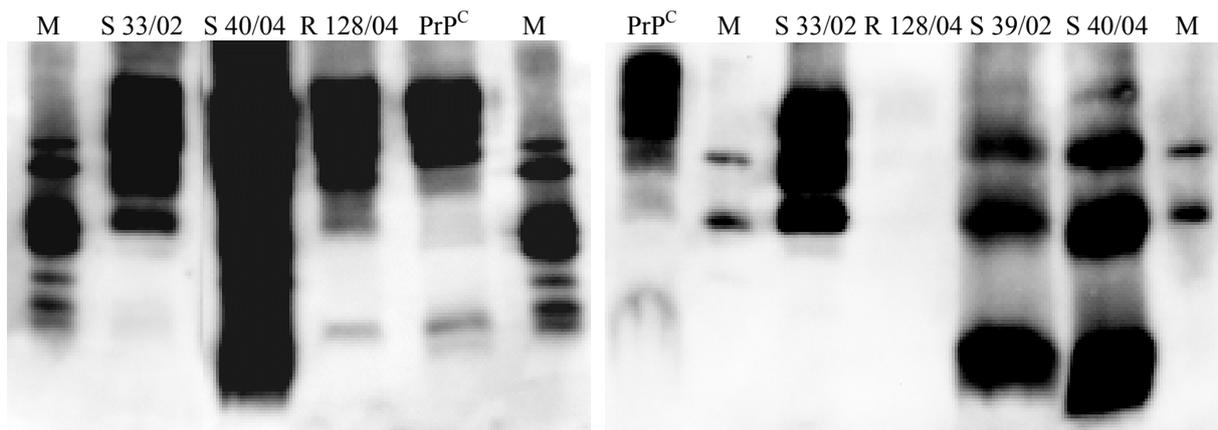


Abb. 4.36: Western Blot eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04) und von zwei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02 und S 40/04) mit einem Antikörper der Gruppe 3, MAK 12B2. Linke Abbildung: unverdautes PrP^{Sc}, rechte Abbildung: PK-verdautes PrP^{Sc}. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen (M: Marker: Histidin- bzw. P4-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 – 16,2 kDa Größe).

Gruppe 3: In diese Gruppe gehören die Antikörper, die Epitope im Bereich der PK-Schnittstelle besitzen. Sie erkannten vor dem PK-Verdau sowohl das klassische als auch das atypische Scrapieisolat inklusive der 11 kDa Bande und das BSE-Isolat. Nach PK-Verdau wurde das BSE-Isolat nicht mehr detektiert, aber das klassische und das atypische Scrapieisolat inklusive der 11 kDa Bande wurden erkannt (Abb. 4.36).

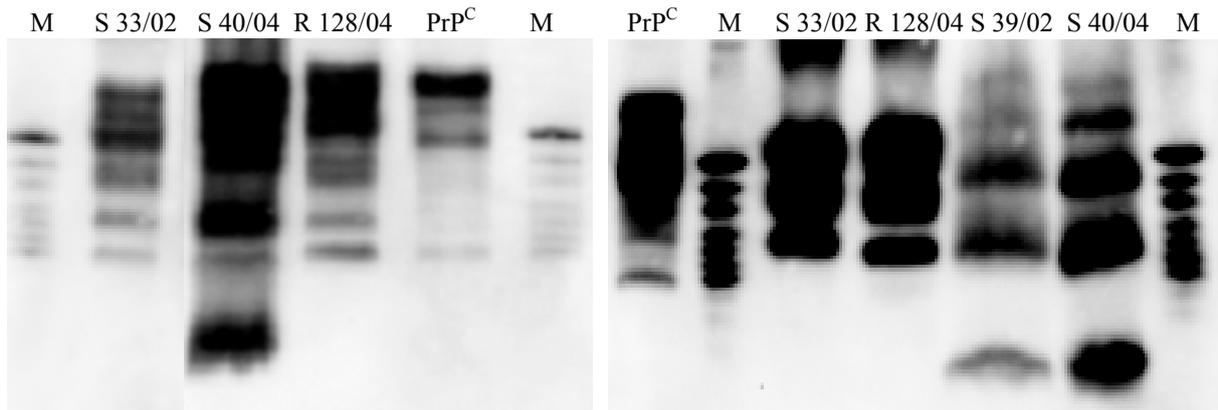


Abb. 4.37: Western Blot eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04) und von zwei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02 und S 40/04) mit einem Antikörper der Gruppe 4, MAK L42. Linke Abbildung: unverdautes PrP^{Sc}, rechte Abbildung: PK-verdautes PrP^{Sc}. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen (M: Marker: Histidin-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

Gruppe 4: Die Antikörper der Gruppe 4 erkannten sowohl vor als auch nach PK-Verdau das klassische und das atypische Scrapieisolat inklusive der 11 kDa Bande und das BSE-Isolat (Abb. 4.37).

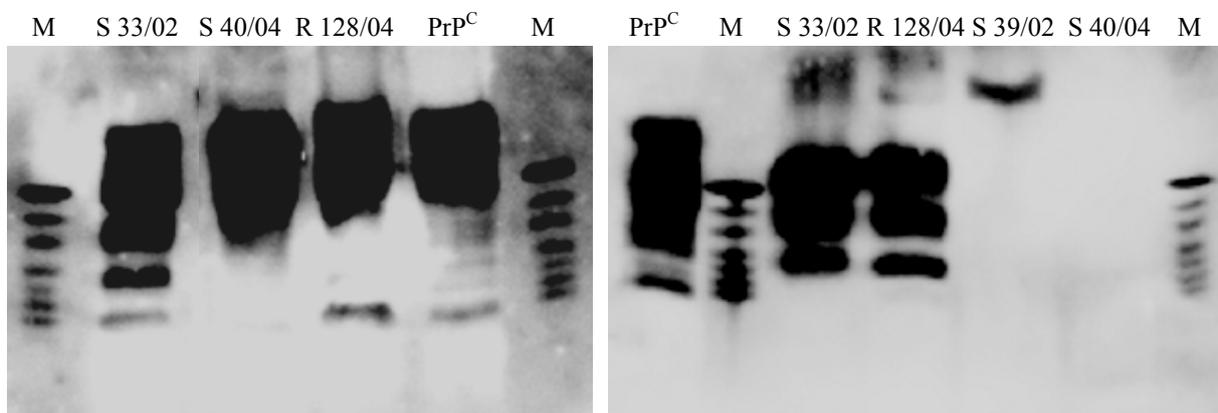


Abb. 4.38: Western Blot eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04) und von zwei atypischen Scrapieisolaten (S 39/02 und S 40/04) mit einem Antikörper der Gruppe 5, MAK ICSM18. Linke Abbildung: unverdautes PrP^{Sc}, rechte Abbildung: PK-verdautes PrP^{Sc}. Zum Nachweis der erfolgten Antikörperbindung wurde auf jedes Gel unverdautes PrP^C eines negativen Schafes geladen (M: Marker: Histidin-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe).

Gruppe 5: Die Antikörper dieser Gruppe erkannten vor PK-Verdau das klassische Scrapieisolat und das BSE-Isolat und die obersten drei Banden der atypischen Scrapieisolate. Nach PK-Verdau wurden die atypischen Scrapieisolate nicht mehr erkannt (Abb. 4.38).

4.2.1.3 Antikörperbindungsverhältnis

Aufgrund der geringen Signalstärken im Western Blot konnte das Antikörperbindungsverhältnis vom P4 zum L42 nur bei drei atypischen Scrapieisolaten ermittelt werden (Abb. 4.39). Als Kontrolle diente das klassische Scrapieisolat S 33/02 und das BSE-Isolat R 128/04. Das Antikörperbindungsverhältnis des BSE-Isolates betrug 0,04, das des klassischen Scrapieisolates 1,3. Bei allen untersuchten atypischen Scrapieisolaten lag das Antikörperbindungsverhältnis zwischen 1,40 und 1,94 und somit deutlich höher als das des BSE-Isolates.

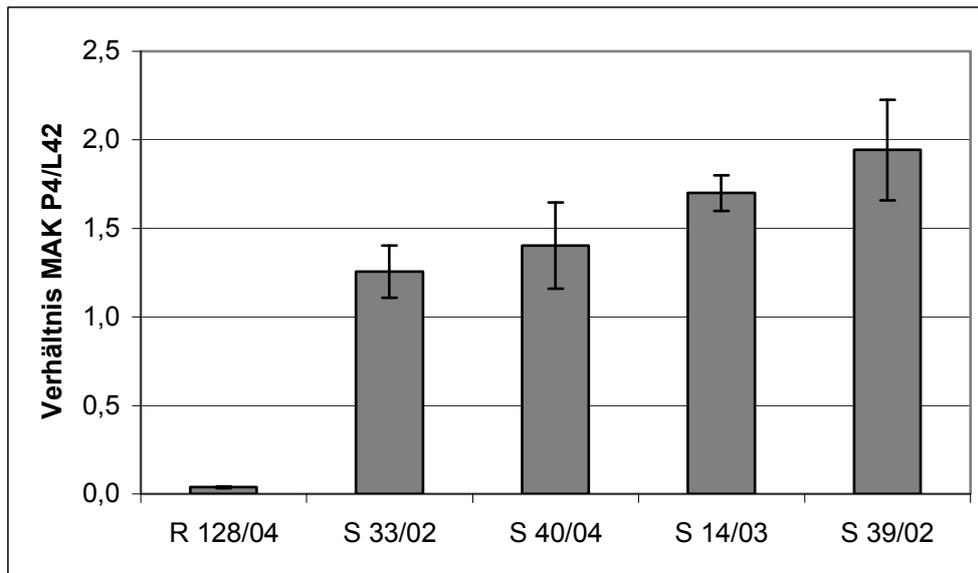


Abb. 4.39: Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 bei einem BSE-Isolat (R128/04), einem Isolat klassischer Scrapie (S 33/02) und drei Isolaten atypischer Scrapie.

4.2.1.4 PK-Stabilität

Die Untersuchung der PK-Stabilität erfolgte an den atypischen Scrapieisolaten S 39/02 und S 40/04. Als Kontrollen wurden ein klassisches Scrapieisolat (S 33/02), ein BSE-Isolat (R 128/04) und ein negatives Schaf verwendet. Das PrP^C des negativen Schafes wurde schon bei einer PK-Konzentration von 25 µg/ml vollständig verdaut. Das PrP^{Sc} des klassischen Scrapieisolates und des BSE-Isolates war selbst nach PK-Verdau bei einer Konzentration von 1000 µg/ml noch als starkes Signal im Western Blot zu detektieren. Im Gegensatz dazu war bei den beiden atypischen Scrapieisolaten das PrP^{Sc} im Western Blot schon bei PK-Konzentration von 500 µg/ml nur noch sehr schwach zu detektieren und bei einer PK-Konzentration von 1000 µg/ml war es fast komplett verdaut (Abb. 4.40).

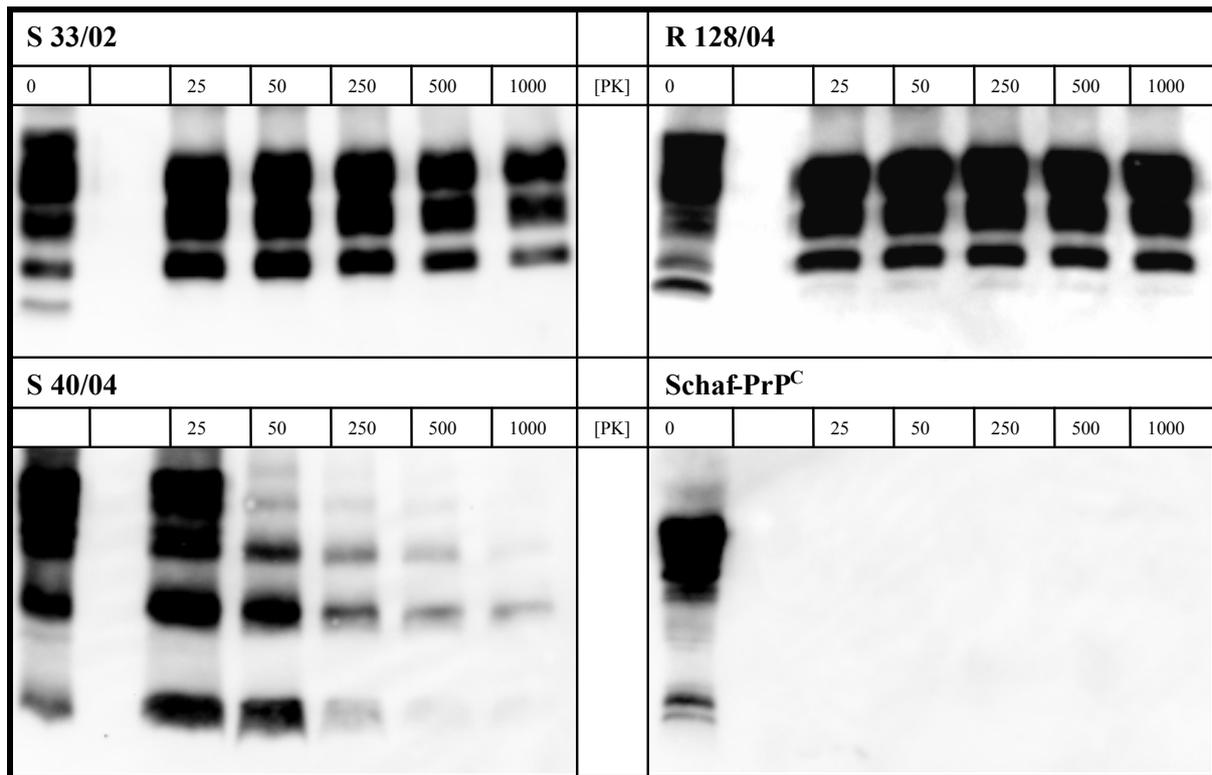


Abb. 4.40: PK-Stabilität eines klassischen Scrapieisolates (S 33/02), eines BSE-Isolates (R 128/04), eines atypischen Scrapieisolates (S 40/04) und eines negativen Schafes. Signalstärke im Western Blot nach Inkubation mit PK-Konzentrationen von 0, 25, 50, 250 und 500 µg/ml PK für 1 Stunde bei 55°C (Western Blot, Antikörper L42, PK: PK-Konzentration).

4.2.1.5 Deglykosylierung

Die Deglykosylierung wurde jeweils im Anschluss an eine PTA-Fällung durchgeführt. Dazu wurden die atypischen Scrapieisolate S 39/02 und S 40/04 verwendet. Als Kontrolle diente das klassische Scrapieisolat S 33/02 und das BSE-Isolat R 128/04. Ohne PK-Verdau war nach der Deglykosylierung bei dem klassischen Scrapieisolat eine Zunahme des unglykosylierten PrP^{Sc} im Western Blot sichtbar (Abb. 4.41). Auch bei den atypischen Scrapieisolaten verkleinerte sich der Anteil der Bande I zugunsten der Banden II und III im Western Blot. Die Deglykosylierung nach PK-Verdau war bei dem Scrapieisolat S 33/02 und dem BSE-Isolat R 128/04 durch die Abnahme der di- und monoglykosylierten PrP^{Sc}-Bande und die Zunahme der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu war bei den PK-verdauten atypischen Scrapieisolaten kein Unterschied zwischen der deglykosylierten und der nicht deglykosylierten Probe zu sehen.

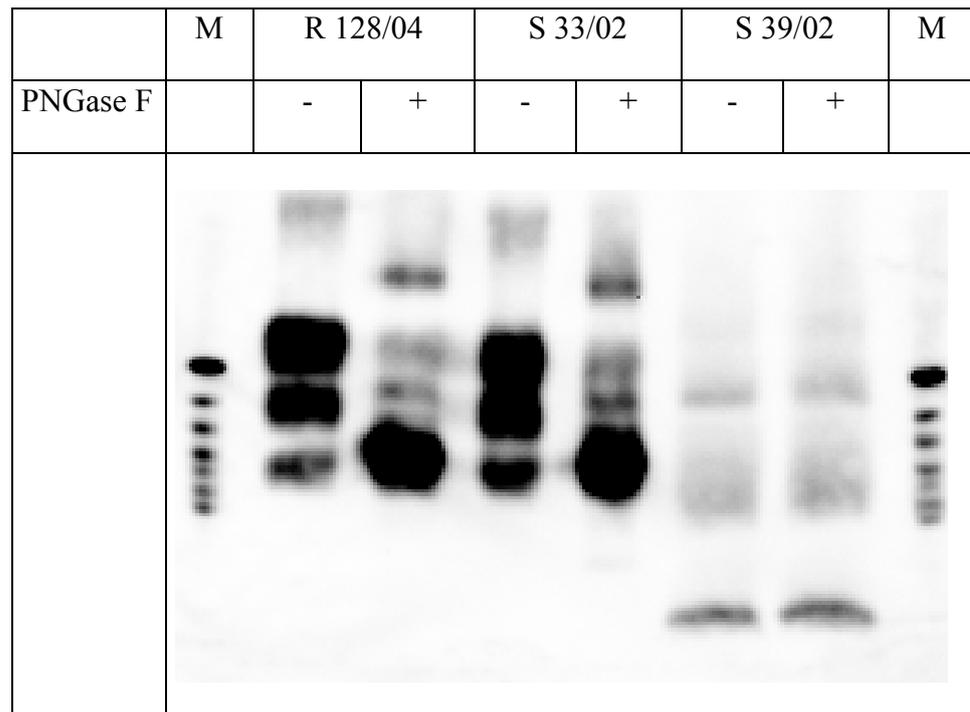


Abb. 4.41: Das BSE-Isolat R128/04, das klassische Scrapieisolat S 33/02 und das atypische Scrapieisolat S 39/02 nach PTA-Fällung und PK-Verdau mit und ohne Deglykosylierung (Western Blot, MAK L42, M: Marker: Histidin-markierter FLI-Marker mit Markern von 23,0 – 21,5 – 20,3 – 19,2 – 18,0 – 17,1 - 16,2 kDa Größe, PNGase F +/-: mit oder ohne Deglykosylierung).

4.2.2 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate in der Maus

Die Ergebnisse der Übertragungsversuche inklusive mittlere Inkubationszeiten, Übertragungsraten und mittlere Lebensdauer sind für alle atypischen Scrapieinokulate und alle Mauslinien in Tabelle 9.3.4 und in den Abbildung 4.42, 4.43, 4.44 und 4.45 vergleichend dargestellt. Einen Überblick über das Bandenprofil der mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäuse gibt Abb. 4.46. Die Läsionsprofile werden für jedes Inokulat einzeln und dann noch einmal vergleichend für die atypischen Scrapieisolate in den Tgshp-Mäusen abgebildet (Abb. 4.47 und 4.48) und anschließend mittels der Clusteranalyse (Abb. 4.49) verglichen.

4.2.2.1 Klinische Symptome, Übertragungsraten und Inkubationszeiten

Tgshp-Mäuse Alle elf deutschen atypischen Scrapieisolate ließen sich auf Tgshp-Mäuse übertragen. Die Übertragungsraten aller Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Nachweis lagen dabei zwischen 35 % bei dem Isolat S 10/02 bis 80 % bei dem Isolat S 38/02 und waren im Durchschnitt geringer als bei den mit klassischen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen. Die Inkubationszeiten betragen zwischen 283 Tagen bei dem Isolat S 25/02 und 421 Tagen bei

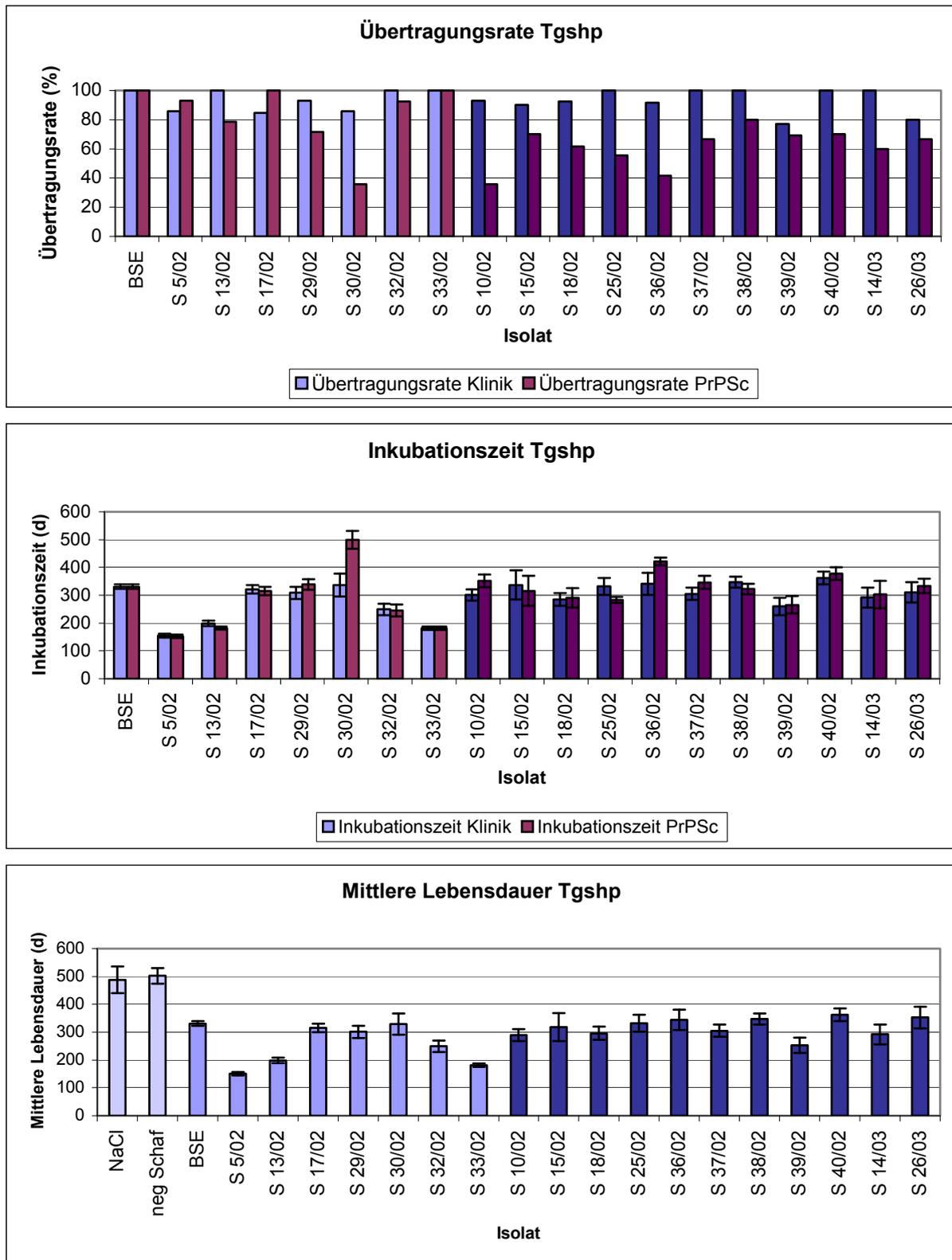


Abb. 4.42: Übertragungsraten und Inkubationszeiten aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten Tgshp-Mäuse bzw. aller Tgshp-Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Befund sowie mittlere Lebensdauer aller infizierten Tgshp-Mäuse pro Versuch und von den Negativkontrollen. Das BSE-Isolat und die klassischen Scrapieisolatate sind farblich heller dargestellt als die atypischen Scrapieisolatate. Die Längsbalken geben den Standardfehler der Inkubationszeiten und der mittleren Lebensdauer an.

dem Isolat S 36/02 und waren durchschnittlich etwas länger als bei den mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen. Keines der atypischen Scrapieisolate zeigte mittlere Inkubationszeiten um 150 bis 180 Tage, wie es bei den klassischen Scrapieisolaten auftrat, aber einzelne Mäuse wurden nach Inkubationszeiten von 151 (S 14/03) bzw. 165 Tagen (S 18/02) aufgrund klinischer Symptome euthanasiert und waren PrP^{Sc}-positiv. Der Standardfehler der mittleren Inkubationszeiten war deutlich größer als bei den klassischen Scrapieisolaten und lag bei keinem der atypischen Scrapieisolate unter 10 (Tab. 9.3.4). Bei den Isolaten S 25/02 und S 36/02 war er mit 10,9 bzw. 13,3 am niedrigsten, bei den Isolaten S 14/03 und S 15/02 mit 49,4 und 53,5 am höchsten (Abb. 4.42).

Bei fünf der elf untersuchten atypischen Scrapieisolate (S 18/02, S 25/02, S 36/02, S 38/02, S 14/03) waren alle Mäuse, bei denen im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte, auch in der Immunhistologie PrP^{Sc}-positiv. Bei vier Isolaten (S 15/02, S 37/02, S 39/02, S 40/02) waren ein oder zwei Mäuse im Western Blot, nicht aber in der Immunhistologie PrP^{Sc}-positiv und bei zwei Isolaten (S 10/02, S 26/03) war eine Maus in der Immunhistologie, nicht aber im Western Blot PrP^{Sc}-positiv.

Die Übertragungsrate aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten Tgshp-Mäuse war deutlich höher als die PrP^{Sc}-Übertragungsrate und lag bei neun der elf inokulierten atypischen Scrapieisolate zwischen 90 und 100 %, d.h. deutlich mehr Tiere zeigten klinische Symptome, als PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn.

Wildtypmauslinien In den drei Wildtypmauslinien konnte weder im Western Blot noch in der Immunhistologie eine Übertragung der atypischen Scrapieisolate nachgewiesen werden.

RIII-Mäuse Bei den Isolaten S 10/02, S 15/02, S 25/02 und S 37/02 lag die klinische Übertragungsrate zwischen 90 und 100 %, bei allen anderen atypischen Scrapieisolaten zwischen 35 und 70 % (Abb. 4.43). Bei den Isolaten S 15/02 und S 25/02 war die klinische Inkubationszeit mit 392,3 Tagen bzw. 385,4 Tagen auffallend kurz, der Standardfehler mit 11,4 bzw. 15,7 relativ niedrig. Die mittlere Lebensdauer bei diesen beiden Isolaten war fast genauso kurz wie die klinische Inkubationszeit und somit deutlich niedriger als bei den Negativkontrollen. Bei dem Isolat S 14/03 war die klinische Übertragungsrate mit 35,7 % zwar sehr gering, da fünf von 14 Mäusen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurden, aber die klinische Inkubationszeit war mit 422,4 Tagen sehr kurz und der Standardfehler lag bei 0,9 %, da diese fünf Mäuse in einem Zeitraum von fünf Tagen klinische Symptome zeigten. Bei dem Isolat S 26/03 betrug die klinische Übertragungsrate 60 %, die klinische Inkubationszeit war mit 354,3 Tagen deutlich verkürzt, die mittlere Lebensdauer lag bei 429,1 Tagen. Der Standardfehler war mit 39,8 bzw. 47,3 jedoch sehr groß.

VM95-Mäuse Bei den VM95-Mäusen lag der Anteil der Mäuse, welche aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurden, sehr hoch. Sieben der elf inokulierten atypischen Scrapieisolate wiesen klinische Übertragungsraten zwischen 80 und 100 % auf, bei drei Isolaten lag sie zwischen 50 und 80 % und nur bei dem Isolat S 26/03 wurden lediglich 20 % der Mäuse aufgrund klinischer Symptome euthanasiert (Abb. 4.44). Die klinische Inkubationszeit aller VM95-Mäuse war jedoch relativ lang und keines der Isolate zeigte eine klinische Inkubationszeit unter 400 Tagen, wie es bei den RIII-Mäusen der Fall war. VM95-Mäuse zeigen aber auch nach Inokulation mit klassischen Scrapieisolaten längere Inkubationszeiten als RIII-Mäuse. Bei den Isolaten S 10/02, S 15/02, S 18/02, S 25/02 und S 40/02 betrug die klinische Inkubationszeit zwischen 480 und 530 Tagen und auch die mittlere Lebensdauer aller in diesen Versuchen eingesetzten Mäuse war deutlich kürzer als bei den Kontrolltieren.

C57Bl6-Mäuse Bei den C57Bl6-Mäusen war die klinische Übertragungsrate deutlich geringer als bei den anderen Wildtypmauslinien. Nur bei den atypischen Scrapieisolaten S 25/02, S 38/02 und S 40/02 lag sie zwischen 67 und 94 %, bei allen anderen Isolaten zwischen 0 und 40 % (Abb. 4.45). Auffallend war die klinische Inkubationszeit der mit dem Isolat S 14/03 inokulierten C57Bl6-Mäuse mit 382,3 Tagen, wobei aber nur drei von 15 Mäusen klinische Symptome aufwiesen. Die mittlere Lebensdauer der Mäuse war nach Inokulation der Isolate S 25/02 und S 40/02 mit etwa 500 Tagen deutlich kürzer als bei den Negativkontrollen.

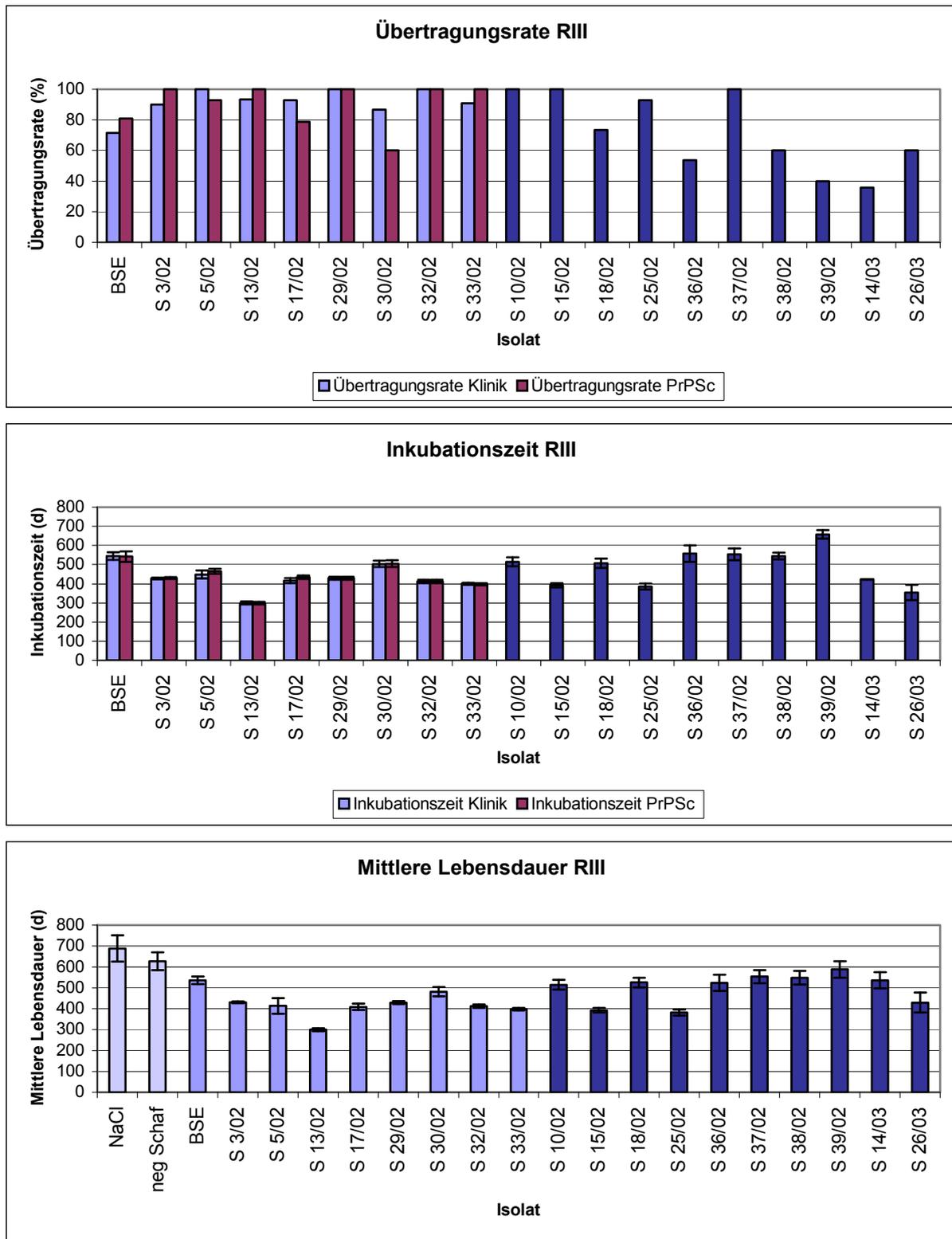


Abb. 4.43: Übertragungsraten und Inkubationszeiten aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten RIII-Mäuse bzw. aller RIII-Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Befund sowie mittlere Lebensdauer aller infizierten RIII-Mäuse pro Versuch und von den Negativkontrollen. Das BSE-Isolat und die klassischen Scrapieisolat sind farblich heller dargestellt als die atypischen Scrapieisolat. Die Längsbalken geben den Standardfehler der Inkubationszeiten und der mittleren Lebensdauer an.

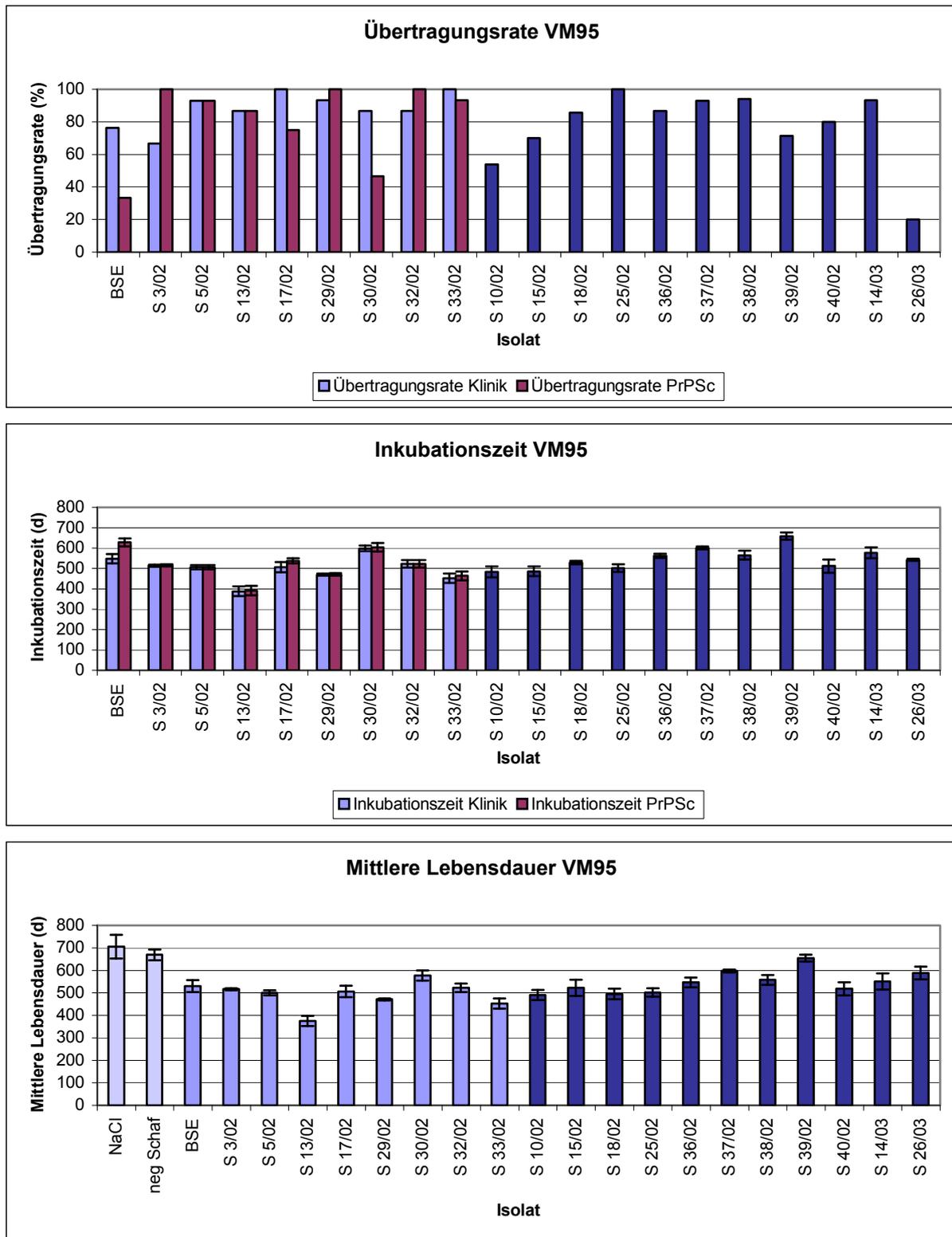


Abb. 4.44: Übertragungsraten und Inkubationszeiten aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten VM95-Mäuse bzw. aller VM95-Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Befund sowie mittlere Lebensdauer aller infizierten VM95-Mäuse pro Versuch und von den Negativkontrollen. Das BSE-Isolat und die klassischen Scrapieisolate sind farblich heller dargestellt als die atypischen Scrapieisolate. Die Längsbalken geben den Standardfehler der Inkubationszeiten und der mittleren Lebensdauer an.

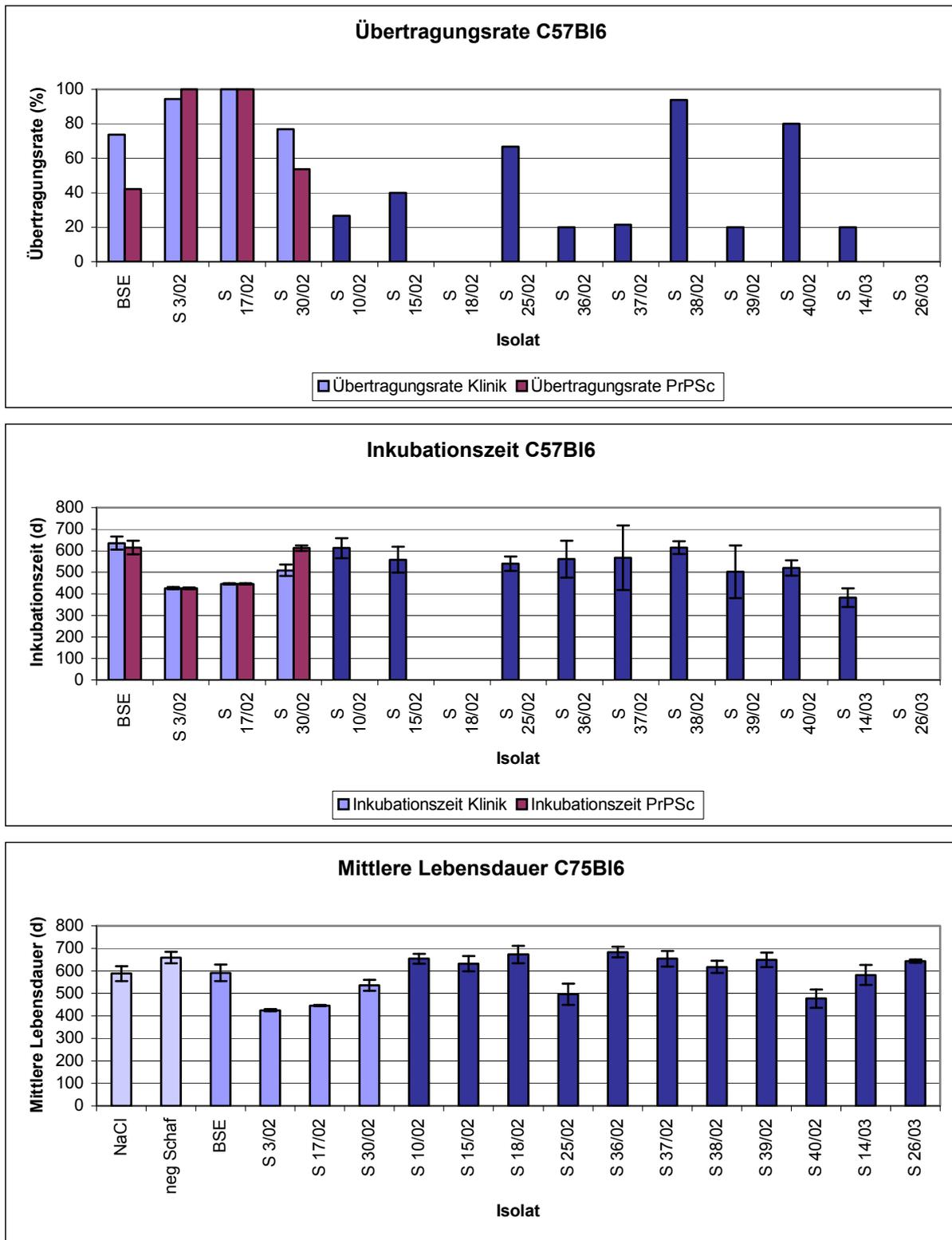


Abb. 4.45: Übertragungsraten und Inkubationszeiten aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten C57Bl6-Mäuse bzw. aller C57Bl6-Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Befund sowie mittlere Lebensdauer aller infizierten C57Bl6-Mäuse pro Versuch und von den Negativkontrollen. Das BSE-Isolat und die klassischen Scrapieisolatete sind farblich heller dargestellt als die atypischen Scrapieisolaten. Die Längsbalken geben den Standardfehler der Inkubationszeiten und der mittleren Lebensdauer an.

4.2.2.2 Proteinbiochemische Charakterisierung

Eine Übertragung der atypischen Scrapieisolate konnte bei den Tgshp-Mäusen nachgewiesen werden. Alle elf deutschen atypischen Scrapieisolate zeigten im Western Blot vier PrP^{Sc}-Banden, d.h. das Bandenmuster der atypischen Scrapie im Schaf führte in Tgshp-Mäusen zur Ausbildung des gleichen PrP^{Sc}-Musters (Abb. 4.46). Die PrP^{Sc}-Banden III und IV waren dabei die Banden mit der größten Signalstärke im Western Blot, die PrP^{Sc}-Bande IV hatte eine Molekularmasse von etwa 11 kDa.

In den mit atypischer Scrapie infizierten Wildtypmauslinien konnte bis auf einige Ausnahmen kein Signal im Western Blot detektiert werden. Bei längerer Expositionszeit trat ein schwaches Signal mit mehreren Banden bei sechs RIII-Mäusen und zwei VM-Mäusen, die mit dem Isolat S 25/02 inokuliert worden waren sowie ein schwaches Signal mit nur einer Bande bei einer C57Bl6-Maus, die mit dem Isolat S 36/02 inokuliert worden war, auf. Da für eine weitere PTA-Fällung zur Absicherung dieser Ergebnisse nicht ausreichend Material zur Verfügung stand und diese Mäuse in der Immunhistologie PrP^{Sc}-negativ waren, erscheint die Durchführung einer Subpassage indiziert.

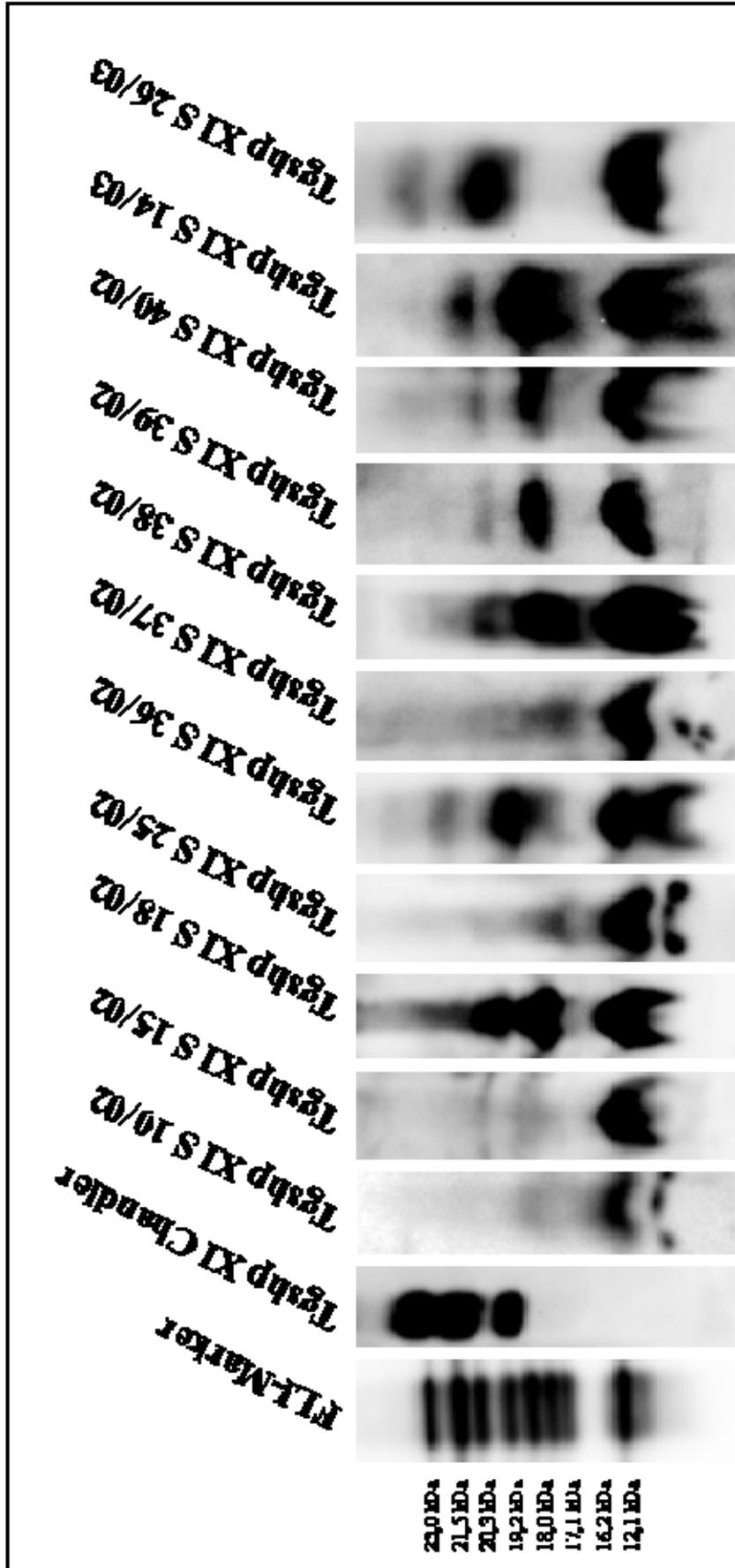


Abb. 4.46: Bandenprofil der mit verschiedenen atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mauslinie. Als Vergleich ist ein klassischer Scrapiestamm (Chandler) in den Tgshp-Mäusen dargestellt, welcher das typische Glykosylierungsprofil mit di-, mono- und unglykosylierter PrP^{Sc}-Bande zeigt. Im Gegensatz dazu treten bei den atypischen Scrapieisolaten vier Banden auf, wobei die Bande I und II oft nur sehr undeutlich zu erkennen sind, während die Bande IV die stärkste Bande darstellt (Western Blot, MAK L42).

4.2.2.3 Histologische Charakterisierung

Tgshp-Mäuse Histopathologisch zeigten die mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäuse ein sehr einheitliches Bild. PrP^{Sc}-Ablagerungen waren als grobschollige Ablagerungen in der Molekularschicht vom Kleinhirn (Abb. 9.41, 9.42, 9.43 und 9.44), als granulär erscheinende Plaques im Corpus callosum (Abb. 9.45a, 9.45c), als feingranuläre Ablagerungen in der lakunaren Molekularschicht vom Hippocampus (Abb. 9.45b) und vereinzelt im lateralen Thalamus nachweisbar. Zelluläre PrP^{Sc}-Ablagerungen waren nicht zu beobachten. In der Milz der Tgshp-Mäuse konnte kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Die Gliose korrelierte überwiegend zur PrP^{Sc}-Ablagerung und trat gering- bis mittelgradig in der Molekularschicht vom Kleinhirn, im Corpus callosum und Hippocampus (Abb. 9.46) auf. Obwohl in der Granularschicht vom Kleinhirn keine PrP^{Sc}-Ablagerungen nachweisbar waren, kam in dieser Zone dennoch eine deutliche Gliose vor (Abb. 9.48). Bei der Mehrheit der infizierten Tgshp-Mäuse stellte sich die Granularschicht des Kleinhirns in der H.-E.-Färbung sehr stark aufgelockert dar und im Gegensatz zu uninfizierten Kontrollmäusen waren die Zellkerne der Granularschicht deutlich weniger angefärbt (Abb. 9.51, 9.53). Zusammenfassend konnte die Morphologie der Granularschicht deswegen als irregulär bezeichnet werden.

Eine Vakuolisierung war bei den mit atypischen deutschen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen in den Ebenen G3, G6, G8, G9 und W1, W2 und W3 nachweisbar, alle anderen Regionen waren nicht vakuolisiert. Die Läsionsprofile sind Abb. 4.47 und Tab. 9.3.10 zu entnehmen. Bei den Mäusen, die in der Immunhistologie und im Western Blot die stärksten PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn zeigten, stellte sich die Vakuolisierung der genannten Ebenen stärker dar als bei den Mäusen, bei denen nur geringe PrP^{Sc}-Ablagerungen auftraten. Nach Inokulation aller atypischen Scrapieisolate trat im Hippocampus (G6) der Tgshp-Mäuse eine deutliche Vakuolisierung auf (Abb. 9.49, 9.50), die Mittelwerte für diese Region lagen zwischen einem Vakuolisierungsgrad von 0,8 bei dem Isolat S 10/02 und 3,0 bei den Isolaten S 25/02 und S 36/02. Bei einzelnen Mäusen wurde ein Läsionsgrad bis 4 beobachtet. Die Vakuolen waren dabei oft auf die lakunare Molekularschicht begrenzt. Daneben waren auch der Colliculus superior (G3) und der Cortex auf Ebene des Zwischenhirns (G8) und des Endhirns (G9) vakuolisiert. Bei sieben atypischen Scrapieisolaten betrug der Mittelwert des Vakuolisierungsgrades im Colliculus superior zwischen 0,4 und 0,8, bei vier Isolaten zeigte keine der infizierten Mäuse in diesem Gebiet Vakuolen. Bei den Einzeltieren wurde in dieser Region ein Läsionsgrad bis 1 beobachtet, nur eine Tgshp-Maus, die mit dem Isolat S 38/02 infiziert worden war, zeigte einen Vakuolisierungsgrad von 2. Die Ebenen G8 und G9 (Cortex) waren bei zehn bzw. neun von elf atypischen Scrapieisolaten vakuolisiert. Auch hier betrug der

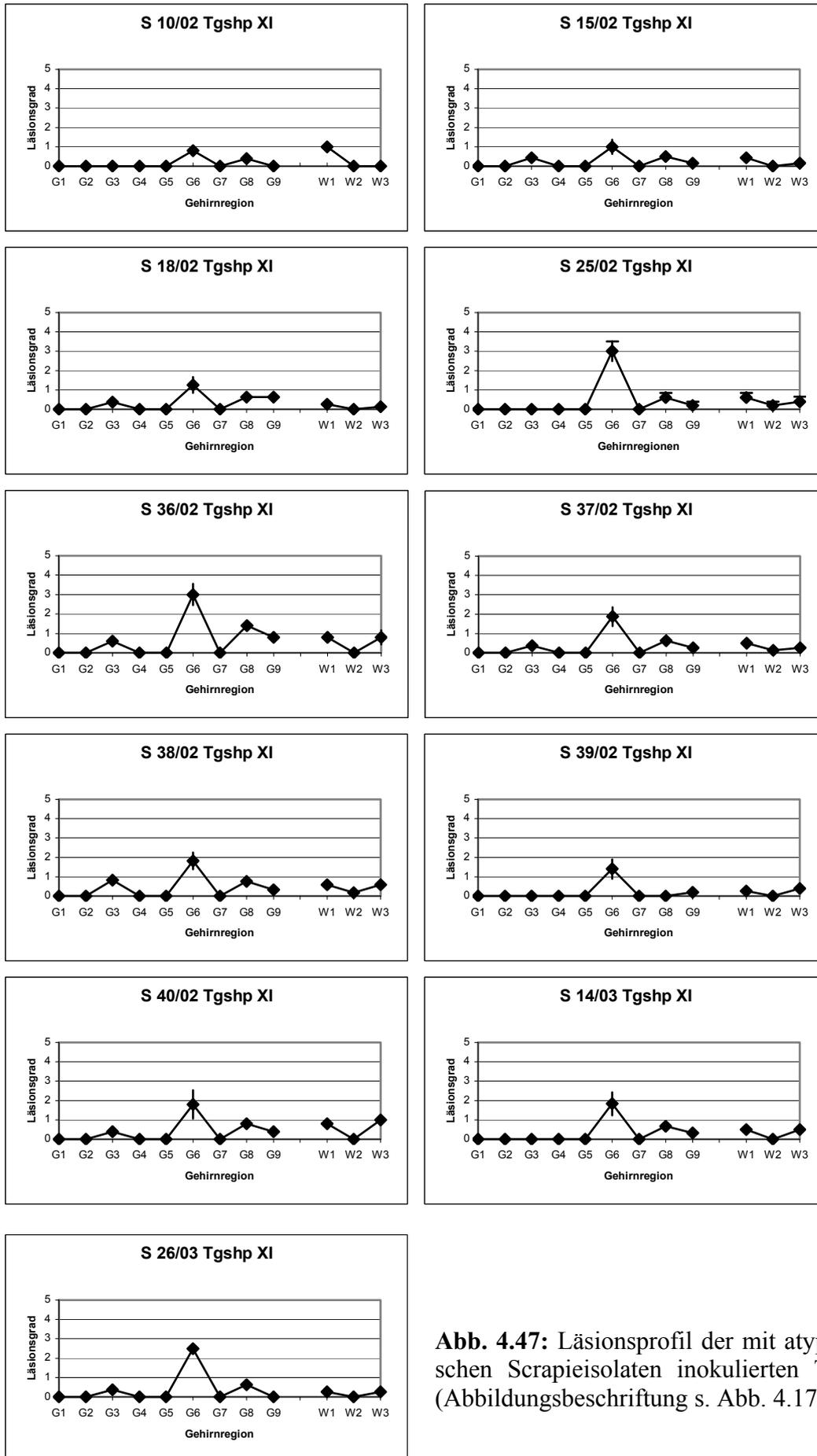


Abb. 4.47: Läsionsprofil der mit atypischen deutschen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäuse (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

Läsionsgrad der Einzeltiere bis auf zwei Ausnahmen bei den Isolaten S 36/02 und S 38/02, wo jeweils eine Maus einen Vakuolisierungsgrad von 2 in dieser Region aufwies, als Maximum 1 Läsionsgrad. Bei der weißen Substanz war die Decussatio tegmenti (W2) am wenigsten vakuolisiert: Nur bei drei Isolaten lag der mittlere Vakuolisierungsgrad zwischen 0,1 und 0,2. Die weiße Substanz vom Kleinhirn (W1) war bei allen elf atypischen Scrapieisolaten und die Capsula interna (W3) bei zehn Isolaten vakuolisiert, der mittlere Vakuolisierungsgrad lag zwischen 0,3 und 1,0 bzw. 0,1 und 1,0. Der Vakuolisierungsgrad der Einzeltiere war bis auf zwei mit dem Isolat S38/02 infizierten Mäuse auf ein Maximum von 1 Läsionsgrad begrenzt. In den Regionen G1, G2, G4, G5 und G7 wurde dagegen keine Vakuolisierung beobachtet.

Clusteranalyse Die Ähnlichkeit der Läsionsprofile der atypischen deutschen Scrapieisolate wird durch die Clusteranalyse bestätigt. Der maximale Abstand zwischen einzelnen Isolaten liegt bei 1,6 (Abb. 4.49).

In Abbildung 4.48 sind die Läsionsprofile der Tgshp-Mäuse nach Inokulation mit elf deutschen atypischen Scrapieisolaten und die Läsionsprofile von Tg338-Mäusen nach Erstinfektion und Subpassage mit norwegischen und französischen atypischen Scrapieisolaten (LE DUR et al. 2005) vergleichend dargestellt. Die Maxima der Vakuolisierung liegen bei allen atypischen Scrapieisolaten in den Regionen G3, G6 und G8, in den Regionen G1, G2, G4, G5 und G7 konnte keine Vakuolisierung nachgewiesen werden. Lediglich in der Vakuolisierung der weißen Substanz (Regionen W1 bis W3) ist ein Unterschied zwischen deutschen und französischen bzw. norwegischen atypischen Scrapieisolaten nachweisbar.

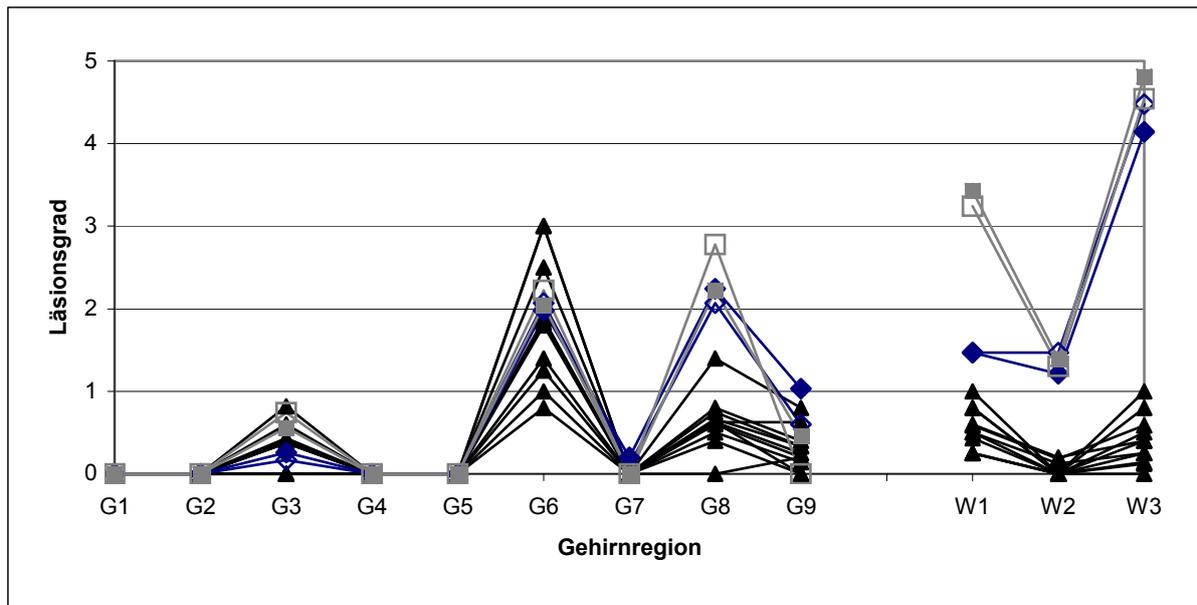


Abb. 4.48: Läsionsprofil der Tgshp-Mäuse nach Inokulation mit elf deutschen atypischen Scrapieisolaten und Läsionsprofil der Tg338-Mäuse nach Erstinfektion und Subpassage mit norwegischen und französischen atypischen Scrapieisolaten (Abbildungsbeschriftung s. Abb. 4.17).

- ▲— Atypische Scrapie, Deutschland, Tgshp, Erstinfektion (11 Isolate)
- ◆— Atypische Scrapie, Norwegen, Tg338, Erstinfektion (2 Isolate)
- ◇— Atypische Scrapie, Norwegen, Tg338, Subpassage (2 Isolate)
- Atypische Scrapie, Frankreich, Tg338, Erstinfektion (3 Isolate - Genotyp ARR/ARR)
- Atypische Scrapie, Frankreich, Tg338, Erstinfektion (5 Isolate - andere Genotypen)

In die Clusteranalyse wurden zusätzlich die norwegischen und französischen atypischen Scrapie-Fälle mit hineinbezogen. Wurden alle zwölf Regionen vergleichend betrachtet, so betrug der maximale Abstand der Cluster 5,2 (Abb. 4.49). Betrachtet man nur die neun Regionen der grauen Substanz, so zeigt sich auch daran die hohe Ähnlichkeit innerhalb der europäischen atypischen Scrapieisolate.

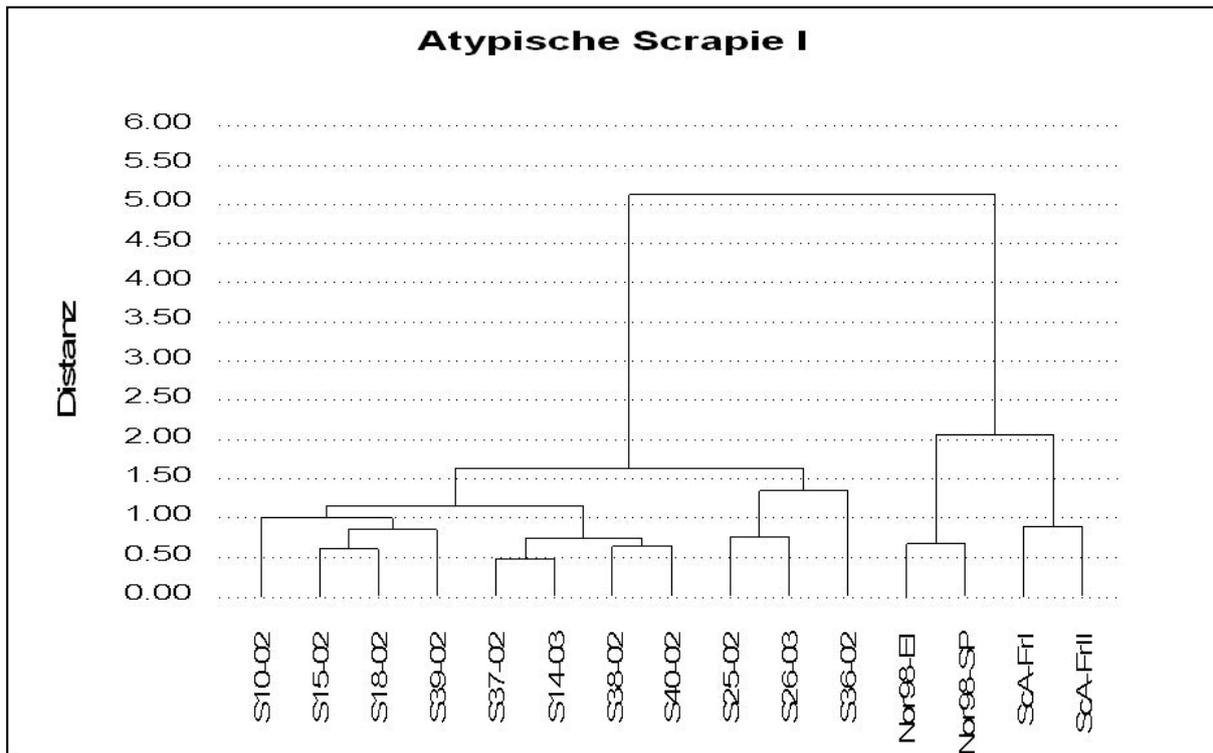


Abb. 4.49: Dendrogramm zur Darstellung der Ähnlichkeit der Läsionsprofile bei Tgshp-Mäusen nach Inokulation mit elf deutschen atypischen Scrapieisolaten und bei Tg338-Mäusen nach Erstinfektion (EI) bzw. Subpassage (SP) mit norwegischen (Nor98) und französischen atypischen (ScA-FrI und ScA-FrII) Scrapieisolaten. Je geringer die Distanz zweier Isolate auf der Y-Achse ist, umso größer ist die Ähnlichkeit der Isolate. Im oberen Diagramm umfasst die Clusteranalyse alle 12 Regionen des Läsionsprofils, im unteren Diagramm nur die 9 Regionen der grauen Substanz.

Wildtypmauslinien Bei den mit atypischen Scrapieisolaten infizierten Wildtypmauslinien war mittels Immunhistologie kein PrP^{Sc} in den Gehirnen oder in der Milz nachweisbar. Die Gliose war bis auf wenige Ausnahmen alterstypisch. Bei einem Teil der RIII- und der VM95-Mäuse und dem überwiegenden Teil der C57Bl6-Mäuse traten Altersvakuolen in der weißen Substanz vom Kleinhirn auf. Ein Hydrocephalus trat bei einem Teil der mit den Isolaten S 37/02 und S 14/03 inokulierten VM95-Mäusen sowie bei mehr als der Hälfte aller inokulierten C57Bl6-Mäuse in Erscheinung.

Vereinzelt kamen homogen erscheinende Reaktionsmuster in einem oder mehreren Milzfollikeln vor, denen die spezifische granuläre Darstellung von PrP^{Sc} in der Milz jedoch fehlte. Dies war bei zwei RIII- und fünf C57Bl6-Mäusen, die mit dem Isolat S 25/02 inokuliert wurden waren, bei einer mit dem Isolat S 36/02 inokulierten C57Bl6-Maus (Abb. 9.58) und bei einer mit dem Isolat S 39/02 inokulierten C57Bl6-Maus (Abb. 9.57) der Fall. Bei einer VM95-Maus, die mit dem Isolat S 37/02 inokuliert wurden war sowie bei drei VM95-Mäusen, die mit dem Isolat S 38/02 inokuliert wurden waren und bei denen im Western Blot kein PrP^{Sc} detektiert werden konnte, trat in der Immunhistologie in der lakunaren Molekularschicht vom Hippocampus ein fein-granuläres Reaktionsmuster auf, das dem PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster von der Lokalisation und der Art bei den Tgshp-Mäusen sehr ähnlich sah (Abb. 9.55 und 9.56). Bei den mit dem Isolat S 39/02 inokulierten RIII-Mäusen war trotz negativem PrP^{Sc}-Nachweis in der Immunhistologie und im Western Blot bei allen Mäusen eine Gliose, die über das altersspezifische Maß hinausging, zu verzeichnen. Über alle Ebenen lag eine gleichmäßig verteilte Vakuolisierung vor, bei zwei Mäusen traten im Corpus callosum Vakuolennester mit zahlreichen Makrophagen auf (Abb. 9.59 und 9.60). Weiterhin auffällig war eine mittelgradige herdförmige Gliose bei vier VM95-Mäusen, die mit dem Isolat S 18/02 inokuliert wurden waren sowie eine lokale Vakuolisierung im Corpus callosum mit umgebenden Makrophagen bei einer mit dem Isolat S 14/03 infizierten RIII-Maus.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung deutscher klassischer und atypischer Scrapieisolate. Die klassischen Scrapieisolate sollten durch biochemische und histologische Stammcharakteristika definiert und dadurch vom BSE-Erreger abgegrenzt werden. Diese Untersuchungen wurden dabei zum Vergleich der angewandten Differenzierungsmethoden sowohl direkt am Schafmaterial (FLI-Test) als auch im klassischen Maus-Bioassay durchgeführt. Neben den bisher verwendeten Inzuchtmauslinien RIII, VM95 und C57Bl6 wurde dabei zusätzlich eine transgene Mauslinie, Tgshp, welche das Schafprionprotein überexprimiert, zur Stammcharakterisierung verwendet.

Bei den atypischen Scrapieisolaten sollten biochemische Charakteristika direkt am Schafmaterial erfasst werden, weiterhin sollte die Infektiosität und somit der Nachweis der Übertragbarkeit im Mausmodell untersucht und wenn möglich, eine Abgrenzung zum BSE-Erreger durchgeführt werden.

5.1 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate

5.1.1 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Schafmaterial (FLI-Test)

Im FLI-Test wurden 36 deutsche klassische Scrapieisolate, ein Isolat oviner BSE und zwei BSE-Isolate anhand der Glykosylierungsverhältnisse, des Antikörperbindungsverhältnisses und der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande genauer charakterisiert.

Zeigt ein Scrapieisolat in allen drei biochemischen Charakteristika Abweichungen zur klassischen Scrapie-Kontrolle, so wird es als BSE-verdächtig eingestuft und zur weiteren Differenzierung im Mausbioassay untersucht. Dies gilt, wenn der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande mehr als 50 % am Gesamtsignal im Western Blot beträgt, wenn das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 niedriger als 0,4 ist und wenn die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande um mehr als 0,5 kDa niedriger ist als das der internen Scrapie-Kontrolle.

Die **Molekularmasse** der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande war bei allen 36 untersuchten Scrapieisolaten höher als das der BSE-Isolate und des Isolats oviner BSE. Die Molekularmasse des ovinen BSE-Isolates war sogar noch niedriger als das des bovinen BSE-Isolates. Anhand dieses biochemischen Charakteristikums konnten alle untersuchten Scrapieisolate sicher vom BSE-Erreger abgegrenzt werden.

Das **Antikörperbindungsverhältnis** lag bei 33 der 36 untersuchten Scrapieisolate im Bereich

zwischen 0,8 und 2,0 und war somit deutlich höher als bei dem BSE-Isolat (0,1) und dem Isolat oviner BSE (0,2). Lediglich ein Scrapieisolat, S 5/02, zeigte ein sehr niedriges Antikörperbindungsverhältnis von 0,4. Die Molekularmasse und das Glykosylierungsverhältnis lagen jedoch im Bereich der für die Scrapie-Kontrolle ermittelten Werte und zwei andere Isolate dieses Ausbruchs, S 3/02 und S 7/02, konnten in allen drei biochemischen Charakteristika eindeutig als klassische Scrapie abgegrenzt werden. Darüber hinaus lag bei den Isolaten S 4/02, S 6/02 und S 9/02 aus demselben Ausbruch das Antikörperbindungsverhältnis deutlich über 1,2 (Arbeitsgruppe INNT, FLI), deshalb wurde die Probe S 5/02 ebenfalls als klassische Scrapie eingestuft. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurde ein Mausbioassay durchgeführt.

Bei zwei Scrapieisolaten, S 23/02 und S 45/04, lag das Antikörperbindungsverhältnis mit 3,3 bzw. 2,4 sehr hoch. Beide Proben zeigten im Western Blot jedoch sehr geringe Signalstärken und lagen an der unteren Grenze des linearen Messbereiches des VersaDoc Imaging Systems. Es muss daher bedacht werden, dass der MAK P4 im Bereich niedriger Signalstärken Scrapieproben unproportional stärker anfärbt als der MAK L42, da er eine höhere Affinität zu Scrapie-PrP^{Sc} als zu PrP^{Sc} von BSE hat.

Das **Glykosylierungsverhältnis** konnte bei 33 der 36 untersuchten Scrapieisolate ermittelt werden. Drei Scrapieisolate, S 23/02, S 18/03 und S 104/04, zeigten zu geringe Signalstärken im Western Blot, um für die Ermittlung der Glykosylierungsverhältnisse verwendet werden zu können. Bei allen untersuchten Scrapieisolaten dominierte zwar die diglykosylierte PrP^{Sc}-Bande mit 38 bis 48 %, aber der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande der BSE-Isolate und der ovinen BSE war mit 53 bzw. 55 % deutlich höher. Lediglich bei einem Scrapieisolat, S 32/02, betrug der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande 51 %. Da das Antikörperbindungsverhältnis dieses Isolates mit 1,8 und die Molekularmasse mit 18,1 kDa eindeutig im Bereich der Scrapie-Kontrolle lagen, wurde das Isolat als Scrapie eingestuft und zur Absicherung der Ergebnisse ein Mausbioassay durchgeführt. Dass es sich trotz des hohen Anteils der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande um ein klassisches Scrapieisolat handeln kann, steht in Übereinstimmung mit der Beschreibung natürlicher Scrapieisolate, deren Glykosylierungsverhältnisse zwar dem des BSE-Erregers ähnelten, welche aber durch die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande von BSE abgegrenzt werden konnten (BARON et al. 1999, 2000). Dass die Variabilität der Glykosylierungsverhältnisse bei den Scrapieisolaten sehr groß ist (HILL et al. 1998, HOPE et al. 1999), konnte auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate bestätigt werden.

5.1.2 Charakterisierung klassischer Scrapieisolate am Mausmaterial

5.1.2.1 Übertragungsraten und Inkubationszeiten

Die Inkubationszeit war bei allen Isolaten in den Tgshp-Mäusen am kürzesten, da diese das Schafprionprotein überexprimieren und somit die Effekte der Speziesbarriere, welche bei Übertragung von Schafscrapie auf Mäuse auftritt, reduziert sind.

Auch das verwendete Scrapieisolat hat Einfluß auf die Inkubationszeit. So traten z.B. bei dem Isolat S 13/02 sehr kurze Inkubationszeiten und bei dem Isolat S 30/02 sehr lange Inkubationszeiten in allen Mauslinien auf. Eine Ursache dafür könnte in der Erhitzung einiger Inokulate auf 70°C für 10 min zur Reduktion einer möglichen bakteriellen Kontamination begründet liegen: Die Inokulate S 3/02, S 5/02, S 13/02 und S 17/02 wurden nicht, die anderen vier klassischen Scrapieisolate wurden erhitzt. Da aber die Isolate S 32/02 und S 33/02 ebenfalls relativ kurze Inkubationszeiten hervorriefen, scheint dieser Effekt nur gering zu sein. Daneben hat die Erregerkonzentration im eingesetzten Inokulum einen Einfluß auf die Inkubationszeit: Die Scrapieisolate S 13/02 und S 30/02 stammen aus dem selben Ausbruch Güstrow, die Probe S 30/02 wurde wegen der fehlenden Erkennung im Prionics LIA Schnelltest anfangs als atypisch eingestuft. Wegen zu geringer Mengen an vorhandenem Gehirnmateriale konnte bei diesem Isolat außerdem nur ein 5 %iges Homogenat zur Inokulation verwendet werden. Möglich wäre aber auch, dass die Probe S 30/02 wegen zu geringer Konzentrationen an PrP^{Sc} in den Schnelltests nicht erkannt wurde. Eine damit assoziierte geringe Erregerkonzentration könnte auch die langen Inkubationszeiten erklären.

Der Streubreite der Inkubationszeiten ist bei der Erstpassege oft sehr groß. Erst durch nachfolgende Subpassagen verkürzt sich der Standardfehler der Inkubationszeiten auf unter 2 %. Der Standardfehler lag bei einem Teil der im Rahmen dieser Arbeit inokulierten Tgshp-Mäusen und RIII-Mäusen schon in der Erstpassege deutlich unter 10 % und war bei diesen beiden Mauslinien im Durchschnitt niedriger als in den VM95- und C57Bl6-Mäusen. Die Ursachen dafür können zum einen in der hohen Konzentration an PrP^{Sc} im Inokulum als auch an der Empfänglichkeit der verwendeten Mauslinie liegen. Bei dem Isolat S 3/02 betrug der Standardfehler der Inkubationszeiten in allen inokulierten Wildtypmauslinien 4 bis 5 %, was vermuten lässt, dass bei diesem Isolat die PrP^{Sc}-Konzentration im Inokulum sehr hoch war und dass es sich um kein Erregergemisch, sondern einen einzelnen Scrapiestamm handelt.

Die Übertragungsraten waren bei allen Isolaten in allen Mauslinien bis auf zwei Ausnahmen sehr hoch. Bei dem Isolat S 3/02, welches auch sehr kurze Inkubationszeiten in allen Mauslinien aufwies, trat in allen Mauslinien eine Übertragungsrate von 100 % auf, was auf eine sehr

hohe Erregerkonzentration im Inokulum hinweist. Bei dem Isolat S 30/02 kamen in allen Mauslinien nicht nur sehr lange Inkubationszeiten, sondern auch sehr geringe Übertragungsraten zwischen 30 und 60 % vor. Das BSE-Isolat zeigte in den Wildtypmauslinien sehr lange Inkubationszeiten, die Übertragungsraten waren in den VM95- und C57Bl6-Mäusen sehr gering. Die Ursache kann auch hier in der reduzierten Konzentration von PrP^{Sc} im Inokulat liegen.

In fast allen Mauslinien wurden Mäuse aufgrund klinischer Symptome euthanasiert, bei denen jedoch kein Nachweis von PrP^{Sc} gelang. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren beschrieben: Nach Übertragung des BSE-Erregers auf Mäuse traten in diesen zwar klinische Symptome auf und die Inkubationszeiten waren deutlich kürzer als bei den Kontrolltieren, aber bei mehr als 55 % der Tiere konnte kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Bei diesen Tieren wurde histologisch Nervenzelldegenerationen nachgewiesen, eine Vakuolisierung und Astrozytose trat jedoch nur bei den Mäusen mit positivem PrP^{Sc}-Nachweis auf. Wurden diese Tiere jedoch für weitere Subpassagen verwendet, kam es zum Auftreten PrP^{Sc}-positiver Mäuse und zu einer weiteren Verkürzung der Inkubationszeiten (LASMEZAS et al. 1997). Die Autoren postulieren, dass dieses Charakteristikum einerseits durch die Nachweisgrenze für PrP^{Sc} in den verwendeten Methoden begründet sein kann, andererseits weist die Trennung von PrP^{Sc} und Infektiosität darauf hin, dass neben PrP^{Sc} auch noch andere Faktoren bei der Übertragung der TSEn eine Rolle spielen könnten. Neben der Nachweisgrenze für PrP^{Sc} kann dieser Unterschied auch durch die Existenz von PK-sensitivem PrP^{Sc} (SAFAR et al. 1998, PASTRANA et al. 2006) oder durch das Vorkommen mehrerer Scrapiestämme in einem Scrapieisolat erklärt werden.

Im Gegensatz dazu gab es auch Mäuse, die trotz fehlender Klinik später im Western Blot oder in der Immunhistologie positiv auf PrP^{Sc} getestet wurden. Im Western Blot wird eine relativ große Menge an Gehirnhomogenat eingesetzt, bei den klassischen Scrapieisolaten waren es 1,25 mg und bei den atypischen Scrapieisolaten durch die Anreicherung in der PTA-Fällung sogar 50 mg. In der Immunhistologie, die im Allgemeinen als sensitiver gegenüber dem Western Blot gilt, kann dagegen eine einzelne PrP^{Sc}-positive Zelle dargestellt werden. Bei geringen PrP^{Sc}-Konzentrationen im Gehirn muss es noch nicht zum Auftreten von klinischen Symptomen kommen. Wird die Maus in diesem Stadium der Erkrankung euthanasiert, kann trotzdem durch die Anreicherung der Gewebeproben im Western Blot oder die Darstellung einzelner PrP^{Sc}-positiver Zellen in der Immunhistologie der PrP^{Sc}-Nachweis gelingen.

BSE-Isolate führen charakteristischerweise schneller in RIII- als in C57Bl6-Mäusen zur

Erkrankung. Beträgt dabei die Differenz der mittleren Inkubationszeiten von RIII- zu C57Bl6-Mäusen zwischen 77 und 140 Tagen bei Erstinfektion, so gilt dies als charakteristisch für den BSE-Erreger (FRASER et al. 1992, BRUCE et al. 1994), was sich anhand des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten BSE-Isolates bestätigen ließ. Die Isolate S 3/02 und S 17/02 reagierten ebenfalls wie das BSE-Isolat sinc -homolog, d.h. die beiden sinc^{s7s7}-Mauslinien RIII und C57Bl6 zeigten kürzere Inkubationszeiten als die sinc^{p7p7}-Mauslinie VM95. Der Abstand der Inkubationszeiten von RIII- zu C57Bl6-Mäusen war jedoch wesentlich geringer als bei dem BSE-Isolat. Das Isolat S 30/02 ließ sich diesem Schema nicht zuordnen, da die Inkubationszeit der VM95-Mäuse zwischen den Inkubationszeiten der RIII- und der C57Bl6-Mäuse lag.

5.1.2.2 Proteinbiochemische Charakterisierung

Molekularmasse Die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande war bei allen mit klassischen Scrapieisolaten infizierten RIII- und Tgshp-Mäusen höher als bei den mit BSE inokulierten Mäusen. Zusammenfassend war durch die Molekularmasse in beiden Mauslinien eine eindeutige Abgrenzung zum BSE-Erreger möglich. Die Ergebnisse aus dem FLI-Test für die Molekularmasse der klassischen Scrapieisolate konnten im Mausbioassay bestätigt werden.

Glykosylierungsverhältnis Bei den mit BSE inokulierten RIII-Mäusen war der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande deutlich höher als bei allen mit klassischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-Mäusen. Auch das Isolat S 32/02, welches im FLI-Test durch einen hohen Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande aufgefallen war, konnte in den RIII-Mäusen deutlich vom BSE-Erreger abgegrenzt werden.

Bei den Tgshp-Mäusen war die Unterscheidung anhand der Glykosylierungsverhältnisses nicht eindeutig möglich, da nicht nur die beiden BSE-Isolate, sondern auch drei der Scrapieisolate einen Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande von über 50 % aufwiesen. Auch wenn die beiden BSE-Isolate geringfügig höhere Werte aufwiesen, reichen diese nicht für eine eindeutige Unterscheidung aus.

Antikörperbindungsverhältnis In den RIII-Mäusen war durch die Verwendung verschiedener Antikörper die Differenzierung zwischen BSE und Scrapie möglich: Die Antikörper SAF32 und 3B5, die im Bereich der PK-Schnittstelle binden, detektierten alle klassischen Scrapieisolate, nicht jedoch die mit dem BSE-Erreger inokulierten Mäuse. Der Antikörper Ra10, der im Kernbereich des Prionprotein bindet, welcher nach PK-Verdau erhalten bleibt, erkannte dagegen sowohl die BSE-Probe als auch die Scrapieisolate.

Auch bei den Tgshp-Mäusen war die Unterscheidung zwischen BSE und Scrapie mit Hilfe des Antikörperbindungsverhältnisses möglich und bestätigte die im FLI-Test am Schafmaterial ermittelten Ergebnisse. Auffällig ist lediglich das Isolat S 5/02: Während das Antikörperbindungsverhältnis am Schafmaterial mit 0,4 mit dem Ergebnis bei den Tgshp-Mäusen mit 0,3 übereinstimmt, steht dieses Ergebnis im Gegensatz zur deutlichen Detektion des Isolates in den RIII-Mäusen mit den MAKs SAF32 und 3B5.

Langzeit-ProteinaseK-Verdau Beim Langzeit-ProteinaseK-Verdau in den Proben der RIII-Mäuse war anhand der deutlichen Reduktion der Signalintensität bei der BSE-Probe im Kontrast zu den Proben der sieben klassischen Scrapieisolate die Differenzierung vom BSE- zum Scrapieerreger eindeutig möglich. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Übertragungsversuche klassischer Scrapieisolate überein (JUNGHANS 2004).

In den Proben der Tgshp-Mäuse zeigten die BSE-Isolate und das Isolat oviner BSE dagegen keine deutliche Reduktion der Signalstärke. Weiterhin war auch bei den Proben der klassischen Scrapieisolate kein einheitliches Verhalten nachweisbar: Während einige Isolate eine deutliche Reduktion der Signalstärke aufwiesen, war die Signalstärke bei anderen Isolaten weniger stark reduziert, auch wenn sie aus demselben Ausbruch stammten. Somit scheint anhand des Langzeit-PK-Verdau bei den Tgshp-Mäusen ähnlich wie bei den VM95-Mäusen (JUNGHANS 2004) keine Unterscheidung zwischen BSE und Scrapie möglich zu sein. Wodurch die hohe Stabilität des PrP^{Sc} von BSE in den Gehirnen der Tgshp-Mäuse und andererseits die niedrige Stabilität in den Gehirnen der RIII-Mäuse begründet liegt, ist nicht bekannt, Ursachen könnten jedoch in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Mauslinien liegen.

5.1.2.3 Histologische Charakterisierung

Als charakteristisch für BSE gilt das Läsionsprofil der Erstpassage in RIII-Mäusen, wobei die Maxima der Vakuolisierung in der Medulla, im Hypothalamus und im Septum zu finden sind. GREEN et al. (2005) konnten dies anhand von 150 Erstpassagen in RIII-Mäusen bestätigen. Das BSE-Läsionsprofil in VM95-Mäusen ist dagegen nicht so charakteristisch wie bei der Erstpassage in RIII-Mäusen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten acht klassischen Scrapieisolaten zeigten die zwei Isolate S 3/02 und S 5/02 bei den RIII-Mäusen die gleichen Maxima wie BSE in Medulla, Hypothalamus und Septum. Aufgrund der Cluster-Analyse ergab sich weiterhin eine Ähnlichkeit zu BSE bei der S 29/02 in den RIII-Mäusen und den Isolaten S 5/02, S 17/02, S 29/02, S 32/02 und S 33/02 in den VM95-Mäusen. Anhand der Läsionsprofile der Tgshp-

Mäuse und der vergleichenden Clusteranalyse aller Mauslinien ließen sich jedoch alle untersuchten Scrapieisolate von BSE abgrenzen. Die Erstellung von Läsionsprofilen in den Tgshp-Mäusen wurde im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert, somit standen im Gegensatz zur den Läsionsprofilen in den RIII- und VM95-Mäusen keine Vergleichsdaten zur Verfügung. Die Läsionsprofile weiterer Scrapieisolate nach Inokulation in Tgshp-Mäuse sind notwendig, um die Aussagefähigkeit dieser Methode zu beurteilen.

Die Ähnlichkeit der Isolate S 13/02 und S 30/02 und der Isolate S 17/02 und S 29/02 nach Inokulation in VM95-Mäuse könnte durch das Vorhandensein von zwei Scrapiestämmen innerhalb eines Ausbruchs erklärt werden. Die Ähnlichkeit der Läsionsprofile der beiden Isolate S 32/02 und S 33/02 in den VM95-Mäusen ist in der Clusteranalyse offensichtlich, obwohl beide Isolate aus verschiedenen Ausbrüchen stammen, zwischen denen kein geographischer oder epidemiologischer Zusammenhang nachweisbar ist.

Das Isolat S 13/02 zeigte sehr kurze Inkubationszeiten in allen drei Mauslinien, was auf einen hohen Erregertiter im Inokulum schließen lässt. Dieser hohe Titer führte neben einer kurzen Inkubationszeit zu einer starken PrP^{Sc}-Ablagerung und damit zu einer hochgradigen Vakuolisierung. Die Maxima der Vakuolisierung waren bei dem Isolat S 13/02 in den einzelnen Mauslinien oft denen der anderen Isolate aus dem Ausbruch Güstrow ähnlich, unterschieden sich aber deutlich in der Stärke des Vakuolisierungsgrades, obwohl alle betroffenen Tiere denselben Genotyp ARQ/ARQ trugen und daher grundsätzlich gleich empfänglich für eine Scrapieinfektion waren.

Eine Zuordnung der einzelnen Isolate anhand ihrer Ähnlichkeit zu den drei verschiedenen Ausbrüchen ist nach der vergleichenden Clusteranalyse nicht möglich. Die Ursachen dafür können entweder durch die große Variation der Läsionsprofile, die während einer Erstpassage noch möglich ist oder durch die Koexistenz mehrerer Scrapie-Stämme in den verschiedenen Ausbrüchen begründet sein. Ähnlich wie bei dem Isolat S 13/02 ist zum Teil anhand der Verlaufslinie des Läsionsprofils eine Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Isolaten nachweisbar. Wenn diese Verlaufslinie jedoch durch eine generell höhere Vakuolisierung in einem Isolat um einen oder mehrere Vakuolisierungsgrade „angehoben“ wird, kann diese Ähnlichkeit anhand der Clusteranalyse nicht mehr nachvollzogen werden.

Vergleich der Läsionsprofile eines Isolates in den verschiedenen Mauslinien Die Vakuolisierungen in den RIII- und VM95-Mäusen war bei fast allen Isolaten im Durchschnitt stärker als die bei den Tgshp-Mäusen. Nur nach Inokulation mit den Isolaten S 17/02, S 29/02, S 32/02 und BSE waren alle drei Mauslinien ähnlich stark vakuolisiert. Insgesamt wichen die

Läsionsprofile eines Scrapieisolates in den drei verwendeten Mauslinien RIII, VM95 und Tgshp bis auf wenige Ausnahmen voneinander ab. Bei den Inokulaten S 29/02 und S 32/02 war der Thalamus in allen drei Mauslinien auffallend stark vakuolisiert. Thalamus, Hippocampus und Septum der mit S 33/02 inokulierten RIII- und VM95-Mäuse zeigten einen ähnlichen Vakuolisierungsgrad. Auch das Läsionsprofil von BSE unterscheidet sich in Abhängigkeit von der verwendeten Mauslinie (BRUCE et al. 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war das Läsionsprofil der mit BSE inokulierten RIII- und Tgshp-Mäuse mit den Maxima in den Regionen Medulla oblongata, Hypothalamus und Septum jedoch relativ ähnlich. Der Genotyp einer Mauslinie beeinflusst neben der Inkubationszeit und dem Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung auch den Grad der Vakuolisierung. Den verwendeten Mauslinien liegen drei verschiedene Genotypen zugrunde: RIII-Mäuse tragen den s⁷s⁷-Genotyp des Mausprionproteins, VM95-Mäuse den p⁷p⁷-Genotyp des Mausprionproteins und Tgshp-Mäuse das Gen für das Schafprionprotein. Ob neben dem Prionproteingen andere genetische Loci einen Einfluß auf die Ausprägung der pathologischen Veränderungen haben, wie es für die Inkubationszeit bei Mäusen beschrieben wurde (MANOLAKOU et al. 2001), ist bisher nicht geklärt.

PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster, Gliose und Plaques Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster ist sowohl vom verwendeten TSE-Stamm als auch vom Genotyp der verwendeten Mauslinie abhängig. Im Rahmen dieser Dissertation wurde es für alle Isolate beschrieben, nicht aber wie bei der Bewertung der Vakuolisierung in bestimmten Regionen anhand bestimmter Grade einteilt, so dass anhand des PrP^{Sc}-Ablagerungsmusters keine Stammdifferenzierung durchgeführt wurde. In Abhängigkeit von den verwendeten Mauslinien gab es allerdings grundsätzliche Unterschiede in der Art der PrP^{Sc}-Ablagerung. Das PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster bei den RIII-Mäusen trat bei den klassischen Scrapieisolaten überwiegend granulär in Erscheinung, dabei waren vor allem das Zwischenhirn und das Septum betroffen. Plaques traten einerseits als klassische Plaques im Corpus callosum auf, wobei sie nur bei etwa der Hälfte der Isolate nicht nur in der Immunhistologie, sondern auch in der H.E.-Färbung darstellbar waren. Bei drei Isolaten kamen vereinzelt Nester aus multizentrischen Plaques und Vakuolen im Corpus callosum vor. Bei den VM95-Mäusen war das Ablagerungsmuster grundsätzlich zwar auch granulär, je stärker die PrP^{Sc}-Ablagerung jedoch war, umso mehr trat die Ablagerung in Form zahlreicher, granulär erscheinender Plaques, die weit verteilt im Cortex von Mittelhirn bis Endhirn und auf der Ebene des Zwischenhirns vorkamen, auf. Daneben kamen bei allen Isolaten zahlreiche einfache Plaques in der Granularzellschicht und in der Molekularschicht des Hippocampus, vereinzelt aber auch im Colliculus superior, Thalamus, Nucleus ruber und Nucleus caudatus vor. Klassische Plaques, die sowohl in der H.E.-Färbung als auch in der Immunhistologie

darstellbar waren, traten im Corpus callosum auf. Bei den Tgshp-Mäusen, die mit den klassischen Scrapieisolaten inokuliert worden waren, erschien die PrP^{Sc}-Ablagerung eher zellassoziiert und betraf vor allem die Zellen der Medulla oblongata, der Nuclei vestibulares und der Kleinhirnerne auf Ebene D sowie die Zellen des Nucleus ruber auf Ebene C. Granulär war dagegen das Septum sowie weitverteilt die Ebene C angefärbt. Auffällig war das Vorkommen zahlreicher klassischer Plaques im Corpus callosum, bei einzelnen Mäusen reihten sich bis zu 12 Plaques aneinander. In den RIII- und VM95-Mäusen traten bei den mit BSE infizierten Mäusen relativ wenig Plaques auf, doch in den Tgshp-Mäusen kamen zahlreiche Plaques auch bei dem BSE-Isolat vor. Ein Grund für das Vorkommen zahlreicher Plaques könnte in der Vorbehandlung der histologischen Proben mit Ameisensäure liegen (BROWN et al. 2003, GREEN et al. 2005). Ein Kennzeichen des BSE-Erregers soll nach GREEN et al. (2005) ein geringes Vorkommen von Plaques in RIII-Mäusen sein. Floride Plaques wurden in keiner der Mauslinien beobachtet, die mit BSE bzw. den klassischen deutschen Scrapieisolaten inokuliert worden waren.

Die Gliose, die anhand der GFAP-Färbung dargestellt wurde und die als stete Begleiterscheinung einer TSE-Erkrankung gilt, trat bei allen Mäusen, bei denen PrP^{Sc} nachgewiesen wurde, auf und korrelierte mit der PrP^{Sc}-Ablagerung.

5.1.3 Ausbrüche klassischer Scrapie

5.1.3.1 Ausbruch Borken, Nordrhein Westfalen

Zu diesem Ausbruch gehörten acht Suffolkschafe mit klassischer Scrapie, alle trugen den Genotyp ARQ/ARQ. Drei Isolate, S 3/02, S 5/02 und S 7/02 wurden im FLI-Test untersucht und bis auf das niedrige Antikörperbindungsverhältnis von 0,4 bei dem Isolat S 5/02 gab es keine Abweichungen von der Scrapie-Kontrolle. Auch drei weitere Isolate aus diesem Ausbruch, S 4/02, S 6/02 und S 9/02 zeigten ein für Scrapie typisches Antikörperbindungsverhältnis von mehr als 1,2. Die Isolate S 3/02 und S 5/02 wurden in Mäuse inokuliert. In den RIII-Mäusen konnten beide Isolate biochemisch vom BSE-Erreger abgegrenzt werden. In den mit dem Isolat S 5/02 inokulierten Tgshp-Mäusen betrug der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande 53 %, war aber geringer als bei dem BSE-Isolat. Die Molekularmasse der unglykosylierten Bande lag deutlich höher als das des BSE-Isolates. Der Langzeit-Proteinase K-Verdau konnte in den Tgshp-Mäusen nicht zur Differenzierung zwischen BSE und Scrapie genutzt werden. Auffällig war das Antikörperbindungsverhalten bei dem Isolat S 5/02: Während es am Schafmaterial sehr niedrig war, wurde in den RIII-Mäusen das PrP^{Sc} sowohl vom MAK SAF32 als auch vom 3B5 erkannt, in den Tgshp-Mäusen lag es dagegen mit 0,3 wieder

nur geringfügig höher als bei den Isolaten von BSE und oviner BSE. In diesem Ausbruch scheint es sich daher um ein Gemisch verschiedener TSE-Stämme zu handeln, von denen einer eine ähnliche PK-Sensitivität oder PK-Schnittstelle wie der BSE-Erreger besitzt, wobei dieser Stamm nur in den Tgshp-Mäusen, nicht aber in den RIII-Mäusen selektiert wird. Interessanterweise hat dieser Stamm keine veränderte Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande, wie es bei einer unterschiedlichen PK-Schnittstelle zu erwarten wäre. Da das Isolat S 3/02 nicht in Tgshp-Mäuse inokuliert worden war, konnte das Antikörperbindungsverhältnis in den Tgshp-Mäusen mit einem zweiten Isolat aus diesem Ausbruch nicht überprüft werden. Histologisch traten bei den RIII-Mäusen in einigen Regionen Ähnlichkeiten zum Läsionsprofil des BSE-Erregers auf, anhand der Clusteranalyse sowie der Läsionsprofile der VM95- und Tgshp-Mäuse war jedoch eine Abgrenzung zum BSE-Erreger möglich. Zusammenfassend konnten die Scrapieisolate des Ausbruches in Borken als klassische Scrapie eingestuft werden, auch wenn zur abschließenden Beurteilung der Probe S 5/02 eine Subpassage in VM95-Mäusen notwendig ist.

5.1.3.2 Ausbruch Güstrow, Mecklenburg Vorpommern

Bei dem Ausbruch in Güstrow in Mecklenburg Vorpommern waren 16 Suffolkschafe einer Herde betroffen. Alle Tiere trugen den Genotyp ARQ/ARQ. Sechs dieser Scrapieisolate, darunter die Isolate S 17/02 und S 30/02, wurden anfangs wegen negativer Ergebnisse im Prionics – Schnelltest als atypische Scrapieisolate eingestuft. Durch den FLI-Test und die Inokulation in Mäuse konnte für diese Isolate nachgewiesen werden, dass sie das für klassische Scrapie typische PrP^{Sc}-Bandenmuster im Western Blot aufwiesen und den negativen Schnelltestergebnissen wahrscheinlich ein geringer PrP^{Sc}-Gehalt im Obex zugrunde lag. Als Folge dieser Korrektur bei der Klassifizierung ist festzustellen, dass bisher in Deutschland kein Ausbruch von Scrapie nachgewiesen wurde, bei dem sowohl klassische als auch atypische Scrapieisolate innerhalb derselben Herde vorkamen. Solche gemischten Infektionen wurden dagegen im Vereinigten Königreich beschrieben (Martin Groschup, pers. Mitteilung, Insel Riems, 19.11.2006). Dabei war jedoch die Zuordnung der betroffenen Tiere zu einer Ursprungsherde nicht immer eindeutig feststellbar. Daher sollten solche Mischinfektionen durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden. Grundsätzlich kann das gleichzeitige Vorkommen in einer Herde durchaus möglich sein. Sechs Isolate aus diesem Ausbruch wurden im FLI-Test untersucht (S 12/02, S 17/02, S 21/02, S 23/02, S 29/02, S 33/02) und fünf Isolate in Mäuse inokuliert (S 13/02, S 17/02, S 29/02, S 30/02, S 33/02). Sowohl im Schaf- als auch im Mausmaterial war für alle Isolate eine Abgrenzung zum BSE-Erreger möglich.

5.1.3.3 Ausbruch Hochsauerlandkreis, Nordrhein Westfalen

Bei dem Fall S 32/02 handelt es sich um ein Suffolkschaf mit dem Genotyp ARQ/ARQ, bei dem als einziges Tier aus der betroffenen Herde Scrapie nachgewiesen werden konnte. Im FLI-Test lag der Anteil der diglykosylierten PrP^{Sc}-Bande bei 50 %, da die Molekularmasse und das Antikörperbindungsverhältnis im Bereich der klassischen Scrapie-Kontrolle lagen, wurde das Isolat als klassische Scrapie eingestuft. Dieses Ergebnis konnte anhand der biochemischen Untersuchungen in den RIII- und Tgshp-Mäusen und anhand der zu BSE verschiedenen Maxima der Läsionsprofile in allen drei Mauslinien bestätigt werden. Auffällig war lediglich, dass die Glykosylierungsverhältnisse in den Tgshp-Mäusen mit 52 % denen am Schafmaterial ähnlicher waren als den Glykosylierungsverhältnissen in den RIII-Mäusen mit 41 %.

5.2 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate

Über die Natur des Erregers der atypischen Scrapie ist noch wenig bekannt. Deshalb wurden am Schafmaterial proteinbiochemische Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Erregers durchgeführt. Diese sollten gleichzeitig eine Abgrenzung der atypischen Scrapie vom BSE-Erreger ermöglichen. Um Aufschluss über die infektiösen Eigenschaften des Erregers zu geben, erfolgten Inokulationen in verschiedene Mauslinien.

5.2.1 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Schafmaterial

PrP^{Sc}-Bandenmuster und Molekularmasse Wie alle anderen bisher publizierten atypischen Scrapie-Fälle (BENESTAD et al. 2003, BUSCHMANN et al. 2004a, DE BOSSCHERE et al. 2004b, GAVIER-WIDEN et al. 2004, ONNASCH et al. 2004, ORGE et al. 2004, EPSTEIN et al. 2005, DE BOSSCHERE et al. 2005, EVEREST et al. 2006) zeigten auch die vier deutschen Feldisolate S 18/02, S 39/02, S 14/03 und S 40/04 im Western Blot neben den drei PrP^{Sc}-Banden der klassischen Scrapie eine zusätzliche PrP^{Sc}-Bande bei etwa 11 kDa. Bei einem Isolat, S 40/04, war außerdem eine weitere PrP^{Sc}-Bande bei etwa 28 kDa zu detektieren. Im Gegensatz zu den klassischen Scrapieisolaten stellt jedoch nicht die diglykosylierte Bande prozentual den größten Anteil am Gesamtsignal im Western Blot dar, sondern die Banden III und IV. Auch die Molekularmasse der Banden I bis III der atypischen Scrapieisolate unterscheidet sich von der Molekularmasse der drei PrP^{Sc}-Banden der klassischen Scrapieisolate. Die atypische Scrapie stellt damit im Gegensatz zur klassischen Scrapie einen neuen Erreger dar, wobei das Bandenmuster der atypischen Scrapieisolate innerhalb der europäischen Schafpopulation einheitlich zu sein scheint.

Epitopbestimmung mittels verschiedener PrP-Antikörper Das Prionprotein ist ein zelluläres Protein, von dem posttranslational N-terminal ein 23 Aminosäuren großes Signalpeptid abgespalten wird und an Position 180 und 196 (Maus-Prion-Protein) N-verknüpfte Oligosaccharide angefügt werden, so dass es als unglykosylierte, einfach oder zweifach glykosylierte Form auftreten kann. Nach Proteinase K-Verdau wird N-terminal je nach stammspezifischer PK-Schnittstelle ein 60 bis 70 Aminosäuren langes Fragment abgespalten. Die PK-Schnittstelle liegt bei Scrapie zwischen Aminosäure 81 bis 89 und für BSE zwischen 96 und 97. Mittels verschiedener Antikörper, deren Epitope über das gesamte Prionprotein verteilt sind, wurden ein klassisches und zwei atypische Scrapieisolate und ein BSE-Isolat untersucht. Antikörper, die N-terminal binden, wurden der Gruppe 1 zugeordnet. Vor PK-Verdau erkannten sie alle vier untersuchten Isolate, nach PK-Verdau jedoch nicht mehr, da dieser N-terminale Bereich durch PK-Verdau abgespalten wird. Die Bande IV der atypischen Scrapieisolate wurde jedoch auch vor dem PK-Verdau von diesen Antikörpern nur schwach detektiert. Die Antikörper der Gruppe II und III enthalten Antikörper, die im Bereich der PK-Schnittstelle binden. Auffällig ist dabei der MAK 3B5 der Gruppe II, der bisher zur Differenzierung zwischen BSE und Scrapie verwendet wurde: Er erkennt vor PK-Verdau alle Isolate, nach PK-Verdau jedoch nicht mehr die atypischen Scrapieisolate und das BSE-Isolat. Im Gegensatz dazu erkennen die Antikörper der Gruppe III nach PK-Verdau die atypischen und die klassischen Scrapieisolate, nicht mehr jedoch das BSE-Isolat. Mit diesen Antikörpern ist also eine Unterscheidung zwischen BSE und atypischer Scrapie möglich. Die PK-Schnittstelle bei atypischer Scrapie scheint zwischen der von BSE und klassischer Scrapie zu liegen, da die atypische Scrapie zwar von allen Antikörpern der Gruppe III, nicht aber vom MAK 3B5 erkannt wird. Die Antikörper der Gruppe IV detektieren vor und nach PK-Verdau alle Isolate, inklusive der Bande IV bei den atypischen Scrapieisolaten. Dieser Teil des PrP scheint also auch bei den atypischen Scrapieisolaten das PK-resistente Kernstück darzustellen. Unterschiede sind bei den Antikörpern der Gruppe V zu erkennen: Während der C-terminale Anteil des PrP bei BSE und klassischer Scrapie ebenfalls zum PK-resistenten Teil des PrP gehört, ist dieses Epitop bei der Bande IV der atypischen Scrapieisolate schon vor PK-Verdau und bei den Banden I bis III nach PK-Verdau nicht mehr zu detektieren. Ein C-terminaler Verdau durch Proteinase K wurde für alle anderen untersuchten PrP^{Sc}-Formen bisher jedoch noch nicht postuliert. Die Banden I bis III der atypischen Scrapie weisen vor PK-Verdau dieselbe Molekularmasse auf wie das PrP^{Sc} der klassischen Scrapie. Sie werden N-terminal nach PK-Verdau jedoch ein Stück weiter verdaut als die bei der klassischen Scrapie, jedoch nicht so weit wie BSE. C-terminal scheint entweder ebenfalls ein Verdau stattzu-

finden oder die Epitope sind durch Konformationsänderungen nicht mehr zugänglich. Die Bande IV wird von den Antikörpern der Gruppe I und II auch vor PK-Verdau nur schwach oder gar nicht erkannt, so dass dieses Epitop auch schon bei unverdaulichem PrP fehlen könnte. C-terminal scheint die Bande IV auch ohne PK-Verdau kürzer zu sein als das PrP der klassischen Scrapie (Abb. 5.1).

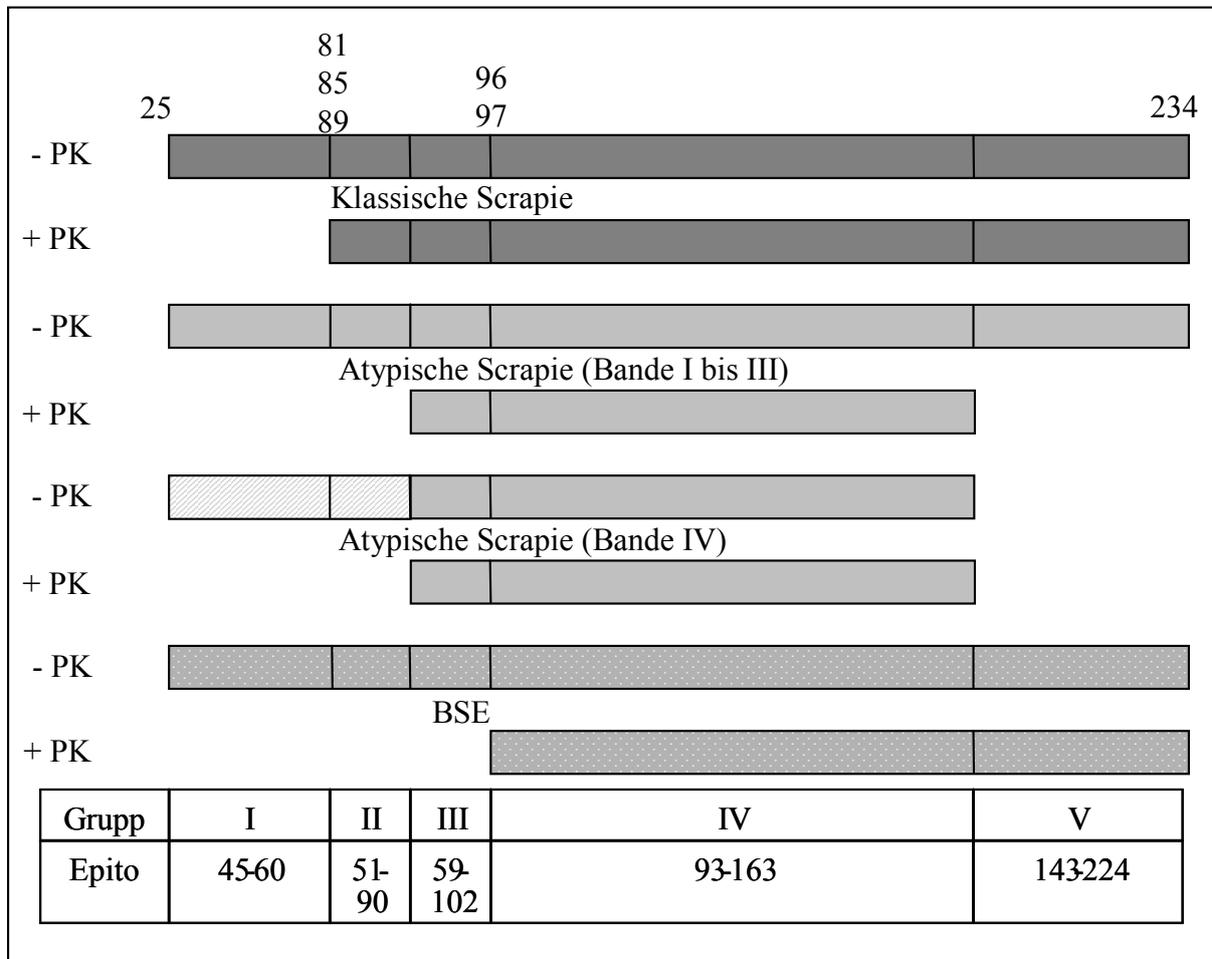


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Epitope bei klassischer Scrapie, atypischer Scrapie (getrennte Darstellung der drei PrP^{Sc}-Banden I bis III und der PrP^{Sc}-Bande IV) und einem BSE-Isolat vor und nach Proteinase-K-Verdau nach Detektion mit verschiedenen Antikörpern, welche alle Bereiche des PrP abdecken und je nach angegebenem Epitop einer der fünf Antikörpergruppen zugeordnet wurden (PK-Schnittstellen nach HAYASHI et al. 2005).

Differenzen zu anderen Publikationen (BENESTAD et al. 2003, ONNASCH et al. 2004, LEDUR et al. 2005), die die benutzten Antikörper betreffen, können durch Unterschiede in den verwendeten Methoden (Western Blot, Immunhistologie, PET-Blot), durch andere Aufreinigungsmethoden (PTA-Fällung) und durch den sehr starken PK-Verdau (1 h, 55°C, PK-Konzentration 50 µg/ml), welcher im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, bedingt sein.

Die Gruppen der verschiedenen Antikörper überlappen zum Teil in ihren Epitopen. Eine

Ursache dafür kann darin liegen, dass die zur Immunisierung verwendeten Peptide des Prionoproteins teilweise mehr als 20 Aminosäuren umfassen und daher die spezifischen Epitope der verschiedenen monoklonalen Antikörper nicht übereinstimmen müssen. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass zur Immunisierung von Mäusen oder Ratten PrP-Peptide aus verschiedenen Spezies verwendet werden. Die resultierende Sequenz des Immunogens muss dann nicht völlig mit der Sequenz des ovinen PrP übereinstimmen.

Antikörperbindungsverhältnis Bei den drei untersuchten atypischen Scrapieisolaten S 39/02, S 14/03 und S 40/04 lag das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 deutlich über 1,0 und war damit der klassischen Scrapie ähnlicher als dem BSE-Isolat, welches vom MAK P4 nach Proteinase K-Verdau nicht mehr detektiert wird. Dass die drei atypischen Scrapieisolate ein höheres Antikörperbindungsverhältnis als das klassische Scrapieisolat zeigten, wird durch ihre relativ niedrige Signalstärke im Western Blot begründet. Je geringer die Signalstärke bei einem Scrapieisolat ist, umso höher ist das Antikörperbindungsverhältnis, da der MAK P4 im unteren Messbereich des VersaDoc Imaging System Scrapie unproportional stärker erkennt als BSE.

Bei französischen atypischen Scrapieisolaten wurde dagegen eine verminderte Detektion mit Antikörpern, die im Bereich der Proteinase-K-Schnittstelle binden, berichtet (Olivier Andreoletti, pers. Mitteilung, Greifswald, 24.05.2005). Bei diesem Differenzierungstest wird der Proteinase-K-Verdau jedoch unter denaturierenden Bedingungen und erhöhten Proteinase-K-Konzentrationen durchgeführt, so dass es zu einer Verstärkung der Proteolyse kommt. Da die atypischen Scrapieisolate eine verminderte Resistenz gegenüber Proteinase K besitzen, erfolgt der Abbau des PrP^{Sc} dann auch über die bei herkömmlichem Proteinase K-Verdau (1 h, 55°C, 50 µg/ml Proteinase-K-Konzentration) entstehende Proteinase K-Schnittstelle hinaus.

Proteinase K-Stabilität Während die Unterscheidung zwischen BSE und Scrapie durch den Langzeit-Proteinase K-Verdau möglich ist, kann die Unterscheidung zwischen klassischer und atypischer Scrapie anhand der Resistenz gegenüber steigenden Konzentrationen an Proteinase K dargestellt werden (BUSCHMANN et al. 2004a). Auch für die zwei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten atypischen deutschen Scrapieisolate S 39/02 und S 40/04 konnte gegenüber einem klassischen Scrapieisolat, S 33/02, und einem BSE-Isolat, R 128/04, eine deutlich verminderte Resistenz gegenüber Proteinase K-Verdau gezeigt werden. Diese wird als eine der Ursachen für die fehlende Erkennung der atypischen Scrapieisolate in einigen Schnelltests diskutiert. Die Ursache für die verminderte Proteinase-K-Stabilität ist nicht eindeutig geklärt, sie könnte in Konformationsunterschieden zwischen klassischer und atypischer

Scrapie begründet sein.

Deglykosylierung Bei der Deglykosylierung konnten, je nachdem, ob das PrP^{Sc} mit Proteinase K verdaut wurde oder nicht, unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden. Bei unverdaulichem PrP^{Sc} war bei dem klassischen Scrapieisolat S 33/02 nach der Deglykosylierung eine Abnahme der di- und monoglykosylierten und eine Zunahme der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande sichtbar. Bei dem atypischen Scrapieisolat S 40/04 konnte ebenfalls eine Abnahme der Bande I und eine Zunahme der Bande II und III dargestellt werden. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich auch bei den atypischen Scrapieisolaten um verschieden glykosylierte Formen von PrP^{Sc} handelt. Während sich bei dem klassischen Scrapieisolat und bei einem ebenfalls untersuchten BSE-Isolat nach Proteinase K-Verdau und anschließender Deglykosylierung weiterhin eine Abnahme der di- und monoglykosylierten und eine Zunahme der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande nachweisen ließ, war bei den beiden atypischen Scrapieisolaten S 39/02 und S 40/04 vor und nach Deglykosylierung keine signifikante Veränderung der PrP^{Sc}-Banden im Western Blot darstellbar. Ein völliges Fehlen der Glykosylierungsstellen scheint dem Verhalten bei den unverdaulich atypischen Scrapieisolaten zu widersprechen. Denkbar wäre jedoch, dass die Glykosylierungsstelle nach Proteinase K-Verdau durch Konformationsunterschiede vor der Deglykosylierung geschützt ist oder dass der Teil des PrP, an dem sich die Glykosylierungsstellen befinden, nach Proteinase K-Verdau abgespalten wird und so keine Deglykosylierung mehr stattfinden kann. Unklar wäre dabei, wodurch die verschiedenen Banden des PrP^{Sc} der atypischen Scrapieisolate entstehen, da sie bei den klassischen Scrapieisolaten durch die verschiedenen Glykosylierungsformen (di-, mono und unglykosyliert) gebildet werden. Außerdem müsste nach Abspalten eines solchen Fragmentes eine Verschiebung aller Banden im Western Blot vorhanden sein. Da die atypischen Scrapieisolate vor Proteinase K-Verdau oft nicht deutlich voneinander abgrenzbare Banden zeigten, konnte ein Beweis dafür im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Zusammenfassung Die atypischen Scrapieisolate stellen sich biochemisch als neuartiger Scrapie-Erreger dar. Von der klassischen Scrapie lassen sie sich durch das veränderte Bandenmuster im Western Blot und durch die verringerte PK-Stabilität unterscheiden, was im Rahmen dieser Arbeit für einige deutsche atypische Scrapieisolate gezeigt werden konnte. Neben dem Bandenmuster scheint auch die Reaktion in den Schnelltests sowie die Akkumulation von PrP^{Sc} vor allem im Kleinhirn, weniger jedoch im Obex, ein grundsätzliches Merkmal aller atypischen Scrapieisolate zu sein. Die in den europäischen Staaten bisher beschriebenen atypischen Scrapieisolate scheinen in Bezug auf diese Eigenschaften einheitlich zu sein.

Bei der Deglykosylierung und der Detektion durch verschiedene Antikörper ergeben sich Unterschiede zum klassischen Scrapie-Erreger, welche durch die Morphologie oder Konformation des PrP der atypischen Scrapieisolate begründet sein können. Um die Morphologie und Konformation des PrP der atypischen Scrapieisolate umfassend zu beurteilen, sind allerdings weiterführende Untersuchungen notwendig.

Eine Abgrenzung zum BSE-Erreger war anhand der Antikörperbindung möglich.

Für die fehlende Erkennung der atypischen Scrapieisolate in einigen der kommerziell erhältlichen TSE-Schnellteste kann neben der bisher diskutierten verringerten Stabilität gegenüber Proteinase K und dem Vorkommen nur geringer PrP^{Sc}-Mengen im Obex auch die fehlende Detektion einiger Epitope mit verschiedenen Antikörpern eine Ursache darstellen.

5.2.2 Charakterisierung atypischer Scrapieisolate am Mausmaterial

5.2.2.1 Klinische Symptome, Übertragungsraten und Inkubationszeiten

Tgshp-Mäuse Die atypischen Scrapieisolate ließen sich auf Tgshp-Mäuse, welche das Schafprionprotein überexprimieren und somit zur Umgehung der Speziesbarriere beitragen, übertragen. Diese Übertragung ging jedoch, verglichen mit der Inokulation klassischer Scrapieisolate, mit verminderten Übertragungsraten und verlängerten Inkubationszeiten einher. Der Standardfehler der Inkubationszeiten war bei den mit atypischen Scrapieisolaten inokulierten Mauslinien größer als bei mit klassischen Scrapieisolaten inokulierten Mauslinien.

Bei einem Teil der inokulierten Tgshp-Mäuse waren nicht alle Mäuse, bei denen im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen wurde, auch in der Immunhistologie PrP^{Sc}-positiv. Im Allgemeinen gilt die Immunhistologie als sensitiver als der Western Blot, da dabei einzelne PrP^{Sc}-positive Zellen angefärbt werden können. Bei den atypischen Scrapieisolaten wurde im Western Blot durch die PTA-Fällung mit 50 mg eine sehr große Menge an Gehirnhomogenat analysiert. Das könnte ein Grund für die höhere Sensitivität des Western Blot im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen sein.

Bei den Tgshp-Mäusen war der prozentuale Anteil der aufgrund klinischer Symptome euthanasierten Tgshp-Mäuse größer als der Anteil PrP^{Sc}-positiver Mäuse. Gründe dafür können einerseits in der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden oder andererseits in zusätzlichen Faktoren, die in der Pathogenese der TSEn eine Rolle spielen, liegen (LASMEZAS et al. 1997). Dass sich die Inkubationszeit aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten Mäuse oft nur geringfügig von der Inkubationszeit aller PrP^{Sc}-positiven Mäuse unterscheidet, ist ein möglicher Hinweis dafür, dass auch die Mäuse mit klinischen Symptomen aber ohne

PrP^{Sc}-Nachweis aufgrund einer Infektion mit einem TSE-Erreger verendet sind. Auch die deutlich verkürzte mittlere Lebensdauer bei mit atypischen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-Mäusen bestätigt das Vorliegen eines infektiösen Geschehens. Dies soll weiterführend in Subpassagen gesichert werden.

Wildtypmauslinien Die atypischen Scrapieisolate ließen sich nicht auf Wildtypmauslinien übertragen. Auch bei französischen und norwegischen atypischen Scrapieisolaten gelang zwar die Übertragung auf transgene Mäuse, in den Wildtypmauslinien wurde jedoch keine Infektion beobachtet (LE DUR et al. 2005).

Im Western Blot und in der Immunhistologie gab es zwar vereinzelt Hinweise auf eine Übertragung, doch konnte diese nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Anhand der Ermittlung von Übertragungsraten und Inkubationszeiten aller aufgrund klinischer Symptome euthanasierten Mäuse sowie der mittleren Lebensdauer aller in einem Versuch verwendeten Mäuse ergaben sich weitere Hinweise für eine mögliche Übertragung der atypischen Scrapieisolate. Insbesondere die Inokulation der RIII-Mäuse war durch einen hohen Anteil von Tieren mit klinischen Symptomen und relativ kurze klinische Inkubationszeiten sowie mittleren Lebensdauern gekennzeichnet. Ob diese Parameter tatsächlich für ein infektiöses Geschehen sprechen, bleibt in Subpassagen abzuklären. Inwieweit klinische Symptome bzw. die dadurch ermittelten Bezugsgrößen eine Aussage über ein infektiöses Geschehen zulassen, ist nicht mit Sicherheit festzustellen. Klinische Symptome sind neben dem verwendeten Scrapieisolat von der verwendeten Mauslinie abhängig und können gering- bis hochgradig auftreten, aber auch fehlen.

5.2.2.2 Proteinbiochemische Charakterisierung

In den Tgshp-Mäusen konnte im Western Blot eine Übertragung der atypischen Scrapieisolate dargestellt werden. Elf deutsche atypische Scrapieisolate zeigten nach Inokulation in Tgshp-Mäuse im Western Blot das gleiche PrP^{Sc}-Bandenmuster wie das PrP^{Sc} der atypischen Scrapieisolate am Schafmaterial. Dies stimmt mit Übertragungsversuchen norwegischer und französischer atypischer Scrapie-Fälle auf transgene Mäuse, die das Schafprionprotein vom Genotyp VRQ/VRQ (LE DUR et al. 2005) bzw. vom Genotyp ARQ/ARQ (Anne Buschmann, pers. Mitteilung, Insel Riems, 27.02.2006) überexprimieren, überein. Aufgrund der benötigten großen Menge an Gehirnmateriale für die PTA-Fällung bei den atypischen Scrapieisolaten, welche in Tgshp-Mäuse inokuliert worden waren, konnten keine weiterführenden proteinbiochemischen Untersuchungen durchgeführt werden, da das restliche Material für Subpassagen benötigt wurde.

5.2.2.3 Histologische Charakterisierung

Die PrP^{Sc}-Ablagerungen, das Läsionsprofil und die auftretende Gliose aller inokulierten deutschen atypischen Scrapieisolate waren sehr einheitlich. Die Ähnlichkeit der Läsionsprofile ließ sich durch die Clusteranalyse bestätigen. Der maximale Abstand zwischen zwei Isolaten lag bei 1,6 und war somit deutlich geringer als z.B. bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten klassischen Scrapieisolaten. Die Gliose korrelierte in den meisten Gehirnregionen mit der PrP^{Sc}-Ablagerung, nur in der Granularschicht vom Kleinhirn war trotz fehlender PrP^{Sc}-Ablagerung eine mittel- bis hochgradige Gliose vorhanden.

Auch bei französischen und norwegischen atypischen Scrapieisolaten, welche in eine transgene Mauslinie (Tg338), die das ovine PrP^{VRQ} Allel überexprimiert, inokuliert worden waren, konnten PrP^{Sc}-Ablagerungen im Corpus callosum, in der lakunaren Molekularschicht des Hippocampus und im Thalamus nachgewiesen werden (LE DUR et al. 2005). Außerdem fanden sich weitere PrP^{Sc}-Ablagerungen im Cingulum, in der dorsalen Kommissur, im Striatum, im lateralen olfaktorischen Trakt, in einer Schicht des zerebralen Cortex und im Colliculus superior. In diesen Regionen war bei den mit deutschen atypischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen keine PrP^{Sc}-Ablagerung vorhanden, ebenso wenig im Hypothalamus, Mittelhirn und Hirnstamm. Ein deutlicher Unterschied fand sich dagegen im Kleinhirn: Während in den mit atypischen Scrapieisolaten infizierten Tg338-Mäusen keine PrP^{Sc}-Ablagerung im Kleinhirn zu verzeichnen war, trat sie bei den Tgshp-Mäusen prominent in Erscheinung. Auch die in den Tgshp-Mäusen beobachtete Auflockerung der Granularzellschicht des Kleinhirns wurde bei den Tg338-Mäusen nicht beobachtet.

Die Läsionsprofile der deutschen atypischen Scrapieisolate mit den Maxima in den Regionen Colliculus superior, Hippocampus und Cortex sind auch denen anderer atypischer europäischer Scrapieisolate ähnlich. Bei diesen Isolaten, welche in die transgene Mauslinie Tg338 inokuliert worden waren, waren ebenfalls nur die Regionen Colliculus superior, Hippocampus und zerebraler Cortex deutlich vakuolisiert (LE DUR et al. 2005).

Unterschiede finden sich dagegen in der Vakuolisierung der weißen Substanz, die bei den atypischen französischen und norwegischen Scrapieisolaten deutlich höher ausfällt. Gründe dafür könnten in der verwendeten Mauslinie liegen: Die Tg338-Mäuse tragen den Genotyp VRQ/VRQ, während die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tgshp-Mäuse den Genotyp ARQ/ARQ tragen. Da auch bei Schafen die Verteilung und Ausbreitung von PrP^{Sc} vom vorhandenen Genotyp abhängt, könnte dies auch bei transgenen Mäusen eine Rolle spielen und die Unterschiede in der PrP^{Sc}-Ablagerung im Kleinhirn und bei der Vakuolisierung der weißen Substanz erklären. Die Clusteranalyse der Läsionsprofile aller 12 Regionen der deutschen

atypischen Scrapie-Feldisolate in den Tgshp-Mäusen ist in Abb. 4.48 vergleichend zu den Läsionsprofilen der Erstinfektion und der Subpassage norwegischer und französischer atypischer Scrapieisolate in Tg338-Mäusen (LE DUR et al. 2005) dargestellt. Die Clusteranalyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der deutschen atypischen Scrapieisolate, aber einen deutlichen Abstand zu den anderen atypischen Scrapieisolaten. Klammert man aus der Clusteranalyse die Regionen der weißen Substanz aus, da die großen Unterschiede im Vakuolisierungsgrad der weißen Substanz wahrscheinlich in der Verwendung verschiedener transgener Mauslinien begründet sind, so zeigt sich die hohe Ähnlichkeit der deutschen, französischen und norwegischen atypischen Scrapieisolate.

Bei den Tgshp-Mäusen treten ab einem Alter von 300 bis 400 Tagen große, unregelmäßige Vakuolen in der weißen Substanz vom Kleinhirn sowie über alle Ebenen gleichmäßig verteilte, kleine kreisrunde Vakuolen auf. Vor allem letztere sind oft nur schwer von Scrapie-assoziierten Vakuolen zu unterscheiden. Diese Vakuolen treten bei Wildtypmäusen erst ab einem Alter von etwa zwei Jahren auf und werden dort als Altersvakuolen bezeichnet. Die Bestimmung des Vakuolisierungsgrades sollte deswegen immer erst nach eindeutigem PrP^{Sc}-Nachweis erfolgen. Bei gleichzeitigem Auftreten einer Scrapie-Infektion und somit von Scrapie-assoziierten Vakuolen und Altersvakuolen ist eine eindeutige Bestimmung des Vakuolisierungsgrades nicht immer möglich. Da nach Inokulation der atypischen Scrapieisolate die Inkubationszeiten der Tgshp-Mäuse durchschnittlich länger waren als bei den mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen, kam es auch vermehrt zum Auftreten von Altersvakuolen. Diese wurden in die Ermittlung des Läsionsgrades nicht mit einbezogen, da sie auch bei gleichalten uninfizierten Tgshp-Mäusen vorkommen. Dieses Merkmal der Tgshp-Mäuse könnte zu einer anderen Beurteilung der weißen Substanz des Kleinhirns beitragen und die Unterschiede der Vakuolisierung zwischen deutschen und französischen atypischen Scrapieisolaten in zwei verschiedenen transgener Mauslinien erklären.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten klassischen Scrapieisolaten, welche in Tgshp-Mäuse inokuliert wurden, war der Grad der PrP^{Sc}-Ablagerung und der Vakuolisierung bei den atypischen Scrapieisolaten deutlich geringer. Die klassischen Scrapieisolate zeigten nicht nur vielfältigere PrP^{Sc}-Ablagerungsformen, sondern diese waren auch weit über alle Ebenen verteilt, und es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten.

Anhand der Läsionsprofile konnten die atypischen Scrapieisolate vom BSE-Erreger abgegrenzt werden. Die Maxima der Vakuolisierung lagen bei diesem in den Regionen Medulla oblongata, Hypothalamus und Septum. In diesen Regionen war bei den atypischen deutschen

Scrapieisolaten in den Tgshp-Mäusen keine Vakuolisierung nachweisbar.

In der Immunhistologie konnte bei den mit deutschen atypischen Scrapieisolaten inokulierten RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Bei Einzeltieren traten jedoch histopathologisch Merkmale in Erscheinung, die für das Vorliegen einer TSE-Erkrankung stehen könnten. Bei keiner dieser Mäuse mit fraglichen histologischen Ergebnissen konnte jedoch eine Scrapieerkrankung im Western Blot bestätigt werden, so dass durch Subpassagen abzuklären bleibt, inwieweit diese Anzeichen tatsächlich für eine Scrapie-Erkrankung stehen.

5.3 Bewertung der zur Stammcharakterisierung verwendeten Methoden

5.3.1 Bewertung der proteinbiochemischen Methoden

Molekularmasse Die in der Literatur angegebenen Werte für die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande variieren von 17 bis 20 kDa. Einfluß auf die Molekularmasse haben unter anderem der verwendete Marker, das Softwareprogramm, welches zur Bestimmung der Molekularmasse verwendet wird, der verwendete Antikörper, das Aufreinigungssystem für PrP^{Sc} oder die SDS-Konzentration im verwendeten SDS-PAGE-System und im Probenpuffer. Daher können nur Molekularmassen, die unter gleichen methodischen Bedingungen ermittelt wurden, miteinander verglichen werden. Da die Unterschiede in der Molekularmasse mit 0,5 bis 1 kDa zwischen BSE- und Scrapieisolaten relativ gering sind, ist es bei der Bestimmung der Molekularmasse sehr wichtig, immer unter standardisierten Bedingungen zu arbeiten, jeweils BSE- und Scrapieisolate als Kontrollen auf jedem Western Blot zu integrieren und durch eine wiederholte Durchführung der Versuche methodisch bedingte Abweichungen so gering wie möglich zu halten.

Antikörperbindungsverhältnis Die Immunoreaktivität, die dem Antikörperbindungsverhältnis zugrunde liegt, gilt als das stabilste und damit zuverlässigste der drei für den FLI-Test verwendeten biochemischen Charakteristika. Es muss bei der Durchführung allerdings darauf geachtet werden, dass mit dem Antikörper, der sowohl BSE als auch Scrapie detektiert, ähnliche Signalstärken im Western Blot erreicht werden, da das Auftragen einer zu großen Menge an PrP^{Sc} auf das SDS-Gel dazu führen kann, dass auch die BSE-Probe detektiert wird (BARON u. BIACABE 2001). In Verdünnungsreihen von BSE- und Scrapieisolaten mit den MAKs P4 und L42 im Bereich von 10000 bis 400000 counts des VersaDoc Imaging System konnte jedoch gezeigt werden, dass es dabei nicht zu einer solchen Verstärkung der Signale des BSE-Isolates kommt, welches zu einer Erhöhung des Antikörperbindungsverhältnisses von MAK P4/L42 über 0,1 führen könnte. Besitzt das Scrapieisolat jedoch eine sehr geringe

Signalstärke, so ist der für das Antikörperbindungsverhältnis ermittelte Wert relativ hoch, da der MAK P4 Scrapie stärker erkennt als BSE. Dies war bei den Scrapieisolaten S 23/02 und S 45/02 mit einem Antikörperbindungsverhältnis von 2,4 und 3,3 der Fall. Deswegen sollten alle Isolate, die zur Ermittlung des Antikörperbindungsverhältnisses herangezogen werden, im linearen Bereich des Detektionssystems gemessen werden.

Glykosylierungsverhältnis Die Bestimmung der Glykosylierungsverhältnisse stellt ein sehr sensibles Verfahren dar. Es wird nicht nur von der verwendeten Aufreinigungsmethode, sondern auch von Art und Konzentration des verwendeten Antikörpers und von der Signalstärke im Western Blot beeinflusst. Deswegen sollte die Glykosylierungsverhältnisse verschiedener Isolate nur verglichen werden, wenn sie unter gleichen Bedingungen ermittelt wurden und methodisch bedingte Abweichungen durch die Wiederholung der Versuche minimiert wurden. Die Abstufung der Scrapieisolate zu den BSE-Isolaten ist dabei oft nicht so eindeutig möglich wie z.B. bei der Antikörperbindung, sondern die Unterschiede sind eher graduell.

Proteinase K-Stabilität Die Proteinase K-Stabilität kann sowohl im Langzeit-PK-Verdau als auch durch Inkubation der Probe mit steigenden PK-Konzentrationen ermittelt werden. Der Langzeit-PK-Verdau ist jedoch sehr aufwändig und findet primär für die Differenzierung von BSE- und Scrapieisolaten in Mäusen Verwendung. In RIII- und C57Bl6-Mäusen erlaubt er eine eindeutige Abgrenzung des BSE-Erregers von Scrapieisolaten, in VM95- und Tgshp-Mäusen ist dagegen keine eindeutige Abgrenzung möglich. Durch den Einsatz höherer PK-Konzentrationen können klassische und atypische Scrapie auch direkt am Schafmaterial unterschieden werden.

5.3.2 Bewertung der histologischen Methoden

Läsionsprofile Der Ermittlung der für das Läsionsprofil notwendigen Vakuolisierungsgrade erfolgt semiquantitativ. Fehler können bei diesem Verfahren entstehen, wenn die Region nicht sicher in der korrekten Ebene geschnitten wird. Auch die Subjektivität des Betrachters kann einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. FRASER und DICKINSON (1968) untersuchten diese Fehlerquellen: Wird ein Schnitt mehrfach untersucht, zeigten sich die größten Abweichungen vor allem bei Medulla (0,18 Punkte) und Kleinhirn (0,27 Punkte). Bei der Bewertung waren die größten Varianzen bei den Score-Punkten 1 (0,50 Punkte) und 2 (0,34 Punkte) festzustellen. Die verwendete Schnittebene hatte auf die Einordnung vor allem beim Kleinhirn Einfluß, etwas weniger stark war der Einfluß aber auch bei der Medulla oblongata und beim Mittelhirn festzustellen.

Während einer Erstpassege ist die Schwankungsbreite der Vakuolisierungsgrade bei den verschiedenen Tieren eines Isolates noch sehr groß und kein Läsionsprofil eines Einzeltieres stimmt mit dem durchschnittlichen Läsionsprofil aller Mäuse überein (GREEN et al. 2005). Deswegen sollten mindestens sechs Einzeltiere zur Ermittlung des Läsionsprofils genutzt werden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren es meist acht bis zwölf Tiere pro Isolat und Mauslinie. Als Beispiel seien die RIII-Mäuse, welche mit dem Isolat S 17/02 inokuliert worden waren, genannt: Während zehn der elf untersuchten Mäuse im Thalamus keine Vakuolisierung aufwiesen, trat bei einer Maus ein Vakuolisierungsgrad von fünf Punkten in dieser Region auf, als Mittelwert für alle Mäuse ergibt sich daraus ein Vakuolisierungsgrad von 0,5 Punkten in dieser Region. Während nachfolgender Subpassagen stabilisiert sich das Läsionsprofil (BRUCE 2003). Dabei spielt auch die Anzahl an vorhandenen Stämmen in einem Scrapieisolat eine Rolle: Handelt es sich um einen einzigen Stamm, so wird das Läsionsprofil von Erst- zu Subpassage kaum verändert sein, wie es von LE DUR et al. (2005) für atypische Scrapieisolate beschrieben wurde. Handelt es sich dagegen um ein Gemisch mehrerer Scrapie-Stämme in einem Isolat, so kann das Läsionsprofil der Subpassage gegenüber dem Läsionsprofil der Erstpassege deutlich verändert sein, da es zur Selektion einzelner Stämme kommt. Hinweise auf ein solches Erregergemisch gab es zum Beispiel bei den Isolaten des Ausbruchs Güstrow in Mecklenburg Vorpommern: Bei den mit dem Isolat S 13/02 inokulierten RIII-Mäusen betrug die Inkubationszeit bei zwölf von fünfzehn Mäusen zwischen 273 und 298 Tagen, bei drei Mäusen war sie mit 345 bis 357 Tagen deutlich länger. Diese drei Mäuse zeigten auch ein von den anderen Mäusen völlig verschiedenes Läsionsprofil. Ähnliches ist auch aus der Literatur bekannt: Trotz hoher Variabilität der Läsionsprofile nach Erstpassege verschiedener Scrapieisolate kam es nach mehreren Subpassagen zur Isolierung nur weniger definierter Scrapie-Stämme (BRUCE et al. 2002).

5.3.3 Vergleich der Stammcharakterisierung im Mausbioassay und im FLI-Test

Der FLI-Test erlaubte bei allen Scrapieisolaten anhand der biochemischen Charakteristika eine eindeutige Abgrenzung zum BSE-Erreger. Die Scrapieisolate, welche in allen drei Charakteristika mit der Scrapie-Kontrolle übereinstimmten, wurden nicht im Mausbioassay untersucht. Zwei Scrapieisolate, die in einem der drei Charakteristika von den anderen untersuchten Scrapieisolaten abwichen, wurden im Mausbioassay weitergehend untersucht.

Die Abgrenzung von Scrapieisolaten zum BSE-Erreger ist direkt am Schafmaterial möglich. Die in der EU zugelassenen Differenzierungstests nutzen dabei vor allem die Immunoreaktivität, beim FLI-Test werden zusätzlich die Molekularmasse und das Glykosylierungsverhält-

nis der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande mit herangezogen. Eine direkt am Schafmaterial durchgeführte Stammcharakterisierung ist in wesentlich kürzerer Zeit und in größeren Mengen durchführbar als der konventionelle Mausbioassay. Dieser erfordert eine große Anzahl an Versuchstieren und kann in Abhängigkeit von der verwendeten Mauslinie bis zu zwei Jahre dauern, ist also sehr zeit- und kostenintensiv. Zeigt jedoch ein Isolat im biochemischen Differenzierungstest Ähnlichkeiten zu BSE und kann das Isolat auch in den anderen verfügbaren Differenzierungstests nicht sicher vom BSE-Erreger abgegrenzt werden, so wird weiterhin ein Mausbioassay zur endgültigen Absicherung der Ergebnisse notwendig sein.

6 Zusammenfassung

Anja Gretzschel

Biochemische und histologische Unterscheidung von klassischen und atypischen Scrapie- und von BSE-Infektionen bei Schafen und deren Übertragung auf Mäuse

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig und

Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

Eingereicht im Mai 2007

144 Seiten, 122 Abbildungen, 29 Tabellen, 340 Literaturangaben, 48 Seiten Anhang

Schlüsselworte: Scrapie, BSE, Prion, PrP^C, PrP^{Sc}

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines differentialdiagnostischen Tests (FLI-Test), der die Abgrenzung einer BSE- von einer Scrapieinfektion durch die direkte Untersuchung des Hirnstammmaterials ermöglicht. Bei einem Teil der dabei untersuchten deutschen klassischen Scrapiefälle wurde diese Charakterisierung zusätzlich im bis dahin zur Differenzierung verwendeten klassischen Mausbioassay durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem FLI-Test zu verifizieren und um die vorhandenen Scrapieisolate weitergehend zu charakterisieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die biochemischen Eigenschaften atypischer deutscher Scrapieisolate analysiert und ihre Infektiosität anhand von Übertragungsversuchen auf drei Wildtypmauslinien und eine transgene Mauslinie beurteilt. Darüber hinaus wurden diese Isolate dem klassischen BSE-Isolat gegenüber gestellt.

Im FLI-Test wurden die Glykosylierungsverhältnisse, die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande und das Antikörperbindungsverhältnis vom MAK P4 zu MAK L42 direkt am Schafmaterial nach spezifischer Fällung des pathologischen Prionproteins mit Phosphorwolframsäure (PTA-Fällung), SDS-Gelelektrophorese und Auswertung im VersaDoc Imaging System ermittelt. Bei keinem der 36 untersuchten klassischen Scrapieisolate ergab sich einen Hinweis auf eine Infektion mit dem BSE-Erreger. Im Mausbioassay wurden nach Inokulation in RIII-, VM95- und Tgshp-Mäuse die Übertragungsraten und Inkubationszeiten, proteinbiochemisch die Glykosylierungsverhältnisse, die Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande, das Antikörperbindungsverhältnis und der Langzeit-Proteinase K-Verdau sowie histo-

logisch der Grad der Vakuolisierung in 12 Gehirnregionen zur Differenzierung zwischen BSE und Scrapie genutzt. Anhand acht deutscher klassischer Scrapieisolate, die im Mausbioassay untersucht wurden, konnten die Ergebnisse aus dem FLI-Test bestätigt werden. Durch diese Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Abgrenzung von Scrapieisolaten zum BSE-Erreger direkt am Schafmaterial möglich ist. Eine direkt am Schafmaterial durchgeführte Stammcharakterisierung ist in wesentlich kürzerer Zeit und in größeren Mengen durchführbar als der konventionelle Mausbioassay. Dieser erfordert eine große Anzahl an Versuchstieren und kann in Abhängigkeit von der verwendeten Mauslinie bis zu zwei Jahre dauern, ist also sehr zeit- und kostenintensiv. Zeigt jedoch ein Isolat im biochemischen Differenzierungstest Ähnlichkeiten zu BSE und kann das Isolat auch in den anderen verfügbaren Differenzierungstests nicht sicher vom BSE-Erreger abgegrenzt werden, so ist weiterhin ein Mausbioassay zur endgültigen Absicherung der Ergebnisse notwendig. Die vier untersuchten deutschen atypischen Scrapieisolate zeigten proteinbiochemisch abweichende Eigenschaften im Vergleich zur klassischen Scrapie. Im Western Blot konnte eine zusätzliche vierte PrP^{Sc}-Bande detektiert werden und die Proteinase K-Stabilität war deutlich geringer als bei der klassischen Scrapie. Auch bei Untersuchungen zur Deglykosylierung und Detektion verschiedener Epitope des Prionproteins traten Unterschiede gegenüber dem klassischen Scrapieerreger auf, denen wahrscheinlich Konformationsunterschiede des Prionproteins zugrunde liegen. Das Antikörperbindungsverhältnis von MAK P4 zu MAK L42 war bei klassischen und atypischen deutschen Scrapieisolaten jedoch gleich und erlaubte somit auch für die atypischen Scrapieisolate die Abgrenzung zum BSE-Erreger. Die Infektiosität der atypischen Scrapieisolate konnte im Mausbioassay unter Verwendung transgener Tgshp-Mäuse nachgewiesen werden. Diese Mäuse überexprimieren das ARQ-Allel des Schafprionproteins auf Mausprionprotein-ablatiertem Hintergrund und weisen eine erhöhte Sensitivität und eine reduzierte Speziesbarriere auf. Die Übertragung auf die Tgshp-Mäuse ging jedoch, verglichen mit der Inokulation klassischer Scrapieisolate, mit verminderten Übertragungsraten und verlängerten Inkubationszeiten einher. Die Inokulation der atypischen Scrapieisolate in die drei Inzuchtmausstämme führte dagegen nicht zur Übertragung der Krankheit. Proteinbiochemisch zeigte sich im Gehirnmateriale der Tgshp-Mäuse das gleiche PrP^{Sc}-Bandenmuster wie am Ausgangsschafmaterial. Histologisch waren die PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster und die Läsionsprofile in transgenen Mäusen innerhalb der untersuchten deutschen atypischen Scrapieisolate sowie nach Vergleich mit anderen europäischen atypischen Scrapieisolaten sehr einheitlich, so dass man vermuten kann, dass es sich bei diesen Isolaten um einen einzigen Scrapiestamm handelt.

7 Summary

Anja Gretzschel

Biochemical and histological discrimination between infections with classical and atypical scrapie and infections with BSE in sheep and their transmission to mice

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and

Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Insel Riems

Submitted in May 2007

144 pages, 122 figures, 29 tables, 340 references, 48 pages appendices

Keywords: Scrapie, BSE, Prion, PrP^C, PrP^{Sc}

One aim of this study was the development of a biochemical discriminatory test, (FLI-test), for the discrimination between a scrapie and a BSE infection in sheep using the original brainstem material of the affected sheep. Some of these biochemically analyzed German classical scrapie cases were further characterized using the classical mouse bioassay in order to verify the results of the FLI-test and to further characterize these isolates.

The second part of this study addressed the biochemical features of German atypical scrapie cases as well as their level of infectivity by transmissions to three inbred mouse lines and to one transgenic mouse line. Moreover, these isolates were compared to the classical BSE isolate.

The FLI-test includes the direct determination of molecular masses, antibody binding affinities and glycosylation pattern of the ovine brain material after a specific precipitation of the pathological prion protein by using phosphotungstic acid (PTA-precipitation), SDS-gel electrophoresis and analysis using the VersaDoc imaging system. None of the analyzed 36 classical scrapie cases displayed biochemical features indicative for a BSE infection. Using the mouse bioassay after inoculation of RIII-, VM95- and Tgshp-mice transmission rates and incubation periods, biochemical features like molecular masses, antibody binding affinities, glycosylation pattern and long term proteinase K digestion as well as histopathological characteristics like the degree of vacuolation in 12 different brain regions were used for the discrimination between scrapie and BSE in sheep. Examination of eight German classical scrapie

cases, which were analyzed in the FLI-test as well as in the mouse bioassay, could confirm the results of the FLI-test. By doing so, it could be demonstrated that a differentiation between a BSE and a scrapie infection can be performed by directly analyzing the ovine brain-stem material. This method allows faster results and a higher throughput than the conventional mouse bioassay. The mouse bioassay requires many animals and may, depending on the used mouse line, take up to two years and is therefore time-consuming and expensive. Nevertheless, samples that exhibit biochemical similarities to the BSE agent using the FLI-test or one of the other discriminatory test still need to be examined by the mouse bioassay for a final characterization of the sample.

The four analyzed German atypical scrapie cases showed altered biochemical features as compared to classical scrapie cases. Western blot analysis displayed an additional fourth PrP^{Sc}-fragment and proteinase K sensitivity of atypical PrP^{Sc} was much lower than of PrP^{Sc} found in classical scrapie. Deglycosylation experiments as well as the detection of different epitopes within the prion protein displayed differences to classical scrapie, which may be explained by conformational changes of the prion protein. The antibody binding ratio from monoclonal antibody P4 to monoclonal antibody L42 was similar for atypical and classical scrapie cases and therefore also allowed a discrimination of these atypical scrapie cases from BSE.

The transmissibility of atypical scrapie could be shown by mouse bioassay using transgenic Tgshp-mice. These mice overexpressing the ovine PrP ARQ allele on a mouse PrP ablated background displayed an enhanced susceptibility to classical sheep scrapie and a reduced species barrier. However, transmission of atypical scrapie cases to Tgshp-mice resulted in lower transmission rates and prolonged incubation times as compared to transmissions of classical scrapie cases. Inoculation of German atypical scrapie cases to three inbred mouse lines (RIII, VM95 and C57Bl6) failed to transmit the disease.

Western blot analysis of Tgshp-mice inoculated with German atypical scrapie cases displayed the same banding pattern as seen in the corresponding ovine brain samples. Histopathological examinations of PrP^{Sc} immunoreactivity and lesion profiles in transgenic mice displayed similarities among the examined German atypical scrapie cases and other European atypical scrapie isolates. It can therefore be assumed that these isolates may represent one unique scrapie strain.

8 Literaturverzeichnis

1. Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1966; 22:278-84.
2. Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, et al. 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.* 2000; 81:3115-26.
3. Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, et al. 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.* 2002; 83:2607-16.
4. Anonym. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees).* World Organisation for Animal Health (OIE), 2004; 2:642-653.
5. Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol.* 1995; 176:403-11.
6. Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, et al. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.* 2002; 21:6358-66.
7. Asher DM, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Pathogenesis of subacute spongiform encephalopathies. *Ann Clin Lab Sci.* 1976; 6: 84-103.
8. Aucouturier P, Geissmann F, Damotte D, Saborio GP, Meeker HC, Kasczak R, et al. Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest.* 2001; 108:703-8.
9. Baldauf E, Beekes M, Diringer H. Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol.* 1997; 78:1187-97.
10. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP^{Sc}) into contiguous membranes. *EMBO J.* 2002; 21:1031-40.
11. Baron T. Mouse models of prion disease transmission. *Trends Mol Med.* 2002; 8:495-500.
12. Baron T, Crozet C, Biacabe AG, Philippe S, Verchere J, Bencsik A, et al. Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol.* 2004; 78:6243-51.
13. Baron TG, Madec JY, Calavas D. Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy-linked diseases. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3701-4.
14. Baron TG, Madec JY, Calavas D, Richard Y, Barillet F. Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie in-

- fected sheep. *Neurosci Lett.* 2000; 284:175-8.
15. Baron TG, Biacabe AG. Molecular analysis of the abnormal prion protein during coinfection of mice by bovine spongiform encephalopathy and a scrapie agent. *J Virol.* 2001; 75:107-14.
 16. Barron RM, Thomson V, Jamieson E, Melton DW, Ironside J, Will R, et al. Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. *EMBO J.* 2001; 20:5070-8.
 17. Barron RM, Thomson V, King D, Shaw J, Melton DW, Manson JC. Transmission of murine scrapie to P101L transgenic mice. *J Gen Virol.* 2003; 84:3165-72.
 18. Barron RM, Baybutt H, Tuzi NL, McCormack J, King D, Moore RC, et al. Polymorphisms at codons 108 and 189 in murine PrP play distinct roles in the control of scrapie incubation time. *J Gen Virol.* 2005; 86:859-68.
 19. Bartz JC, Bessen RA, McKenzie D, Marsh RF, Aiken JM. Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 2000; 74:5542-7.
 20. Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE. Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid. *J Biol Chem.* 2002; 277:21140-8.
 21. Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Goldmann W, Smith A, Sivam K, et al. Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J Gen Virol.* 2004; 85:2735-40.
 22. Baylis M, Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med.* 2004; 4:385-96.
 23. Begara-McGorum I, Gonzalez L, Simmons M, Hunter N, Houston F, Jeffrey M. Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol.* 2002; 127:59-68.
 24. Bellworthy SJ, Hawkins SA, Green RB, Blamire I, Dexter G, Dexter I, et al. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec.* 2005a; 156: 197-202.
 25. Bellworthy SJ, Dexter G, Stack M, Chaplin M, Hawkins SA, Simmons MM, et al. Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet Rec.* 2005b; 157: 206.
 26. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003; 153: 202-8.
 27. Beringue V, Mallinson G, Kaiser M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, et al. Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain.* 2003; 126:2065-73.
 28. Bessen RA, Marsh RF. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol.* 1992a; 66:2096-101.
 29. Bessen RA, Marsh RF. Identification of two biologically distinct strains of transmissi-

- ble mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol.* 1992b; 73:329-34.
30. Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 1994; 68:7859-68.
 31. Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* 1995; 375:698-700.
 32. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* 2004; 5: 110-5.
 33. Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, et al. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP^{Sc} in brain homogenate. *J Virol Methods.* 2002; 101:79-84.
 34. Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, et al. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol.* 2002; 83:713-21.
 35. Billinis C, Psychas V, Leontides L, Spyrou V, Argyroudis S, Vlemmas I, et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol.* 2004; 85:547-54.
 36. Bodemer W. The use of monoclonal antibodies in human prion disease. *Naturwissenschaften.* 1999; 86:212-20.
 37. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science.* 1982; 218:1309-11.
 38. Braun U, Kihm U, Pusterla N, Schönmann M. Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE). *Deutsches Tierärzteblatt.* 1997; 2:104-109.
 39. Brown DA, Bruce ME, Fraser JR. Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003; 29:262-72.
 40. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 1997; 390:684-7.
 41. Brown DR. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol Dis.* 2004; 15:534-43.
 42. Bruce ME, Fraser H. Effects of age on cerebral amyloid plaques in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1982; 8:71-4.
 43. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett.* 1989; 102:1-6.
 44. Bruce ME, Fraser H. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991; 172:125-38.
 45. Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol.* 1991; 72:595-603.

46. Bruce ME, Fraser H, McBride PA, Scott JR, Dickinson AG. The basis of strain variation in scrapie. In: Prusiner SB, Collinge J, Powell J, Anderton B, editors. Prion diseases of humans and animals. Ellis Horwood, Chichester; 1992. pp. 497-508.
47. Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull.* 1993; 49:22-38.
48. Bruce ME, Chree AE, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans.* 1994; 343:405-11.
49. Bruce ME. Strain typing studies of scrapie and BSE. In: Baker H, Ridley RM, editors. *Methods in molecular medicine: prion diseases.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1996. pp. 223-36.
50. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature.* 1997; 389:498-501.
51. Bruce ME. 'New variant' Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Nat Med.* 2000; 6:258-9.
52. Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, et al. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol.* 2002; 83:695-704.
53. Bruce ME. TSE strain variation. *Br Med Bull.* 2003; 66:99-108.
54. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* 1992; 356:577-82.
55. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 1993; 73:1339-47.
56. Buschmann A, Pfaff E, Reifenberg K, Müller HM, Groschup MH. Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP^C. *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:75-86.
57. Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, et al. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods.* 2004a; 117:27-36.
58. Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP^{ARR/ARR}). *J Gen Virol.* 2004b; 85:2727-33.
59. Buschmann A, Ziegler U, Groschup MH. Standardization of BSE rapid test performances and experiences gathered during the implementation of large-scale testing. *Accred Qual Assur.* 2004c; 9:191-7.
60. Buschmann A, Groschup MH. TSE eradication in small ruminants-quo vadis? *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005a; 118:365-71.
61. Buschmann A, Groschup MH. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis.* 2005b; 192:934-42.

62. Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, et al. Atypical BSE in Germany - proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol.* 2006; 117:103-16.
63. Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:651-5.
64. Caplazi P, O'Rourke K, Wolf C, Shaw D, Baszler TV. Biology of PrP^{sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16:489-96.
65. Carp RI, Callahan SM, Sersen EA, Moretz RC. Preclinical changes in weight of scrapie-infected mice as a function of scrapie agent-mouse strain combination. *Intervirology.* 1984; 21:61-9.
66. Carp RI, Kim YS, Callahan SM. Scrapie-induced alterations in glucose tolerance in mice. *J Gen Virol.* 1989; 70:827-35.
67. Carp RI, Meeker H, Sersen E. Scrapie strains retain their distinctive characteristics following passages of homogenates from different brain regions and spleen. *J Gen Virol.* 1997; 78:283-90.
68. Carp RI, Meeker H, Sersen E, Kozlowski P. Analysis of the incubation periods, induction of obesity and histopathological changes in senescence-prone and senescence-resistant mice infected with various scrapie strains. *J Gen Virol.* 1998; 79:2863-9.
69. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:3065-70.
70. Castilla J, Saa P, Soto C. Detection of prions in blood. *Nat Med.* 2005a; 11:982-5.
71. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell.* 2005b; 121:195-206.
72. Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol.* 1991; 65:6597-603.
73. Caughey B, Kocisko DA, Raymond GJ, Lansbury PT Jr. Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol.* 1995; 2:807-17.
74. Caughey B, Raymond GJ, Kocisko DA, Lansbury PT Jr. Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J Virol.* 1997; 71:4107-10.
75. Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem.* 1998; 273:32230-5.
76. Caughey B, Raymond GJ, Priola SA, Kocisko DA, Race RE, Bessen RA, et al. Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. *Mol Biotech.* 1999; 13:45-55
77. Clark WW, Hourrigan JL, Hadlow WJ. Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent. *Am J Vet Res.* 1995; 56:606-12.

78. Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res.* 1997; 755:28-35.
79. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature.* 1994; 370:295-7.
80. Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Hill AF, Gowland I, Meads J, et al. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature.* 1995; 378:779-83.
81. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 1996; 383: 685-90.
82. Collinge J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 1999; 354:317-23.
83. Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet.* 2004; 363:51-61.
84. Come JH, Fraser PE, Lansbury PT Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:5959-63.
85. Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 2001; 125: 64-70.
86. Crozet C, Flamant F, Bencsik A, Aubert D, Samarut J, Baron T. Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol.* 2001a; 75:5328-34.
87. Crozet C, Bencsik A, Flamant F, Lezmi S, Samarut J, Baron T. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Rep.* 2001b; 2:952-6.
88. Cutlip RC, Miller JM, Race RE, Jenny AL, Katz JB, Lehmkuhl HD, et al. Intracerebral transmission of scrapie to cattle. *J Infect Dis.* 1994 ; 169: 814-20.
89. Cutlip RC, Miller JM, Lehmkuhl HD. Second passage of a US scrapie agent in cattle. *J Comp Pathol.* 1997; 117: 271-5.
90. Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec.* 1998; 142:623-5.
91. De Bosschere H, Roels S, Vanopdenbosch E. Atypical case of bovine spongiform encephalopathy in an east-Flemish cow in Belgium. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2004a; 2:52-4.
92. De Bosschere H, Roels S, Benestad SL, Vanopdenbosch E. Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec.* 2004b; 155:707-8.
93. De Bosschere H, Roels S, Dechamps P, Vanopdenbosch E. TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. *Vet J.* 2005.
94. Demart S, Fournier JG, Creminon C, Frobert Y, Lamoury F, Marce D, et al. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265:652-57.
95. Detwiler LA. Scrapie. *Rev Sci Tech.* 1992; 11:491-537.

96. Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech.* 2003; 22:121-43.
97. Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM. Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol.* 2005; 86:849-57.
98. Dickinson AG, Meikle VM, Fraser H. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol.* 1968; 78:293-9.
99. Dickinson AG, Meikle VM. Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. *Mol Gen Genet.* 1971; 112:73-9.
100. Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol.* 1974; 84:19-25.
101. Dickinson AG, Outram GW. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp.* 1988; 135:63-83.
102. Diringier H, Beekes M, Oberdieck U. The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 724:246-58.
103. Eddy RG. Origin of BSE. *Vet Rec* 1995; 137:648.
104. Eglin RD, Warner R, Gubbins S, Sivam SK, Dawson M. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. *Vet Rec.* 2005; 156:433-7.
105. Eloit M, Adjou K, Coulpier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, et al. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec* 2005; 156:523-4.
106. Epstein V, Pointing S, Halfacre S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet Rec.* 2005; 157:667-8.
107. Ersdal C, Ulvund MJ, Benestad SL, Tranulis MA. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol.* 2003; 40:164-74.
108. Ersdal C, Ulvund MJ, Espenes A, Benestad SL, Sarradin P, Landsverk T. Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol.* 2005; 42:258-74.
109. Everest SJ, Thorne L, Barnicle DA, Edwards JC, Elliot H, Jackman R, et al. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie surveillance programme. *J Gen Virol.* 2006; 87:471-7.
110. Evoniuk JM, Stoltenow CL, O'Rourke KI, Moore BL, Redmer DA. Assessment of the genetic risk and impact of lateral transmission in a valine-associated scrapie outbreak in sheep. *Am J Vet Res.* 2005; 66:1302-7.
111. Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Creminon C, et al. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells. *J Biol Chem.* 2005; 280:11247-58.
112. Ferguson NM, Ghani AC, Donnelly CA, Hagensars TJ, Anderson RM. Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature*

- 2002; 415: 420-4.
113. Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 1996; 15:1255-64.
 114. Foote WC, Clark W, Maciulis A, Call JW, Hourrigan J, Evans RC, et al. Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1863-8.
 115. Foster J, McKelvey W, Fraser H, Chong A, Ross A, Parnham D, et al. Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. *J Gen Virol.* 1999; 80:517-24.
 116. Foster JD, McKelvey WA, Mylne MJ, Williams A, Hunter N, Hope J, et al. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec.* 1992 ; 130:341-3.
 117. Foster JD, Hope J, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec.* 1993; 133:339-341.
 118. Foster JD, Bruce M, McConnell I, Chree A, Fraser H. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet Rec.* 1996a; 138:546-8.
 119. Foster JD, Hunter N, Williams A, Mylne MJ, McKelvey WA, Hope J, et al. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec.* 1996b; 138:559-62.
 120. Foster JD, Parnham D, Chong A, Goldmann W, Hunter N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec.* 2001a; 148:165-71.
 121. Foster JD, Parnham DW, Hunter N, Bruce M. Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol.* 2001b; 82:2319-26.
 122. Foster JD, Goldmann W, McKenzie C, Smith A, Parnham DW, Hunter N. Maternal transmission studies of BSE in sheep. *J Gen Virol.* 2004; 85:3159-63.
 123. Fraser H, Dickinson AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol.* 1968; 78:301-11.
 124. Fraser H. The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front Biol.* 1976; 44:267-305.
 125. Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol.* 1992; 73:1891-7.
 126. Fraser H, Pearson GR, McConnell I, Bruce ME, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ. Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec.* 1994; 134:449.
 127. Gavier-Widen D, Noremark M, Benestad S, Simmons M, Renstrom L, Bratberg B, et al. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16:562-7.
 128. Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:2476-80.

129. Goldmann W. PrP gene and its association with spongiform encephalopathies. *Br Med Bull.* 1993; 49:839-59.
130. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J. 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.* 1994; 75:989-95.
131. Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, et al. Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol.* 1996; 77:2885-91.
132. Goldmann W, Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Hunter N. Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *J Appl Microbiol.* 2005; 98:1294-302.
133. Gonzalez L, Martin S, Begara-McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, et al. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol.* 2002; 126:17-29.
134. Gonzalez L, Martin S, Jeffrey M. Distinct profiles of PrP^d immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 2003; 84:1339-50.
135. Gonzalez L, Martin S, Houston FE, Hunter N, Reid HW, Bellworthy SJ, et al. Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol.* 2005a; 86:827-38.
136. Gonzalez L, Jeffrey M, Siso S, Martin S, Bellworthy SJ, Stack MJ, et al. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec.* 2005b; 156:846-7.
137. Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:646-50.
138. Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:8342-7.
139. Gravenor MB, Ryder SJ, Gubbins S, Hunter N, Baylis M, Kao RR. Searching for BSE in sheep: interpreting the results so far. *Vet Rec.* 2003; 152:298-9.
140. Green R, Horrocks C, Wilkinson A, Hawkins SA, Ryder SJ. Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions. *J Comp Pathol.* 2005; 132:117-31.
141. Gretzschel A, Buschmann A, Eiden M, Ziegler U, Luhken G, Erhardt G, et al. Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52:55-63.
142. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature.* 1967; 215:1043-4.
143. Groschup MH, Pfaff E. Studies on a species-specific epitope in murine, ovine and bovine prion protein. *J Gen Virol.* 1993; 74:1451-56.
144. Groschup MH, Langeveld J, Pfaff E. The major specific epitope in prion proteins of ruminants. *Arch Virol.* 1994; 136:423-31.
145. Groschup MH, Kuczius T, Junghans F, Sweeney T, Bodemer W, Buschmann A.

- Characterization of BSE and scrapie strains/isolates. *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:217-26.
146. Groschup MH, Junghans F, Eiden M, Kuczius T. Characterization of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Strains/Isolates by Immunochemical Analysis of PrP^{Sc}. In: Baker HF, editor. *Molecular Pathology of the Prion. Methods of Molecular Medicine.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2001.
147. Groschup MH, Stolze A. BSE and scrapie diagnosis in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2002; 115:106-10.
148. Hadlow WJ, Race RE, Kennedy RC, Eklund CM. Natural infection of sheep with scrapie virus. In: Prusiner SB, Hadlow WJ, editors. *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System.* New York; 1979. pp. 3-12.
149. Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis.* 1982; 146:657-64.
150. Hardt M, Baron T, Groschup MH. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol.* 2000; 122:43-53.
151. Harmeyer S, Pfaff E, Groschup MH. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol.* 1998; 79:937-45.
152. Harris DA. Chlathrin-coated vesicles and detergent-resistant rafts in prion biology. *Bull Inst Pasteur.* 1998; 96:207-10.
153. Hayashi HK, Yokoyama T, Takata M, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, et al. The N-terminal cleavage site of PrP^{Sc} from BSE differs from that of PrP^{Sc} from scrapie. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328:1024-7.
154. Heggebo R, Press CM, Gunnes G, Lie KI, Tranulis MA, Ulvund M, et al. Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol.* 2000; 81:2327-37.
155. Heggebo R, Press CM, Gunnes G, Ulvund MJ, Tranulis MA, Lsverk T. Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *J Comp Pathol.* 2003; 128:172-81.
156. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, et al. Evidence of pre-synaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci.* 1999; 19:8866-75.
157. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 1997; 389:448-50.
158. Hill AF, Sidle KC, Joiner S, Keyes P, Martin TC, Dawson M, et al. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci Lett.* 1998; 255:159-62.
159. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet.* 1999; 353:183-9.
160. Hill AF, Collinge J. Prion strains and species barriers. *Contrib Microbiol.* 2004; 11:33-49.

161. Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, et al. Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain*. 2006; 129:676-85.
162. Hoinville LJ. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*. 1996; 15:827-52.
163. Hope J, Wood SC, Birkett CR, Chong A, Bruce ME, Cairns D, et al. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol*. 1999; 80:1-4.
164. Hornemann S, Schorn C, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep*. 2004; 5:1159-64.
165. Hourrigan JL, Klingsporn AL. Scrapie: studies on vertical and horizontal transmission. In: Gibbs CJ, editor. *Bovine Spongiform Encephalopathy. The BSE Dilemma*. New York: Springer; 1996. pp. 59-83.
166. Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*. 2000; 356:999-1000.
167. Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, Gonzalez L, Foster J, et al. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*. 2003; 423:498.
168. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. 1989; 338:342-5.
169. Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol*. 1994; 137:171-7.
170. Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*. 1996; 141:809-24.
171. Hunter N. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*. 1997; 5:331-4.
172. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*. 2002; 83:2897-905.
173. Hunter N. Scrapie and experimental BSE in sheep. *Br Med Bull*. 2003; 66:171-83.
174. Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Kai-Uwe GD, Shinagawa M. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J Gen Virol*. 1995; 76:2577-81.
175. Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, et al. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*. 1999; 283:1935-7.
176. Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL. Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol Suppl*. 2000; 16:23-38.
177. Jeffrey M, Ryder S, Martin S, Hawkins SA, Terry L, Berthelin-Baker C, et al. Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1.

- Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol.* 2001a; 124:280-9.
178. Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Jackman R. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol.* 2001b; 125:271-84.
179. Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I, Gonzalez L. Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol.* 2001c; 125:48-57.
180. Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L. Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 2003; 84:1033-45.
181. Jeffrey M, Gonzalez L, Chong A, Foster J, Goldmann W, Hunter N, et al. Ovine Infection with the Agents of Scrapie (CH1641 Isolate) and Bovine Spongiform Encephalopathy: Immunochemical Similarities can be Resolved by Immunohistochemistry. *J Comp Pathol.* 2006; 134:17-29.
182. Junghans F. Scrapie: Untersuchungen zum genetischen Status deutscher Schafe und Charakterisierung deutscher und anderer europäischer Feldisolate [PhD Thesis]. Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2004.
183. Kao RR, Gravenor MB, Baylis M, Bostock CJ, Chihota CM, Evans JC, et al. The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. *Science.* 2002; 295:332-5
184. Kao RR, Houston F, Baylis M, Chihota CM, Goldmann W, Gravenor MB, et al. Epidemiological implications of the susceptibility to BSE of putatively resistant sheep. *J Gen Virol.* 2003; 84:3503-12.
185. Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H. Biochemical differences among scrapie-associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol.* 1985; 66:1715-22.
186. Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM, et al. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol.* 1986; 59:676-83.
187. Kim YS, Carp RI, Callahan SM, Wisniewski HM. Scrapie-induced obesity in mice. *J Infect Dis.* 1987; 156:402-5.
188. Kim YS, Carp RI, Callahan SM, Wisniewski HM. Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1988; 189:21-7.
189. Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol.* 1980; 51:183-7.
190. Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. *J R Soc Med.* 1982; 75:618-24.
191. Kimberlin RH. Scrapie agent: prions or virinos? *Nature.* 1982; 297:107-8.

192. Kimberlin RH, Walker CA, Millson GC, Taylor DM, Robertson PA, Tomlinson AH, et al. Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci.* 1983; 59:355-69.
193. Kimberlin RH, Wilesmith JW. Bovine spongiform encephalopathy. Epidemiology, low dose exposure and risks. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 724:210-20.
194. King CY, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature.* 2004; 428:319-23.
195. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* 1994; 370:471-4.
196. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature.* 1997; 390:74-7.
197. Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Mol Med.* 1996; 2:725-34.
198. Krasemann S, Jurgens T, Bodemer W. Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *J Biotechnol.* 1999; 73:119-29.
199. Krishnan R, Lindquist SL. Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature.* 2005; 435:765-72.
200. Kuczius T, Haist I, Groschup MH. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J Infect Dis.* 1998; 178:693-9.
201. Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *J Vet Med Sci.* 2005; 67:321-3.
202. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, et al. BSE transmission to macaques. *Nature.* 1996; 381:743-4.
203. Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, et al. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science.* 1997; 275:402-5.
204. Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, et al. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol.* 1992; 166:333-41.
205. Laude H, Vilette D, Le Dur A, Archer F, Soulier S, Besnard N, et al. New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol.* 2002; 325:49-57.
206. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, et al. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:16031-6.
207. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al. Synthetic mammalian prions. *Science.* 2004; 305:673-6.
208. Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys JP, et al. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immu-

- nohistochemical methods. *J Virol.* 2004; 78:3654-62.
209. Ligios C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol.* 2002; 127:45-57.
210. Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallinson G, Farrall M, Targonski P, et al. Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:6279-83.
211. Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:8334-9.
212. Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, et al. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:640-5.
213. Mallucci GR, Ratten S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 2002; 21:202-10.
214. Manolakou K, Beaton J, McConnell I, Farquar C, Manson J, Hastie ND, et al. Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:7402-7.
215. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol.* 1994; 8:121-7.
216. Manuelidis L. Dementias, neurodegeneration, and viral mechanisms of disease from the perspective of human transmissible encephalopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 724:259-81.
217. Manuelidis L, Sklaviadis T, Akowitz A, Fritch W. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:5124-8.
218. Manuelidis L. Transmissible encephalopathies: speculations and realities. *Viral Immunol.* 2003; 16:123-39.
219. Martin S, Gonzalez L, Chong A, Houston FE, Hunter N, Jeffrey M. Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 2005; 86:839-48.
220. Mayer RJ, Landon M, Laszlo L, Lennox G, Lowe J. Protein processing in lysosomes: the new therapeutic target in neurodegenerative disease. *Lancet.* 1992; 340:156-9.
221. McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretzschmar HA, et al. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol.* 2001; 75:9320-7.
222. McCutcheon S, Hunter N, Houston F. Use of a new immunoassay to measure PrP^{Sc} levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences. *J Immunol Methods.* 2005; 298:119-28.

223. McGovern G, Brown KL, Bruce ME, Jeffrey M. Murine scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen. *J Comp Pathol.* 2004; 130:181-94.
224. McGowan JP. Scrapie in sheep. *J Agric.* 1922; 5:365-75.
225. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol.* 1999; 292:797-817.
226. Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardiere C. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol.* 2001; 82:2017-24.
227. Mould DL, Dawson M, Slater JS, Zlotnik I. Relationships between chemical changes and histological damage in the brains of scrapie affected mice. *J Comp Pathol.* 1967; 77:393-403.
228. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T, et al. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol.* 2005; 86:231-5.
229. Moynagh J, Schimmel H. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature.* 1999; 400:105.
230. Neuendorf E, Weber A, Saalmueller A, Schatzl H, Reifenberg K, Pfaff E, et al. Glycosylation deficiency at either one of the two glycan attachment sites of cellular prion protein preserves susceptibility to bovine spongiform encephalopathy and scrapie infections. *J Biol Chem.* 2004; 279:53306-16.
231. Nonno R, Esposito E, Vaccari G, Conte M, Marcon S, Di Bari M, et al. Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4127-33.
232. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP²⁷⁻³⁰ protein. *Cell.* 1985; 40:735-46.
233. Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, et al. Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:189-95.
234. Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Lett.* 2003; 538:96-100.
235. Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec.* 2004; 155:636-7.
236. Onodera T, Ikeda T, Muramatsu Y, Shinagawa M. Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. *Microbiol Immunol.* 1993; 37:311-6.
237. Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, et al. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol.* 2004; 85:3487-91.
238. O'Rourke KI, Holyoak GR, Clark WW, Mickelson JR, Wang S, Melco RP, et al. PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States. *J Gen Virol.* 1997; 78:975-8.

239. O'Rourke KI, Baszler TV, Parish SM, Knowles DP. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet Rec.* 1998a; 142:489-91.
240. O'Rourke KI, Baszler TV, Miller JM, Spraker TR, Sadler-Riggelman I, Knowles DP. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J Clin Microbiol.* 1998b; 36:1750-5.
241. O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GA, et al. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3254-9.
242. O'Rourke KI, Duncan JV, Logan JR, Anderson AK, Norden DK, Williams ES, et al. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:966-71.
243. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Mendez E, Mothes T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001; 13:1189-93.
244. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:10962-6.
245. Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, et al. Typing prion isoforms. *Nature.* 1997; 386:232-4.
246. Pastrana MA, Sajnani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C, et al. Isolation and Characterization of a Proteinase K-Sensitive PrP^{Sc} Fraction. *Biochemistry.* 2006; 45:15710-17.
247. Pattison IH, Millson GC. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol.* 1961; 71:101-9.
248. Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec.* 1972 ; 90:465-8.
249. Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J.* 1974; 130:lxv-lxvii.
250. Press CM, Heggebo R, Espenes A. Involvement of gut-associated lymphoid tissue of ruminants in the spread of transmissible spongiform encephalopathies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56:885-99.
251. Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, et al. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:919-24.
252. Prinz M, Huber G, Macpherson AJ, Heppner FL, Glatzel M, Eugster HP, et al. Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol.* 2003; 162:1103-11.
253. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 1982; 216:136-44.

254. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*. 1983; 35:349-58.
255. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirenda C, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*. 1990; 63:673-86.
256. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991; 252:1515-22.
257. Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*. 1997; 278:245-51.
258. Race R, Jenny A, Sutton D. 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*. 1998; 178:949-53.
259. Race RE, Raines A, Baron TG, Miller MW, Jenny A, Williams ES. Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *J Virol*. 2002; 76:12365-8.
260. Redman CA, Coen PG, Matthews L, Lewis RM, Dingwall WS, Foster JD, et al. Comparative epidemiology of scrapie outbreaks in individual sheep flocks. *Epidemiol Infect*. 2002; 128:513-21.
261. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*. 1996; 382:180-2.
262. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*. 1997; 413:282-8.
263. Riesner D, Kellings K, Wiese U, Wulfert M, Mirenda C, Prusiner SB. Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand*. 1993; 80:173-81.
264. Rivera-Milla E, Stuermer CA, Malaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet*. 2003; 19:72-5.
265. Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, et al. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J*. 2001; 20:694-702.
266. Rubenstein R, Gray PC, Wehlburg CM, Wagner JS, Tisone GC. Detection and discrimination of PrP^{Sc} by multi-spectral ultraviolet fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 246:100-6.
267. Ryder S, Dexter G, Bellworthy S, Tongue S. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res Vet Sci*. 2004; 76:211-7.
268. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 2001; 411:810-3.
269. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, et al. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998; 4:1157-65.
270. Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, et al. Measuring

- prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 2002; 20:1147-50.
271. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature.* 1996; 380:528-31.
272. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, et al. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl).* 1999; 98:437-43.
273. Schoon HA, Brunckhorst D, Pohlenz J. Spongiform encephalopathy in a red-necked ostrich (*Struthio camelus*). *Tierarztl Prax.* 1991a; 19:263-5.
274. Schoon HA, Brunckhorst D, Pohlenz J. Beitrag zur Neuropathologie beim Rothalsstrauss (*Struthio camelus*) - Spongiforme Enzephalopathie. *Verh.Ber.Erkrq.Zootiere.* 1991b; 33.
275. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Preclinical test for prion diseases. *Nature.* 1996; 381:563.
276. Schreuder BE, van Keulen LJ, Smits MA, Langeveld JP, Stegeman JA. Control of scrapie eventually possible? *Vet Q.* 1997; 19:105-13.
277. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Tonsillar biopsy and PrP^{Sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec.* 1998; 142:564-8.
278. Schreuder BE, Somerville RA. Bovine spongiform encephalopathy in sheep? *Rev Sci Tech.* 2003; 22:103-20.
279. Schulz-Schaeffer WJ, Fatzer R, Vandeveld M, Kretzschmar HA. Detection of PrP^{Sc} in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol Suppl.* 2000a; 16:173-80.
280. Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, et al. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP^{Sc} early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol.* 2000b; 156:51-6.
281. Scott MR, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, et al. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:14279-84.
282. Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1993; 268:15922-8.
283. Sigurdarson S. Epidemiology of scrapie in Iceland and experiences with control measures. In: Bradley R, Savey S, Marchant B, editors. *Sub-acute spongiform encephalopathies.* Dordrecht: Kluwer Academic; 1991. pp. 233-42.
284. Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, et al. The most infectious prion protein particles. *Nature.* 2005; 437:257-61.
285. Silverman GL, Qin K, Moore RC, Yang Y, Mastrangelo P, Tremblay P, et al. Doppel

- is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem.* 2000; 275:26834-41.
286. Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IW, Wells GA. BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec.* 1996; 138:175-7.
287. Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* 2000; 469:33-8.
288. Somerville RA, Chong A, Mulqueen OU, Birkett CR, Wood SC, Hope J. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature.* 1997; 386:564.
289. Somerville RA. Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J Gen Virol.* 1999; 80:1865-72.
290. Somerville RA. TSE agent strains and PrP: reconciling structure and function. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27:606-12.
291. Somerville RA, Oberthur RC, Havekost U, MacDonald F, Taylor DM, Dickinson AG. Characterization of thermodynamic diversity between transmissible spongiform encephalopathy agent strains and its theoretical implications. *J Biol Chem.* 2002; 277:11084-9.
292. Somerville RA, Hamilton S, Fernie K. Transmissible spongiform encephalopathy strain, PrP genotype and brain region all affect the degree of glycosylation of PrP^{Sc}. *J Gen Virol.* 2005; 86:241-6.
293. Soto C, Saborio GP, Anderes L. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* 2002; 25:390-4.
294. Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med.* 2004; 10:63-7.
295. Spraker TR, O'Rourke KI, Balachandran A, Zink RR, Cummings BA, Miller MW, et al. Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Vet Diagn Invest.* 2002; 14:3-7.
296. Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J. Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl).* 2002; 104:279-86.
297. Stack MJ, Balachandran A, Chaplin M, Davis L, Czub S, Miller B. The first Canadian indigenous case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) has molecular characteristics for prion protein that are similar to those of BSE in the United Kingdom but differ from those of chronic wasting disease in captive elk and deer. *Can Vet J.* 2004; 45:825-30.
298. Steele DS, Emsley JG, Özdinler PH, Lindquist S, Macklis JD. Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult

- mammalian neurogenesis. PNAS. 2006; 103:3416-21.
299. Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, et al. Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics*. 2000; 69:47-53.
300. Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett*. 2001; 508:170-4.
301. Sweeney T, Kuczius T, McElroy M, Parada MG, Groschup MH. Molecular analysis of Irish sheep scrapie cases. *J Gen Virol*. 2000; 81:2121.
302. Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*. 2004; 428:323-8.
303. Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:7620-4.
304. Taylor DM, Fernie K, Steele PJ, McConnell I, Somerville RA. Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents. *J Gen Virol*. 2002; 83:3199-204.
305. Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, et al. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:9936-40.
306. Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, et al. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*. 1996; 274:2079-82.
307. Telling GC. The mechanism of prion strain propagation. *Genome Biol*. 2004; 5:222.
308. Thomzig A, Spassov S, Friedrich M, Naumann D, Beekes M. Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem*. 2004; 279:33847-54.
309. Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson HM, Georgsson G, Palsdottir A. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol*. 1999; 80:2527-34.
310. Thuring CMA. Pre-clinical detection of PrP^{Sc} in sheep [PhD Thesis]. Dublin: University College; 2002.
311. Thuring CM, Erkens JH, Jacobs JG, Bossers A, Van Keulen LJ, Garssen GJ, et al. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:972-80.
312. Thuring CM, van Keulen LJ, Langeveld JP, Vromans ME, van Zijderveld FG, Sweeney T. Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep. *J Comp Pathol*. 2005; 132:59-69.
313. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 1996; 380:639-42.
314. Touzeau S, Chase-Topping ME, Matthews L, Lajous D, Eychenne F, Hunter N, et al.

- Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. *Arch Virol.* 2006; 151:735-51.
315. Tuo W, Zhuang D, Knowles DP, Cheevers WP, Sy MS, O'Rourke KI. Prp^C and Prp^{Sc} at the fetal-maternal interface. *J Biol Chem.* 2001; 276:18229-34.
316. Tuo W, O'Rourke KI, Zhuang D, Cheevers WP, Spraker TR, Knowles DP. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:6310-5.
317. Unterberger U, Voigtlander T, Budka H. Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuro-pathol (Berl).* 2005; 109:32-48.
318. van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, et al. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol.* 1995; 32:299-308.
319. van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1228-31.
320. van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol.* 1999; 121:55-63.
321. van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:57-71.
322. van Keulen LJ, Vromans ME, van Zijderveld FG. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS.* 2002; 110:23-32.
323. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:14945-9.
324. Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, Lepourry L, et al. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol.* 2001; 75:5977-84.
325. Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol.* 1999; 1:55-9.
326. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet.* 2001; 358:171-80.
327. Wang S, Foote WC, Sutton DL, Maciulis A, Miller JM, Evans RC, et al. Preventing experimental vertical transmission of scrapie by embryo transfer. *Theriogenology.* 2001; 56:315-27.
328. Wang S, Cockett NE, Miller JM, Shay TL, Maciulis A, Sutton DL, et al. Polymorphic distribution of the ovine prion protein (PrP) gene in scrapie-infected sheep flocks in which embryo transfer was used to circumvent the transmissions of scrapie. *Theriogenology.* 2002; 57:1865-75.
329. Weissmann C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J*

- Biol Chem. 1999; 274:3-6.
330. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 1987; 121:419-20.
331. Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell.* 1987; 51:651-62.
332. Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:6418-22.
333. Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec.* 1988; 123:638-44.
334. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinsons MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec.* 1991; 128:199-203.
335. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996; 347:921-5.
336. Wood JL, McGill IS, Done SH, Bradley R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec.* 1997; 140:167-74.
337. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrP^s reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* 1999; 289:1163-78.
338. Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, et al.; Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP^{res}) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis.* 2003; 56:221-2.
339. Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, et al. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:145-50.
340. Zanusso G, Casalone C, Acutis P, Bozzetta E, Farinazzo A, Gelati M, et al. Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *J Gen Virol.* 2003; 84:1047-52.

Internetseiten:

DEFRA. NSP genotypes table. 2003 (zitiert vom 01.12.2005):

<<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/nsp/pdf/genotypes.pdf>>.

DEFRA. Possible BSE in a 1990 UK goat sample. 2005a (zitiert vom 01.12.2005):

<<http://www.defra.gov.uk/news/2005/050208a.htm>>.

DEFRA. BSE: Statistics - General statistics for GB. 2005b (zitiert vom 01.12.2005):

<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/statistics/bse/general.html>

Matravers W, Bridgeman J, Smith MF. The BSE inquiry. The stationery Office LTD.,

Norwich, UK. 2000; 16:37. (zitiert vom 01.12.2005):

<http://www.bseinquiry.gov.uk/pdf/volume16/Chapter3.pdf>

OIE. Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide (excluding the United Kingdom). 2006. (zitiert vom 06.01.2006):

http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm

SIMFIT. Version 5.6.1. 2006 (zitiert vom 14.12.2005):

<<http://www.simfit.man.ac.uk>>

Gesetze und Verordnungen

(2001)

Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

(Amtsblatt L147 vom 31.05.2001)

geändert durch folgende Rechtsakte (Auszug):

Verordnung (EG) Nr. 36/2005 der Kommission vom 12. Januar 2005 zur Änderung der VO (EG) Nr. 999/2001 (Amtsblatt L10 vom 13.01.2005)

9 Anhang

9.1 Materialien

9.1.1 Antikörper

9.1.1.1 Antikörper gegen PrP

Alle verwendeten PrP-Antikörper sind in den Tabellen 9.1.1, 9.1.2 und 9.1.3 dargestellt.

9.1.1.2 andere Antikörper

MAK Anti-GFAP

Dieser monoklonale Mausantikörper (Klon 6F2) ist gegen das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) des Menschen gerichtet, zeigt aber Kreuzreaktivität mit anderen Säugetierspezies (Dako, Glostrup, Dänemark). Der MAK lag als Zellkulturüberstand vor.

Name	Verdünnung 1. AK	2. AK	Verdünnung 2. AK
GFAP	1:100	GαM	1:100

MAK Anti-His

RGS – His, zur Detektion des mit einem Histidin-Tag versehenen FLI-Markers (Qiagen, Hilden).

Name	Verdünnung 1. AK	2. AK	Verdünnung 2. AK
Anti-His	1:2000	GαM	1:2000

Tab. 9.1.1: PrP-Antikörper, die für den Western Blot am Mausmaterial verwendet wurden

Name	PAK/ MAK	Epitop	Spezies	SL (µg/ml)	AL (µg/ml)	VD	2. AK	Bezugsquelle	Literatur
Ra10	PAK	107-122	Maus	-	-	1:2000	GαRa	INNT, Insel Riems	Groschup u. Pfaff 1993 Groschup et al. 1994
SAF 32	MAK	59-89	Mensch, Hamster, Rind, Schaf, Maus	-	-	1:1000	GαM	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	Feraudet et al. 2005
3B5	MAK	51-90	Rind, Schaf, Maus	-	-	1:20	GαM	W. Bodemer, DPZ Göttingen	Bodemer 1999
L42	MAK	145-163	Rind, Schaf, Mensch, Nerz	1000	0,4	1:2500	GαM	R-Biopharm AG, Darmstadt	Harmeyer et al. 1998 Hardt et al. 2000
P4	MAK	93-99	Schaf, Rind	1000	0,4	1:2500	GαM	R-Biopharm AG, Darmstadt	Harmeyer et al. 1998 Hardt et al. 2000 Thuring et al. 2004

Die Antikörper Ra10, SAF 32 und 3B5 wurden für die PrP-Detektion bei RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen verwendet, die Antikörper L42 und P4 für die PrP-Detektion bei Tgshp-Mäusen.

ST Stammlösung (µg/ml) AL Arbeitslösung (µg/ml) VD Verdünnung

Tab. 9.1.2: PrP-Antikörper, die für die Histologie am Mausmaterial verwendet wurden

Name	PAK/ MAK	Epitop	Spezies	Verdünnung 1. AK	2. AK	Verdünnung 2. AK	Bezugsquelle	Literatur
SAF 84	MAK	126-164	Hamster, Rind, Schaf, Maus	1:2000	GαM	1:200	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette Cedex, Frankreich	Demart et al. 1999 Feraudet et al. 2005
14D11	MAK	180-200	Mensch, Rind, Schaf, Maus	1:500	GαM	1:200	Roboscreen, Leipzig	Osman et al. 2001
Ra10	PAK	107-122	Maus	1:5000	GαRa	1:200	INNT, Insel Riems	Groschup u. Pfaff 1993 Groschup et al. 1994
L42	MAK	145-163	Rind, Schaf, Mensch, Netz	1:500	GαM	1:200	R-Biopharm AG, Darmstadt	Harmeyer et al. 1998 Hardt et al. 2000
F89	MAK	142-144	Schaf, Rind, Wildwieder- käufer, Mensch	1:2000	GαM	1:200	VMRD, Pullmann, USA (NatuTec, Frankfurt)	O'Rourke et al. 1998b O'Rourke et al. 2000
2G11	MAK	146-182	Schaf	1:250	GαM	1:200	Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich	Andreoletti et al. 2000

Der Antikörper Ra10 wurde nur für die PrP-Detektion bei RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen verwendet, die Antikörper SAF 84 und 14D11 sowohl bei RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäusen als auch bei Tgshp-Mäusen und die Antikörper L42, F89 und 2G11 wurden nur bei Tgshp-Mäusen verwendet.

Tab. 9.1.3: PrP-Antikörper, die für den Western Blot am Schafmaterial verwendet wurden

Name	Epitop	Spezies	ST	AL	VD	Bezugsquelle	Literatur
P4	93-99	Schaf, Rind	1000	0,4	1:2500	R-Biopharm AG, Darmstadt	Harmeyer et al. 1998 Hardt et al. 2000 Thuring et al. 2004
12B2	93-97	Rind, Schaf	1705	1	1:666	J. Langeveld, CIDC Lelystad, Niederlande	J. Langeveld, unveröffentlicht
SAF32	59-89	Mensch, Hamster, Rind, Schaf, Maus	-	-	1:1000	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	Feraudet et al. 2005
8G8	97-102	Mensch, Schaf, Rind, Hamster, Maus	-	-	1:1000	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	Krasemann et al. 1996 Krasemann et al. 1999 Feraudet et al. 2005
SAF34	59-89	Mensch, Hamster, Rind, Schaf, Maus	-	-	1:1000	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	Feraudet et al. 2005 Moudjou et al. 2001
L42	145-163	Rind, Schaf, Mensch, Nerz	1000	0,4	1:2500	R-Biopharm AG, Darmstadt	Harmeyer et al. 1998 Hardt et al. 2000
AG4	147-163 (31-51)	Schaf, Maus, Mensch, Rind, Hamster	1000	1	1:1000	TSE Resource Centre, Compton, England www.iah.bbsrc.ac.uk/tse-rc/monoclonalantibodies.html	-
ICSM35	93-102	Schaf, Maus, Mensch, Rind, Hamster	3000	1	1:2857	John Collinge, MRC prion unit London, England D-Gen, London, England	Beringue et al. 2003
9A2	112-114	Rind, Schaf	2040	1	1:2000	J. Langeveld, CIDC Lelystad, Niederlande	J. Langeveld, unveröffentlicht

F89	142-144	Schaf, Rind, Wildwiederkäuer, Mensch	1000	3	1:333	VMRD, Pullmann, USA (NatuTec, Frankfurt)	O'Rourke et al. 1998b O'Rourke et al. 2000
ICSM18	143-153	Schaf, Maus, Mensch, Rind, Hamster	3600	1	1:3333	John Collinge, MRC prion unit London, England D-Gen, London, England	Beringue et al. 2003
94B4	~200	Rind, Schaf	659	1	1:1666	J. Langeveld, CIDC Lelystad, Niederlande	Thuring et al. 2004
6H4	144-152	Mensch, Rind, Schaf, Hase, Hamster, Nerz, Maus, Ratte	-	-	1:10000	Prionics AG, Zürich, Schweiz	Korth et al. 1997
12F10	144-152	Mensch, Schaf, Rind	-	-	1:1000	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	Krasemann et al. 1996 Krasemann et al. 1999 Feraudet et al. 2005
R145	221-234	Rind, Schaf	1000	4	1:250	VLA, Weybridge, England http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/comserv/documents/comserv-reagents05-06.pdf	Jeffrey et al. 2001b Jeffrey et al. 2003
F99	220-225	Schaf, Rind, Wildwiederkäuer	1000	3	1:333	VMRD, Pullmann, USA (NatuTec, Frankfurt)	O'Rourke et al. 2000 Spraker et al. 2002
BG4	45-57	Schaf, Rind, Mensch, Hamster	1000	1	1:1000	TSE Resource Centre, Compton, England www.iah.bbsrc.ac.uk/tse-re/monoclonalantibodies.html	Jeffrey et al. 2001b Martin et al. 2005
FH11	54-60	Schaf, Rind, Mensch, Hamster	1000	1	1:1000	TSE Resource Centre, Compton, England www.iah.bbsrc.ac.uk/tse-re/monoclonalantibodies.html	Jeffrey et al. 2001b Jeffrey et al. 2003
3B5	51-90	Rind, Schaf, Maus	-	-	1:20	W. Bodemer, DPZ Göttingen	Bodemer et al. 1999

ST	Stammlösung (µg/ml)	CIDC	Central Institute for Animal Disease Control	CEA	Commissariat a l'energie atomique
AL	Arbeitslösung (µg/ml)	VLA	Veterinary Laboratories Agency	DPZ	Deutsches Primatenzentrum
VD	Verdünnung				

Bei allen verwendeten monoklonalen Antikörpern dieser Tabelle handelt es sich um Maus-monoklonale Antikörper, lediglich MAK R145 ist ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte.

9.1.2 Konjugate

Ziege-Anti-Maus IgG

spezifisch für die H + L-Ketten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, für Western Blot (115-035-062, Dianova, Hamburg)

Ziege-Anti-Kaninchen IgG

spezifisch für die H + L-Ketten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, für Western Blot (111-055-003, Dianova, Hamburg)

Ziege-Anti-Ratte IgG

spezifisch für die H + L-Ketten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, für Western Blot (112-055-003, Dianova, Hamburg)

Ziege-Anti-Maus IgG

spezifisch für die H + L Ketten, biotinyliert, für die Immunhistologie (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame)

Ziege-Anti-Kaninchen IgG

spezifisch für die H + L Ketten, biotinyliert, für die Immunhistologie (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame)

9.1.3 Enzyme

Benzonase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K (Western Blot)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K (Histologie)	Roche, Mannheim
PNGase F, N-Glykosidase F, rekombinant	Roche, Mannheim

9.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in A. bidest. angesetzt und bei RT gelagert.

APS-Lösung (10 %)

Ammoniumpersulfat	1 g
A. bidest.	10 ml

Assay Puffer (10x, pH 9,8)

Tris	24,2 g
MgCl ₂	2,03 g
A. bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.

Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt.

Blotting Puffer

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
SDS	2 g

	A. bidest.	ad 1 l
Bromphenolblaulösung (1 %)		
	Bromphenolblau	1 g
	A. bidest.	ad 100 ml
Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0)		
	Zitronensäuremonohydrat	2,1 g
	A. bidest.	ad 1 l
Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH eingestellt.		
CVL-Puffer (10x, pH 6,8)		
	SDS	2 g
	Tris/HCl-Lösung (1 M, pH 7,4)	5 ml
	Mercaptoethanol	5 ml
	Sucrose	3 g
	1 %ige Bromphenolblau-Lösung	5 Tropfen
	A. bidest.	ad 20 ml
Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.		
Mit A. bidest. wurde auf 2x Konzentration verdünnt.		
DAB-Lösung		
	Diaminobenzidintetrahydrochlorid	100 mg
	Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)	ad 200 ml
	H ₂ O ₂ (kurz vor Gebrauch zufügen)	70 µl
Vor Gebrauch filtrieren.		
Denaturierungspuffer		
	SDS	5 g
	Mercaptoethanol	10 ml
	A. bidest.	ad 100 ml
Eosin		
	Eosin G	10 g
	Eisessig	10 Tropfen
	Ethanol (50 % v/v)	ad 1 l
E-Puffer (10x)		
	Tris	150 g
	Glycin	720 g
	SDS	50 g
	A. bidest.	ad 5 l
Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt.		
Formalin (4 %, neutral gepuffert)		
	A. bidest.	900 ml
	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	4 g
	Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	8,15 g
	komplett lösen mit Rührfisch	
	37 %iges Formalin	100 ml
Hämatoxylin-Lösung		
	Hämatoxylin	1 g
	A. bidest.	ad 1 l

	vollständig lösen	
	Natrium-Iodat	0,2 g
	Kalium-Aluminiumsulfat	50 g
	dazugeben und vollständig lösen	
	Chloralhydrat	50 g
	Zitronensäure-Monohydrat	50 g
	Vor Gebrauch filtrieren.	
	Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)	
	Imidazol	1,36 g
	A. bidest.	ad 200 ml
	Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.	
	Magermilch (5%)	
	Magermilchpulver	5 g
	PBS-Tween	ad 100 ml
	Methanol mit 3 % H₂O₂	
	Wasserstoffperoxid, 30 %	10 ml
	Methanol	90 ml
	Magnesiumchloridlösung (0,1 M)	
	Magnesiumchloridhexahydrat	2,03 g
	A. bidest.	ad 100 ml
	Natriumphosphatpuffer (0,5 M, pH 7,2)	
	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	69,9 g
	A. bidest.	ad 1 l
	Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH eingestellt.	
	PBS (10x)	
	Natriumchlorid	400 g
	Kaliumchlorid	10 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	10 g
	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	57,5 g
	A. bidest.	ad 5 l
	Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt.	
	PBS mit 4 % Sarkosyl (pH 7,4)	
	Sarkosyl	10 g
	PBS	ad 250 ml
	Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.	
	PBS mit 0,1 % Sarkosyl (pH 7,4)	
	Sarkosyl	0,25 g
	PBS	ad 250 ml
	Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.	
	Pefabloc (0,1 M)	
	Pefabloc	100 mg
	A. bidest.	ad 4,17 ml
	Lagerung bei -20°C.	
	PBS-Tween	
	Tween 20	1 ml

PBS	ad 1 l
PK-Puffer (10x, pH 8,3)	
Tris	60,56 g
EDTA	2,92 g
Tween 20	10 ml
A. bidest.	ad 1 l
Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.	
Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt.	
PK Stammlösung (1 mg/ml, Western Blot)	
PK Stammlösung 21,7 mg/ml	4,6 µl
Tris/HCl (10 mM, pH 7,5)	ad 100 µl
PK Stammlösung (1 mg/ml, Histologie)	
Proteinase K	100 mg
A. bidest.	100 ml
PMSF-Lösung (0,1 M)	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,435 g
Isopropanol	ad 25 ml
4 % PTA mit 34 mM MgCl₂ (pH 7,4)	
PTA	4 g
Magnesiumchloridhexahydrat	691 mg
A. bidest.	ad 100 ml
Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (NaOH) eingestellt.	
SDS-Lösung (10 %)	
SDS	1 g
A. bidest.	ad 10 ml
Sucrose-DOC-NP40-Lysis-Puffer	
Sucrose	10,95 g
NP40	0,5 ml
DOC	0,5 g
A. bidest.	ad 100 ml
TBS (10x, pH 7,6)	
Tris	60,57 g
Natriumchlorid	80 g
A. bidest.	ad 1 l
Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) eingestellt.	
Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt.	
TBS mit 10 % Ziegen Serum und 0,03 % Natriumazid	
Ziegen Serum	10 ml
Natriumazid (30 %)	300 µl
1 x TBS	ad 100 ml
Tris-Puffer	
<i>Tris/HCl 10 mM, pH 7,5</i>	
Tris	1,21 g
A. bidest.	ad 1 l
<i>Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8</i>	

Tris	60,57 g
A. bidest.	ad 1 l
<i>Tris/HCl 1,0 M, pH 7,4</i>	
Tris	121,14 g
A. bidest.	ad 1 l
<i>Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8</i>	
Tris	181,71 g
A. bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wurde jeweils mit Salzsäure (HCl) eingestellt.

Thyroglobulin

Thyroglobulin	50 mg
A. bidest.	ad 10 ml

9.1.5 Chemikalien

Acrylamid – Stammlösung (30 %) mit Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure 98 – 100 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Riedel de Häen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CDP – Star	Tropix, Perkin Elmer, Foster City, USA
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid (CO ₂)	Fa. Linde, Höllriegelskreuth
Desoxycholat (DOC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dinatriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, 100 %, p.a. (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Formalin, 37 %	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol p.a. (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kalium-Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung, isotonisch (0,9 %)	Braun, Melsungen
Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Magnesiumchloridhexahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mercapthoethanol	Merck, Darmstadt
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Iodat	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N-Lauryl-Sarkosin (Sarkosyl)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphorwolframsäure (PTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Merck, Darmstadt
Salzsäure konz. (32 %) (HCl)	Riedel de Häen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Tetenal Röntgenliquid	Tetenal, Norderstedt
Tetenal Röntgensuperfix	Tetenal, Norderstedt
Thyroglobulin	Sigma, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Invitrogen, Karlsruhe
Vector-VIP Substrate Kit for Peroxidase (VIP)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain ABC Kit Elite Standard (ABC)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	INNT, FLI
Zitronensäure-Monohydrat	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zuchtfutterpellets M-Z	Ssniff, Soest

9.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterial

Abzugstisch (TAZ 19)	Medite, Burgdorf
Blotting-Apparatur Trans-Blot, Semi Dry	BioRad, München
Coverplates®	Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
DAKO-Pen	Dako, Glostrup, Dänemark

Einbettautomat EG 1140H	Leica, Wetzlar
Einbettkassetten, Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Einwegkanülen (18G, 20G, 23G)	Terumo, Leuven, Belgien
Elektrophoreseapparatur, Mini Protean II	BioRad, München
Entwässerungsautomat ASP 300	Leica, Wetzlar
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Glaskästen mit Färbegestell für Histologie	Roth, Karlsruhe
Hybaid Ribolyser	Hybaid, Teddington, England
Immobilon-P Transfermembran	Millipore, Bedford, USA
Lichtmikroskop Axiostar	Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena
Lichtmikroskop Axioskop 2 plus	Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena
Magnetrührer mit Heizung CB162, Stuart	VWR, Darmstadt
Metalleinbettschälchen	Medite, Burgdorf
Mikrotomklingen S 35	Produkte für die Medizin AG, Köln
Netzteil, Power Pac (200 V, 300 V)	BioRad, München
Objektträger (Super Frost, Super Frost Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen normal (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rotationsmikrotom RM 2145	Leica, Wetzlar
Schnellkochtopf Sicomatic L	Silit, Sindelfingen
Skalpellklingen	Tierärztebedarf Lenecke, Schortens
Software Quantity One	BioRad, München
Sterilbank (LaminAir 1.8)	Heto-Holten, Alleröd, Dänemark
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage (EW 150-JM)	Kern, Balingen-Frommern
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge (Optima L-90K)	Beckman, Stuttgart
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, Stuttgart
Ultraschallgerät Bandelin sonoplus HD 200	Bandelin Electronic, Berlin
Versa Doc 5000, Imaging System	BioRad, München
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wägeschalen	Merck, Darmstadt
Wärmeschrank (T6030)	Heraeus, Hanau
Wasserbad HI 1210	Leica, Wetzlar
Whatman-Chromatographiepapier	Whatman, England, Maldstone

9.2 Histologische Methoden

Entwässerungsautomat, Standardprotokoll

Formalin	30 Minuten	37°C
Alkohol 70%	1 Stunde	37°C
Alkohol 80%	1 Stunde	37°C
Alkohol 96% I	1 Stunde	37°C
Alkohol 96% II	1 Stunde	37°C
Isopropanol I	1 Stunde	37°C
Isopropanol II	1 Stunde	37°C
Xylol I	1 Stunde	37°C
Xylol II	1 Stunde	37°C
Paraffin I	1 Stunde	60°C
Paraffin II	1 Stunde	60°C
Paraffin III	1 Stunde	60°C

Entparaffinierung und Rehydrierung

Xylol I		3 Minuten
Xylol II		3 Minuten
Ethanol I	100 %	3 Minuten
Ethanol II	100 %	3 Minuten
Ethanol	96 %	2 Minuten
Ethanol	70 %	2 Minuten

Bei der H.-E.-Färbung wurden die Schnitte 5 Minuten im Xylol inkubiert.

Aufsteigende Alkoholreihe

Ethanol I	96 %	2 Minuten
Ethanol II	96 %	2 Minuten
Ethanol I	100 %	2 Minuten
Ethanol II	100 %	2 Minuten
Xylol I		2 Minuten
Xylol II		3 Minuten

Bei der H.-E.-Färbung wurden die Schnitte im Ethanol nur jeweils 30 Sekunden inkubiert, um eine zu starke Entfärbung der Schnitte zu vermeiden.

9.3 Ergebnistabellen

Tab. 9.3.1: Vergleich der klassischen Scrapieisolate und der BSE-Isolate nach den Glykosylierungsverhältnissen, der Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande und nach dem Antikörperbindungsverhältnis (FLI-Test)

	Glykosylierungsverhältnisse (%)						MM (kDa)		AKBV
	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW
	di.		mono.		non.		non.		
BSE	51,3	0,7	32,6	0,4	16,1	0,4	17,5	0,1	0,09
BSE-Pool	55,4	1,2	29,5	0,5	15,2	0,7	-	-	-
ovine BSE	55,0	1,1	32,0	0,9	13,0	0,9	17,4	0,2	0,20
S 33/02	43,2	0,8	35,6	0,5	21,1	0,6	18,1	0,1	1,54
S 3/02	44,2	1,0	32,3	0,2	23,6	1,0	18,2	0,1	0,81
S 5/02	45,1	0,9	34,6	0,5	20,4	0,7	17,9	0,2	0,42
S 7/02	44,8	1,8	32,9	0,7	22,3	1,3	18,3	0,3	1,39
S 12/02	47,3	0,6	35,0	0,7	17,8	0,5	18,1	0,1	1,51
S 17/02	40,9	0,9	35,8	0,8	23,3	0,7	18,8	0,2	1,92
S 21/02	47,5	2,5	35,0	1,3	17,5	1,3	18,3	0,3	1,96
S 23/02	-	-	-	-	-	-	19,2	0,0	3,27
S 29/02	47,2	1,9	35,0	0,4	17,8	1,5	18,8	0,1	1,55
S 32/02	50,6	3,1	33,4	1,5	16,1	2,9	18,1	0,4	1,82
S 6/03	41,0	1,2	35,4	0,7	23,6	1,1	18,1	0,3	1,10
S 15/03	45,4	1,8	34,3	0,7	20,3	1,3	18,1	0,2	1,23
S 17/03	47,2	0,7	35,2	0,4	17,6	0,6	18,4	0,0	1,60
S 18/03	-	-	-	-	-	-	17,9	0,2	1,80
S 20/03	47,2	1,4	33,1	0,5	19,8	1,0	17,9	0,2	1,43
S 24/03	41,2	1,2	37,3	0,8	21,5	1,4	18,0	0,2	1,11
S 27/03	45,3	2,2	36,5	2,4	18,2	0,5	17,9	0,3	1,56
S 28/03	42,5	1,3	34,3	0,9	23,2	0,9	17,8	0,2	1,05
S 33/03	45,4	1,0	34,8	0,6	19,9	0,8	18,5	0,1	1,28
S 11/04	41,8	0,1	34,7	0,6	23,6	0,7	18,2	0,5	0,91
S 12/04	40,6	0,9	34,2	0,8	25,3	0,1	18,1	0,3	0,92
S 13/04	42,9	0,1	37,1	1,1	20,1	0,9	17,8	0,1	0,93
S 14/04	38,5	1,4	34,5	0,7	27,0	1,9	17,9	0,4	1,28
S 17/04	42,4	1,4	32,9	1,4	24,8	0,1	18,4	0,3	1,17
S 29/04	40,6	0,9	36,6	0,8	22,8	0,8	17,9	0,1	0,98
S 44/04	45,2	1,3	34,7	1,1	20,1	0,4	18,2	0,1	1,51
S 45/04	46,3	0,3	33,5	2,3	20,3	2,7	18,0	0,2	2,40
S 46/04	43,9	0,6	36,1	0,6	20,0	0,3	17,9	0,2	1,48
S 47/04	38,7	0,1	34,5	0,4	26,9	0,6	18,3	0,4	1,11
S 52/04	43,2	0,9	34,8	0,6	22,0	1,0	18,0	0,0	0,88
S 60/04	44,2	0,6	35,0	0,7	20,7	1,2	18,1	0,2	1,24

S 77/04	43,9	1,0	33,9	0,8	22,2	0,9	18,0	0,2	1,46
S 82/04	38,4	1,1	35,7	1,0	26,0	0,0	18,0	0,3	1,14
S 86/04	46,9	0,1	34,4	0,8	18,8	0,9	18,5	0,4	1,37
S 104/04	-	-	-	-	-	-	19,3	0,0	1,70
S 107/04	43,4	0,8	35,2	1,3	21,5	0,8	17,9	0,3	1,21

MM	Molekularmasse
AKBV	Antikörperbindungsverhältnis MAK P4/ MAK L42
MW	Mittelwert
S.E.M.	Standardfehler
di.	diglykosylierte PrP ^{Sc} -Bande
mono.	monoglykosylierte PrP ^{Sc} -Bande
non.	unglykosylierte PrP ^{Sc} -Bande

Tab. 9.3.2: Inkubationszeiten, Übertragungsraten und mittlere Lebensdauer bei den Kontrolltieren

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL (%)	IZ KL (d) (S.E.M.)	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} + (%)	IZ PrP ^{Sc} + (d) (S.E.M.)	MLD (d) (S.E.M.)
BSE Höxter	RIII	21	15	71,4	545,2 (19,5)	17	81,0	542,5 (27,4)	536,2 (18,9)
	VM95	21	16	76,2	548,8 (23,0)	7	33,3	628,7 (20,1)	529,8 (25,9)
	C57Bl6	19	14	73,7	635,1 (30,4)	8	42,1	614,3 (31,1)	591,1 (36,6)
	Tgshp XI(1)	6	6	100,0	330,8 (8,1)	6	100,0	330,8 (8,1)	330,8 (8,1)
BBP12/92	Tgshp XI	10	8	80,0	330,5 (8,8)	8	80,0	330,5 (8,8)	330,5 (8,8)
BBP12/92	Tgshp IX(2)	7	7	100,0	228,9 (2,5)	7	100,0	228,9 (2,5)	228,9 (2,5)
Chandler	Tgshp XI(3)	6	6	100,0	254,0 (4,9)	6	100,0	254,0 (4,9)	254,0 (4,9)
BSE Schaf	Tgshp XI	7	6	85,7	298,8 (8,2)	7	100,0	295,0 (4,8)	295,0 (4,8)
NaCl	RIII	9	0	0	-	-	-	-	688,1 (62,7)
	VM95	9	0	0	-	-	-	-	705,0 (52,6)
	C57Bl6	7	0	0	-	-	-	-	588,0 (32,8)
	Tgshp XI	10	0	0	-	-	-	-	487,8 (47,6)
Neg Schaf	RIII	9	0	0	-	-	-	-	627,9 (42,8)
	VM95	10	0	0	-	-	-	-	669,0 (23,0)
	C57Bl6	9	0	0	-	-	-	-	659,3 (25,8)
	Tgshp XI	9	0	0	-	-	-	-	501,8 (28,5)

(1) Subpassage aus BSE Höxter in C57Bl6 (2) Subpassage aus BBP12/92 in Tgshp IX (3) Subpassage aus Chandler in C57Bl6

Legende zu Tabelle 9.3.2 bis 9.3.4:

ÜR KL Übertragungsraten aller aufgrund klinischer Symptome getöteten Mäuse in Prozent

IZ KL Inkubationszeit aller aufgrund klinischer Symptome getöteten Mäuse in Tagen

PrP^{Sc} + Anzahl der Mäuse mit positivem PrP^{Sc}-Nachweis

IZ PrP^{Sc} + Inkubationszeit aller PrP^{Sc}-positiven Mäuse in Tagen

ÜR PrP^{Sc} + Übertragungsraten aller PrP^{Sc}-positiven Mäuse in Prozent

MLD Mittlere Lebensdauer aller infizierten Mäuse in Tagen

Bei den Inkubationszeiten und der mittleren Lebensdauer ist in Klammern der Standardfehler angegeben.

Tab. 9.3.3: Inkubationszeiten, Übertragungsraten und mittlere Lebensdauer bei den mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Mauslinien

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL (%)	IZ KL (d) (S.E.M.)	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} + (%)	IZ PrP ^{Sc} + (d) (S.E.M.)	MLD (d) (S.E.M.)
S 3/02	RIII	20	18	90,0	427,7 (4,6)	20	100,0	430,3 (4,6)	430,3 (4,6)
	VM95	18	12	66,7	514,3 (5,4)	18	100,0	516,4 (5,2)	516,4 (5,2)
	C57Bl6	18	17	94,4	426,2 (4,6)	18	100,0	425,4 (4,3)	425,4 (4,3)
S 5/02	Tgshp XI	14	12	85,7	154,7 (6,3)	13	92,9	151,9 (6,4)	151,1 (6,0)
	RIII	14	14	100,0	447,9 (21,3)	13	92,9	464,9 (13,8)	414,1 (37,5)
	VM95	14	13	92,9	506,2 (10,8)	13	92,9	506,2 (10,8)	500,6 (11,5)
S 13/02	Tgshp XI	14	14	100,0	198,2 (9,9)	11	78,6	181,9 (6,0)	198,2 (9,9)
	RIII	15	14	93,3	300,2 (7,8)	15	100,0	299,5 (7,3)	299,5 (7,3)
	VM95	15	13	86,7	388,1 (23,7)	13	86,7	391,5 (22,9)	375,3 (22,9)
S 17/02	Tgshp XI	13	11	84,6	321,6 (15,4)	13	100,0	315,4 (15,4)	315,4 (15,4)
	RIII	14	13	92,9	416,8 (13,9)	11	78,6	434,5 (8,3)	409,1 (15,0)
	VM95	16	16	100,0	506,6 (24,7)	12	75,0	537,4 (12,2)	506,6 (24,7)
	C57Bl6	14	14	100,0	446,1 (3,0)	14	100,0	446,1 (3,0)	446,1 (3,0)
S 29/02	Tgshp XI	14	13	92,9	308,8 (22,4)	10	71,4	339,0 (18,8)	301,0 (22,1)
	RIII	16	16	100,0	429,1 (7,5)	16	100,0	429,1 (7,5)	429,1 (7,5)
	VM95	15	14	93,3	469,3 (5,7)	15	100,0	470,9 (5,5)	470,9 (5,5)
S 30/02	Tgshp XI	14	12	85,7	336,7 (40,6)	5	35,7	500,0 (32,0)	328,9 (37,8)
	RIII	15	13	86,7	503,5 (16,2)	9	60,0	504,6 (18,0)	480,8 (22,5)
	VM95	15	13	86,7	598,7 (12,9)	7	46,7	603,9 (21,1)	577,4 (22,2)
	C57Bl6	13	10	76,9	508,6 (26,6)	7	53,8	612,1 (13,0)	536,2 (25,1)

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL	IZ KL	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} +	IZ PrP ^{Sc} +	MLD
				(%)	(d) (S.E.M.)		(%)	(d) (S.E.M.)	(d) (S.E.M.)
S 32/02	Tgshp XI	13	13	100,0	249,5 (20,5)	12	92,3	245,2 (21,7)	249,5 (20,5)
	RIII	15	15	100,0	412,3 (8,4)	15	100,0	412,3 (8,4)	412,3 (8,4)
	VM95	15	13	86,7	523,5 (18,4)	15	100,0	523,1 (18,6)	523,1 (18,6)
S 33/02	Tgshp XI	15	15	100,0	181,0 (6,1)	15	100,0	181,0 (6,1)	181,0 (6,1)
	RIII	11	10	90,9	400,4 (6,0)	11	100,0	397,9 (6,0)	397,9 (6,0)
	VM95	15	15	100,0	452,7 (22,7)	14	93,3	463,9 (21,2)	452,7 (22,7)

Tab. 9.3.4: Inkubationszeiten, Übertragungsraten und mittlere Lebensdauer bei den mit atypischen Scrapieisolaten infizierten Mauslinien

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL	IZ KL	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} +	IZ PrP ^{Sc} +	MLD
				(%)	(d) (S.E.M.)		(%)	(d) (S.E.M.)	(d) (S.E.M.)
S 10/02	Tgshp XI	14	13	92,9	300,8 (19,9)	5	35,7	352,0 (22,4)	289,6 (21,6)
	RIII	15	15	100,0	514,5 (23,0)	0	0	-	514,5 (23,0)
	VM95	13	7	53,8	483,0 (26,4)	0	0	-	490,8 (22,6)
	C57Bl6	15	4	26,7	612,5 (46,2)	0	0	-	654,1 (21,4)
S 15/02	Tgshp XI	10	9	90,0	337,1 (52,6)	7	70,0	315,9 (53,5)	318,5 (50,6)
	RIII	6	6	100	392,3 (11,4)	0	0	-	392,3 (11,4)
	VM95	10	7	70,0	486,4 (24,3)	0	0	-	522,8 (35,3)
	C57Bl6	10	4	40,0	557,8 (60,0)	0	0	-	632,6 (33,7)

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL (%)	IZ KL (d) (S.E.M.)	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} + (%)	IZ PrP ^{Sc} + (d) (S.E.M.)	MLD (d) (S.E.M.)
S 18/02	Tgshp XI	13	12	92,3	285,2 (22,7)	8	61,5	290,5 (34,7)	296,1 (23,6)
	RIII	15	11	73,3	507,1 (24,3)	0	0	-	525,3 (23,7)
	VM95	14	12	85,7	529,1 (7,7)	0	0	-	495,1 (24,0)
S 25/02	C57Bl6	14	0	0,0	-	0	0	-	672,8 (38,5)
	Tgshp XI	9	9	100,0	332,4 (30,4)	5	55,6	283,0 (10,9)	332,4 (30,4)
	RIII	14	13	92,9	385,4 (15,7)	0	0	-	381,2 (14,6)
S 36/02	VM95	14	14	100,0	501,6 (18,5)	0	0	-	501,6 (18,5)
	C57Bl6	12	8	66,7	540,0 (34,3)	0	0	-	496,3 (47,2)
	Tgshp XI	12	11	91,7	340,9 (39,6)	5	41,7	421,6 (13,3)	344,2 (36,3)
S 37/02	RIII	13	7	53,8	557,7 (43,1)	0	0	-	524,2 (38,7)
	VM95	15	13	86,7	561,8 (10,7)	0	0	-	546,3 (21,6)
	C57Bl6	15	3	20,0	560,7 (84,9)	0	0	-	683,7 (23,7)
S 38/02	Tgshp XI	15	15	100,0	304,8 (22,0)	10	66,7	346,1 (23,5)	304,8 (22,0)
	RIII	15	15	100,0	553,7 (31,7)	0	0	-	553,7 (31,7)
	VM95	14	13	92,9	600,7 (6,8)	0	0	-	597,4 (7,1)
S 38/02	C57Bl6	14	3	21,4	568,3 (149,7)	0	0	-	654,1 (34,9)
	Tgshp XI	15	15	100,0	346,9 (19,9)	12	80,0	322,8 (19,0)	346,9 (19,9)
	RIII	15	9	60,0	545,7 (17,3)	0	0	-	547,5 (32,7)
S 38/02	VM95	15	14	93,9	565,4 (22,3)	0	0	-	558,1 (22,0)
	C57Bl6	15	14	93,9	614,5 (29,3)	0	0	-	617,5 (27,4)

Isolat	Mauslinie	Anzahl	GT, KL	ÜR KL (%)	IZ KL (d) (S.E.M.)	PrP ^{Sc} +	ÜR PrP ^{Sc} + (%)	IZ PrP ^{Sc} + (d) (S.E.M.)	MLD (d) (S.E.M.)
S 39/02	Tgshp XI	13	10	76,9	259,8 (31,3)	9	69,2	265,7 (31,7)	252,3 (27,3)
	RIII	15	6	40,0	658,8 (22,4)	0	0	-	587,9 (38,9)
	VM95	14	10	71,4	659,0 (18,3)	0	0	-	655,1 (15,3)
	C57Bl6	15	3	20,0	503,0 (122,0)	0	0	-	648,5 (32,1)
S 40/02	Tgshp XI	10	10	100,0	362,4 (23,2)	7	70,0	377,7 (22,6)	362,4 (23,2)
	RIII	-	-	-	-	-	-	-	-
	VM95	15	12	80,0	511,8 (32,3)	0	0	-	518,3 (28,8)
	C57Bl6	10	8	80,0	519,9 (36,1)	0	0	-	476,5 (40,6)
S 14/03	Tgshp XI	15	15	100,0	291,7 (35,4)	9	60,0	302,8 (49,4)	291,7 (35,4)
	RIII	14	5	35,7	422,4 (0,9)	0	0	-	535,6 (38,5)
	VM95	15	14	93,3	576,6 (27,2)	0	0	-	551,6 (35,6)
	C57Bl6	15	3	20,0	382,3 (43,7)	0	0	-	581,9 (43,8)
S 26/03	Tgshp XI	15	12	80,0	310,7 (36,7)	10	66,7	333,6 (26,4)	353,1 (38,7)
	RIII	15	9	60,0	354,3 (39,8)	0	0	-	429,1 (47,3)
	VM95	15	2	20,0	542,7 (5,3)	0	0	-	588,9 (27,9)
	C57Bl6	15	0	0,0	-	0	0	-	643,3 (7,9)

Tab. 9.3.5: Glykosylierungsverhältnisse der di-, mono- und unglykosylierten Bande des PrP^{Sc}, Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande, Langzeit-PK-Verdau und Antikörperbindungsverhalten bei den mit BSE und verschiedenen Scrapieisolaten inokulierten RIIII-Mäusen

Isolat	Glykosylierungsverhältnisse (%)			Molekular- masse (kDa)	Langzeit-PK-Verdau				Antikörperbindungsverhalten			
	di.	mono.	un.		1 h	6 h	24 h	48 h	Ra10	SAF 32	3B5	
BSE	52,6 (2,6)	31,7 (1,2)	15,7 (1,4)	18,5 (0,1)	100	72,7 (1,7)	33,3 (2,7)	10,8 (2,2)	+	-	-	
S 3/02	41,5 (1,0)	35,8 (0,4)	22,7 (0,8)	18,8 (0,0)	100	92,9 (2,2)	87,2 (2,4)	78,6 (4,0)	+	+	+	
S 5/02	46,4 (0,7)	33,5 (0,4)	20,1 (0,4)	18,9 (0,1)	100	96,0 (0,6)	86,6 (0,9)	77,6 (3,3)	+	+	+	
S 13/02	42,5 (0,8)	36,0 (0,3)	21,5 (0,6)	18,9 (0,1)	100	99,7 (2,3)	95,4 (2,2)	86,1 (2,9)	+	+	+	
S 17/02	44,0 (0,8)	33,8 (0,2)	22,2 (0,9)	19,2 (0,1)	100	95,7 (1,3)	91,8 (0,9)	84,6 (2,5)	+	+	+	
S 29/02	46,0 (1,0)	32,2 (1,1)	21,8 (0,5)	19,2 (0,1)	100	94,3 (1,5)	86,6 (3,1)	67,6 (6,3)	+	+	+	
S 30/02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
S 32/02	41,6 (0,3)	33,5 (0,8)	24,9 (0,5)	18,9 (0,1)	100	95,3 (2,3)	84,8 (2,7)	67,3 (1,2)	+	+	+	
S 33/02	43,1 (0,3)	33,5 (0,3)	23,4 (0,3)	18,9 (0,1)	100	98,3 (0,5)	89,1 (2,6)	73,7 (1,0)	+	+	+	

Tab. 9.3.6: Glykosylierungsverhältnisse der di-, mono- und unglykosylierten Bande des PrP^{Sc}, Molekularmasse der unglykosylierten PrP^{Sc}-Bande, Langzeit-PK-Verdau und Antikörperbindungsverhalten bei den mit BSE und verschiedenen Scrapieisolaten inokulierten Tgshp-XI-Mäusen

Isolat	Glykosylierungsverhältnisse (%)			Molekularmasse (kDa)	Langzeit-PK-Verdau				Antikörperbindungsverhalten		
	di.	mono.	un.		1 h	6 h	24 h	48 h	L42	P4	L42/P4
Chandler	32,0 (0,3)	39,9 (0,3)	28,2 (0,3)	18,7 (0,0)	100	93,4 (2,3)	65,5 (1,8)	25,2 (0,5)	+	+	1,4
BSE Höxter	57,3 (0,9)	28,8 (0,6)	13,9 (0,4)	18,1 (0,1)	100	99,1 (1,9)	90,9 (1,5)	77,8 (3,5)	+	+/-	0,2
BSE BBP12/92 (tgshp IX)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	98,1 (1,5)	86,3 (1,3)	76,9 (1,6)	+	+/-	0,2
BSE BBP12/92 (tgshp XI)	55,3 (0,3)	27,8 (0,3)	16,9 (0,2)	18,3 (0,2)	100	94,5 (0,6)	88,5 (2,1)	77,8 (0,7)	+	+/-	0,2
Ovine BSE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100	91,8*	78,6*	70,9*	+	+/-	0,2
S 5/02	53,1 (0,8)	32,9 (0,8)	14,0 (0,1)	19,3 (0,1)	100	85,5 (3,8)	56,5 (2,5)	15,6 (1,2)	+	+/-	0,3
S 13/02	53,1 (0,6)	32,6 (0,6)	14,3 (0,1)	19,3 (0,2)	100	88,2 (1,9)	57,4 (4,3)	26,6 (3,7)	+	+	1,0
S 17/02	44,7 (1,1)	32,2 (0,9)	23,0 (0,4)	18,6 (0,0)	100	93,8 (1,6)	80,3 (3,1)	67,0 (4,0)	+	+	1,3
S 29/02	45,8 (0,4)	32,9 (0,6)	21,3 (0,3)	18,7 (0,1)	100	92,8 (3,3)	83,1 (3,0)	65,0 (1,3)	+	+	1,2
S 32/02	52,3 (2,8)	31,5 (0,9)	16,1 (2,3)	19,2 (0,2)	100	88,6 (1,6)	57,1 (2,7)	26,5 (1,3)	+	+	0,9
S 33/02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	0,8

* Aus Mangel an Material wurde der Mittelwert für den Langzeit-PK-Verdau bei der ovinen BSE nach nur 2 Gelläufen anstelle von vier Gelläufen ermittelt.

Tab. 9.3.7: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten RHII-Mäusen

Isolat	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	W1	W2	W3
BSE Frauke	1,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	1,0 (0,1)	0,3 (0,1)	0,5 (0,2)	0,9 (0,1)	0,6 (0,2)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	0,2 (0,1)
BSE Anja	1,5 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,1)	0,9 (0,2)	0,2 (0,1)	0,4 (0,2)	1,0 (0,2)	0,5 (0,2)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)
S 3/02	2,0 (0,5)	0,8 (0,5)	0,0 (0,0)	2,3 (0,5)	1,4 (0,4)	1,1 (0,3)	2,3 (0,3)	0,3 (0,2)	1,0 (0,3)	0,4 (0,2)	0,7 (0,2)	0,2 (0,1)
S 5/02	1,9 (0,4)	0,4 (0,2)	0,3 (0,1)	1,8 (0,3)	0,4 (0,2)	0,6 (0,3)	1,3 (0,3)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,1 (0,1)
S 13/02	0,9 (0,3)	0,0 (0,0)	1,8 (0,2)	2,5 (0,2)	2,2 (0,2)	3,5 (0,4)	3,9 (0,3)	1,8 (0,3)	1,8 (0,3)	0,5 (0,2)	0,4 (0,2)	1,5 (0,2)
S 17/02	0,5 (0,2)	0,0 (0,0)	0,5 (0,2)	0,9 (0,2)	0,5 (0,5)	0,5 (0,2)	1,6 (0,3)	0,5 (0,2)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	0,5 (0,2)	0,1 (0,1)
S 29/02	0,8 (0,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,5 (0,4)	0,2 (0,2)	0,6 (0,1)	0,3 (0,2)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,0 (0,0)	0,2 (0,1)	0,0 (0,0)
S 30/02	0,5 (0,3)	0,0 (0,0)	1,0 (0,3)	1,0 (0,4)	0,9 (0,2)	1,4 (0,2)	1,5 (0,4)	0,8 (0,2)	0,5 (0,2)	0,4 (0,2)	0,3 (0,2)	0,4 (0,2)
S 32/02	0,6 (0,3)	0,8 (0,3)	0,1 (0,1)	0,7 (0,2)	1,2 (0,4)	0,2 (0,2)	0,6 (0,2)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,3 (0,1)	0,0 (0,0)
S 33/02	0,7 (0,3)	0,9 (0,3)	0,2 (0,1)	1,8 (0,3)	1,9 (0,5)	1,1 (0,4)	1,3 (0,4)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	0,8 (0,3)	0,0 (0,0)

Tab. 9.3.8: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten VM95-Mäusen

Isolat	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	W1	W2	W3
BSE Frauke	1,4 (0,4)	0,7 (0,2)	0,5 (0,2)	0,5 (0,3)	1,2 (0,2)	0,4 (0,2)	1,2 (0,2)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	0,3 (0,3)	0,2 (0,2)
BSE Anja	1,2 (0,4)	0,5 (0,2)	0,7 (0,2)	0,4 (0,2)	1,0 (0,0)	0,3 (0,2)	1,0 (0,3)	0,5 (0,2)	0,3 (0,2)	0,5 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)
S 3/02	3,0 (0,0)	0,7 (0,2)	2,7 (0,2)	1,0 (0,2)	3,3 (0,5)	3,8 (0,1)	2,6 (0,2)	3,0 (0,0)	2,8 (0,1)	1,1 (0,2)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)
S 5/02	0,7 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	1,1 (0,3)	1,3 (0,3)	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)	0,3 (0,2)	0,2 (0,1)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)
S 13/02	1,2 (0,4)	0,2 (0,1)	0,9 (0,2)	0,6 (0,3)	2,6 (0,5)	1,8 (0,3)	1,4 (0,4)	1,2 (0,3)	1,0 (0,3)	0,1 (0,1)	0,0 (0,1)	0,0 (0,0)
S 17/02	1,3 (0,3)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,4 (0,2)	1,4 (0,3)	1,5 (0,3)	0,3 (0,2)	0,5 (0,2)	0,2 (0,1)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)
S 29/02	0,7 (0,2)	0,1 (0,1)	0,5 (0,2)	0,3 (0,1)	1,7 (0,3)	1,3 (0,3)	0,4 (0,2)	0,7 (0,1)	0,5 (0,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)
S 30/02	0,5 (0,3)	0,0 (0,0)	1,0 (0,0)	0,3 (0,3)	2,5 (0,3)	1,8 (0,3)	0,5 (0,3)	2,0 (0,4)	1,8 (0,5)	0,8 (0,3)	0,3 (0,3)	0,5 (0,3)
S 32/02	1,1 (0,2)	0,1 (0,1)	0,7 (0,3)	0,9 (0,3)	1,7 (0,4)	1,7 (0,4)	0,3 (0,2)	1,0 (0,3)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)
S 33/02	1,0 (0,1)	0,2 (0,2)	0,7 (0,2)	0,5 (0,2)	1,9 (0,4)	1,6 (0,4)	0,7 (0,2)	1,2 (0,2)	0,7 (0,2)	0,1 (0,1)	0,3 (0,1)	0,0 (0,0)

Tab. 9.3.9: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

Isolat	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	W1	W2	W3
BSE	2,2 (0,5)	0,0 (0,0)	0,5 (0,3)	1,6 (0,5)	0,5 (0,3)	0,3 (0,2)	1,0 (0,3)	0,3 (0,2)	0,1 (0,1)	0,8 (0,2)	0,9 (0,1)	0,5 (0,2)
S 5/02	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	1,0 (0,2)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,1 (0,1)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	0,3 (0,2)	0,1 (0,1)	0,2 (0,1)
S 13/02	0,3 (0,2)	0,0 (0,0)	1,5 (0,2)	0,2 (0,1)	1,3 (0,2)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	0,2 (0,1)
S 17/02	0,3 (0,2)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	0,5 (0,4)	0,2 (0,1)	0,3 (0,2)	0,2 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,1)	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)
S 29/02	0,7 (0,2)	0,0 (0,0)	0,8 (0,1)	0,6 (0,2)	2,8 (0,3)	0,4 (0,2)	0,9 (0,3)	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	1,2 (0,2)	0,6 (0,2)	0,9 (0,2)
S 30/02	0,3 (0,3)	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	0,0 (0,0)	0,8 (0,6)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,8 (0,4)	0,6 (0,4)	1,0 (0,0)	0,2 (0,2)	1,2 (0,4)
S 32/02	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,5 (0,2)	0,0 (0,0)	1,3 (0,4)	0,2 (0,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,1)	0,1 (0,1)	0,2 (0,1)	0,5 (0,2)
S 33/02	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	1,4 (0,1)	0,2 (0,1)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,1)	0,6 (0,1)

Tab. 9.3.10: Läsionsprofile von mit atypischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

Isolat	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	W1	W2	W3
S 10/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	1,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
S 15/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,0 (0,4)	0,0 (0,0)	0,5 (0,2)	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)
S 18/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,3 (0,4)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,6 (0,2)	0,3 (0,2)	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)
S 25/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	3,0 (0,5)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,2 (0,2)	0,6 (0,2)	0,2 (0,2)	0,4 (0,2)
S 36/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	3,0 (0,5)	0,0 (0,0)	1,4 (0,2)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	0,8 (0,4)
S 37/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,9 (0,5)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,3 (0,2)	0,5 (0,2)	0,1 (0,1)	0,3 (0,2)
S 38/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,8 (0,4)	0,0 (0,0)	0,8 (0,2)	0,3 (0,1)	0,6 (0,2)	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)
S 39/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,4 (0,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,2 (0,2)	0,3 (0,3)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)
S 40/02	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,8 (0,7)	0,0 (0,0)	0,8 (0,2)	0,4 (0,2)	0,8 (0,2)	0,0 (0,0)	1,0 (0,0)
S 14/03	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,8 (0,6)	0,0 (0,0)	0,7 (0,2)	0,3 (0,2)	0,5 (0,2)	0,0 (0,0)	0,5 (0,2)
S 26/03	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,5 (0,2)	0,0 (0,0)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)

9.4 Bilddokumentation

Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit BSE (BBP12/92) bzw. dem klassischen Scrapieisolat S 3/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.1: Vakuolisierung und Plaques im Corpus callosum einer mit BSE (BBP12/92) infizierten Tgshp-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.2: Granuläre bis plaqueartige PrP^{Sc}-Ablagerungen im Corpus callosum einer mit BSE (BBP12/92) infizierten Tgshp-Maus.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.3: Plaques und Vakuolen im Corpus callosum einer mit BSE (BBP12/92) infizierten Tgshp-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.4: Altersvakuolen in der weißen Substanz vom Kleinhirn einer mit BSE (BBP12/92) infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 310 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

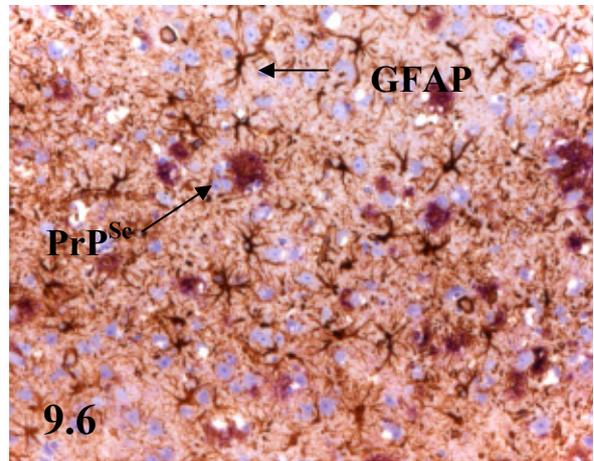
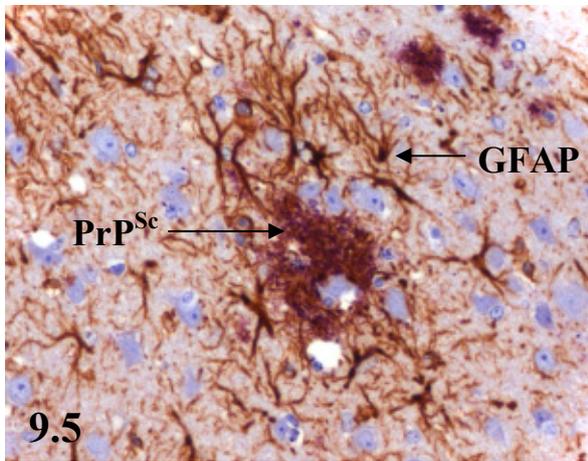
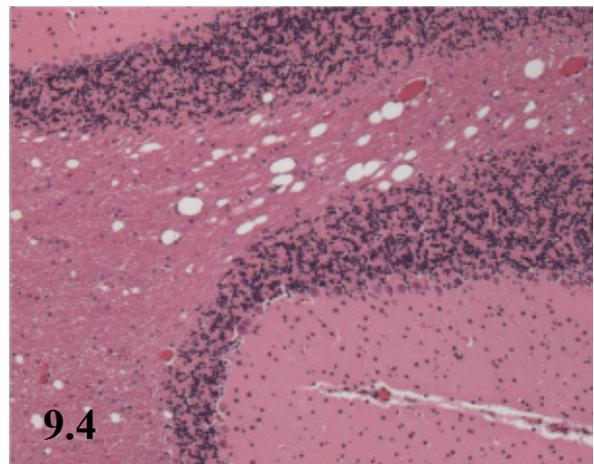
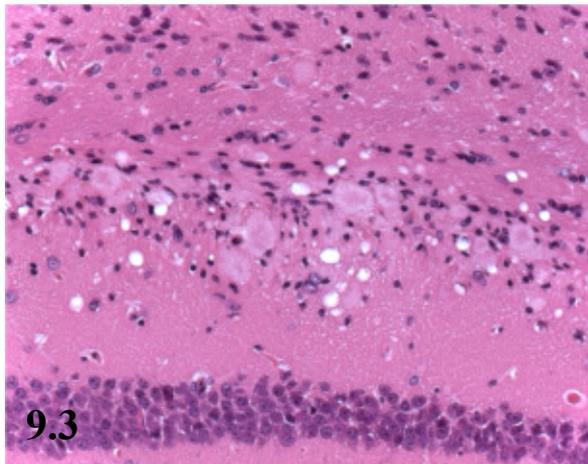
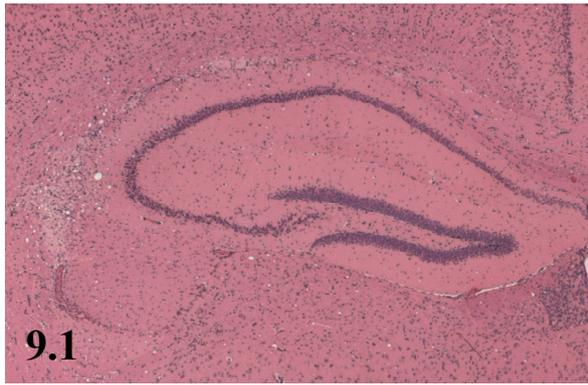
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.5: PrP^{Sc}-Ablagerungen und Gliose (Pfeile) im Cortex (Endhirn) einer mit S 3/02 infizierten VM95-Maus.

Immunhistologische Doppelmarkierung, PrP^{Sc} (MAK 14D11, Chromogen VIP, violett) und GFAP (Chromogen DAB, braun), Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.6: PrP^{Sc}-Ablagerungen und Gliose (Pfeile) im Mittelhirn einer mit S 3/02 infizierten VM95-Maus.

Immunhistologische Doppelmarkierung, PrP^{Sc} (MAK 14D11, Chromogen VIP, violett) und GFAP (Chromogen DAB, braun), Gerätevergrößerung 62,5x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit den klassischen Scrapieisolaten S 3/02 bzw. S 5/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.7: Vakuolisierung im Hypothalamus einer mit S 3/02 infizierten RIII-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.8: PrP^{Sc}-Ablagerungen im Hypothalamus einer mit S 5/02 infizierten RIII-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.9: Hochgradige Vakuolisierung im Gyrus dentatus einer mit S 5/02 infizierten RIII-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

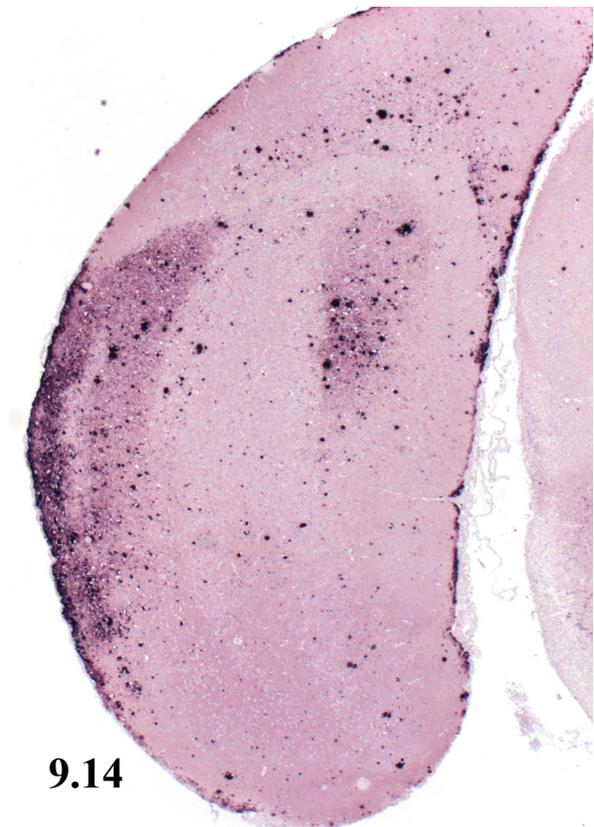
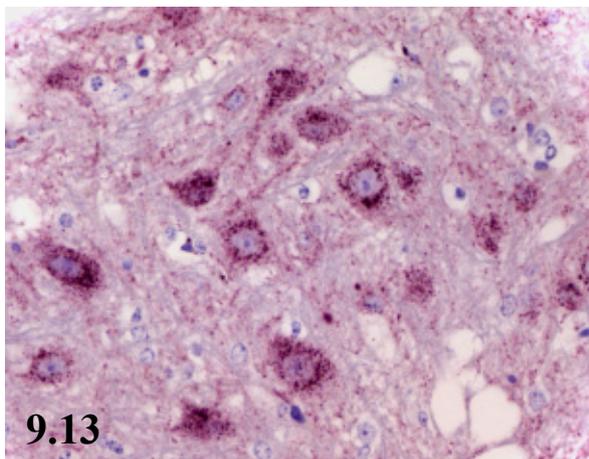
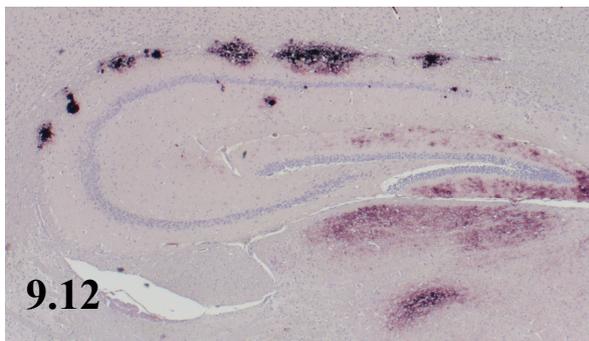
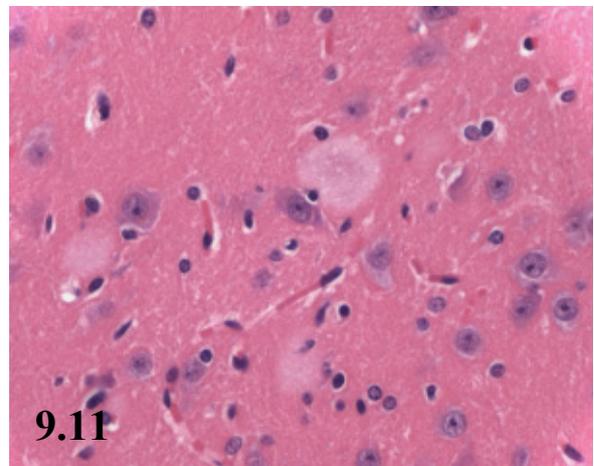
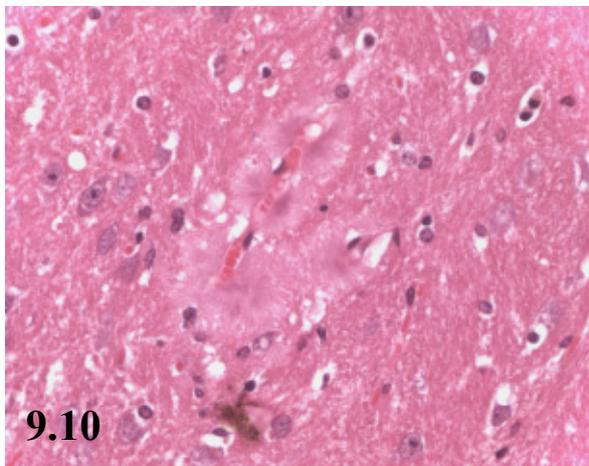
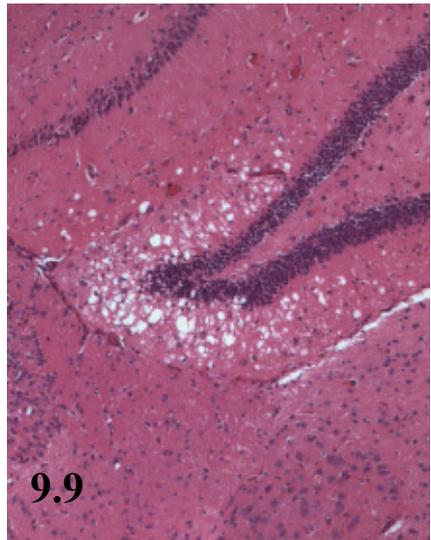
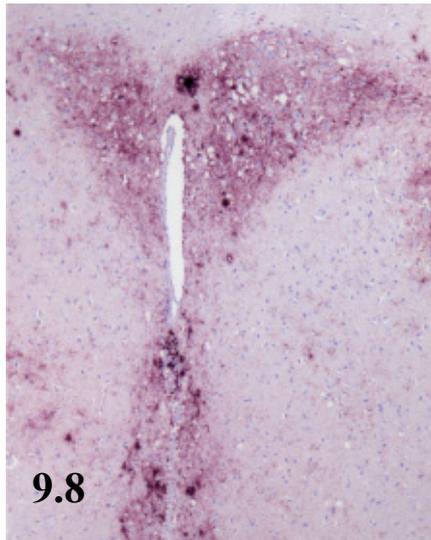
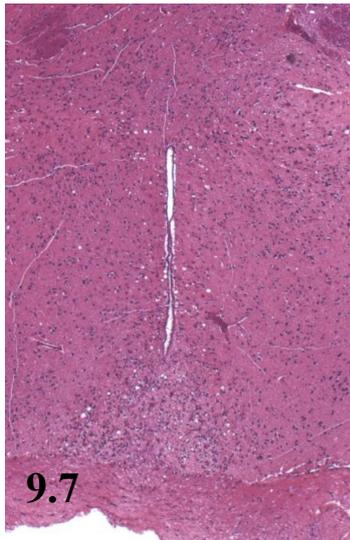
Abb. 9.10: Klassische Plaques im Thalamus einer mit S 3/02 infizierten RIII-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.11: Einfache Plaques im lateralen Thalamus einer mit S 5/02 infizierten VM95-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.12: Granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gyrus dentatus und Plaques im Corpus callosum einer mit S 3/02 infizierten RIII-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.13: PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nervenzellen der Kleinhirnkerne einer mit S 5/02 infizierten Tgshp-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.14: PrP^{Sc}-Ablagerungsmuster in Form kleiner Plaques im Cortex einer mit S 5/02 infizierten VM95-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit den klassischen Scrapieisolaten S 13/02 bzw. S 17/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.15: Status spongiosus (1a) und korrelierende granuläre PrP^{Sc}-Ablagerung (1b) im Thalamus einer mit S 17/02 infizierten RIII-Maus.

Abb. 9.15a: H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.15b: Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.16: PrP^{Sc}-Ablagerungen und Gliose (Pfeile) im Mittelhirn einer mit S 17/02 infizierten VM95-Maus.

Immunhistologische Doppelmarkierung, PrP^{Sc} (MAK 14D11, Chromogen VIP, violett) und GFAP (Chromogen DAB, braun), Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.17: Einfaches Plaque im lateralen Thalamus einer mit S 17/02 infizierten VM95-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.18: PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nervenzellen der Medulla einer mit S 13/02 infizierten Tgshp-Maus.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.19: Einfache Plaques (Pfeile) in der Granularzellschicht des Ammonshorns (Hippocampus) einer mit S 17/02 infizierten VM95-Maus.

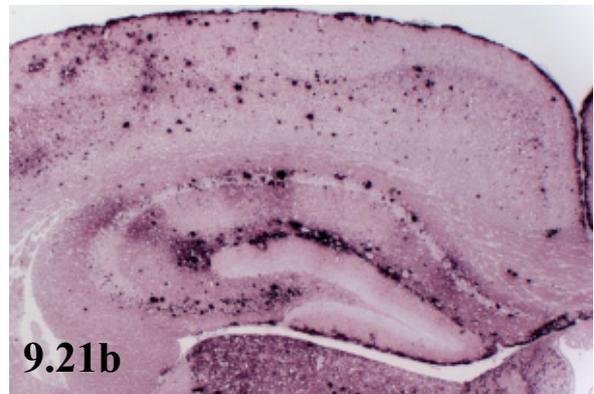
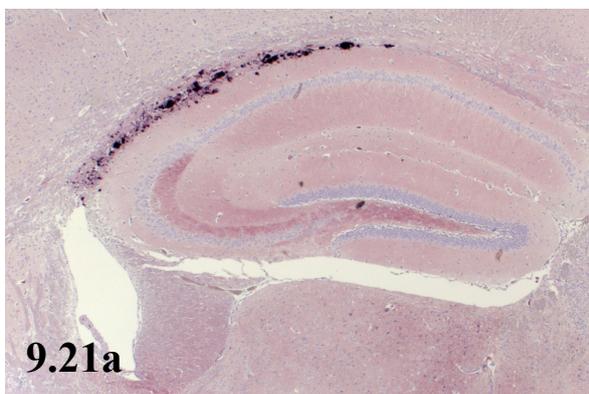
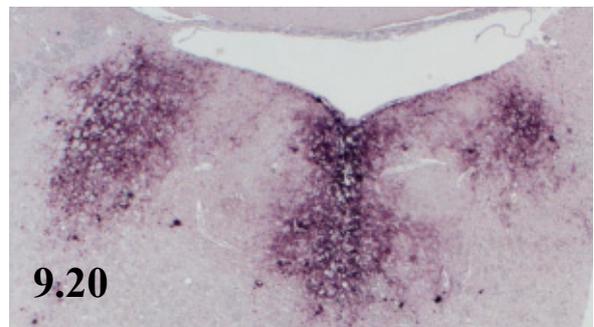
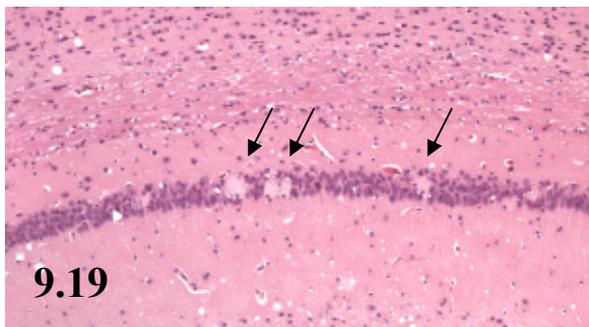
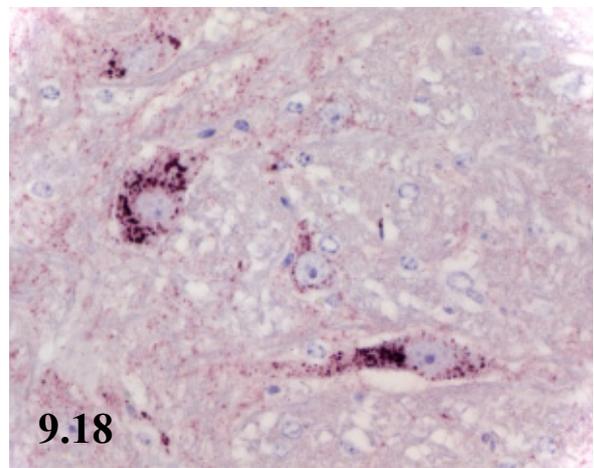
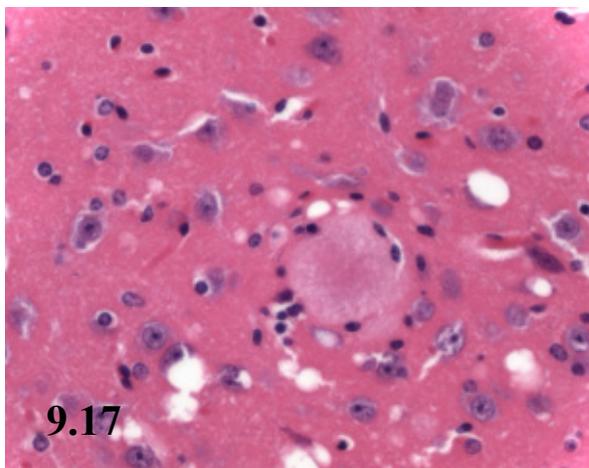
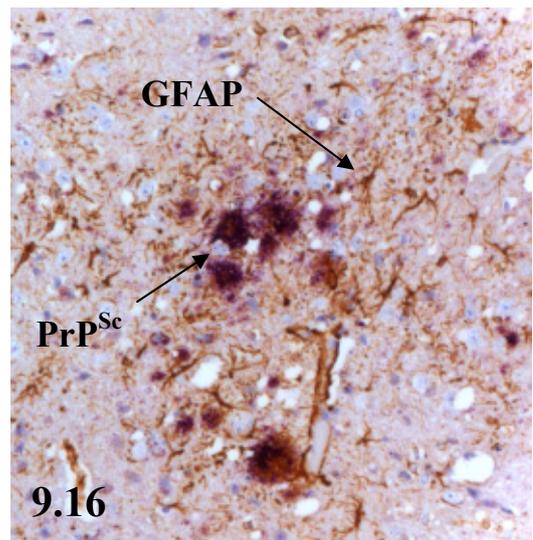
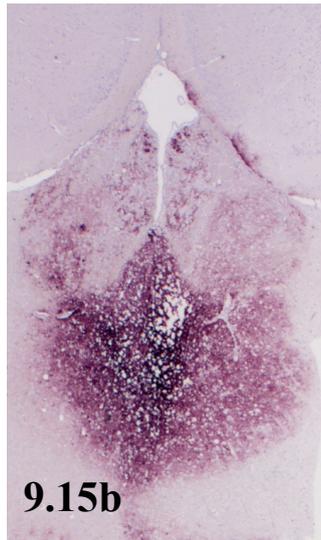
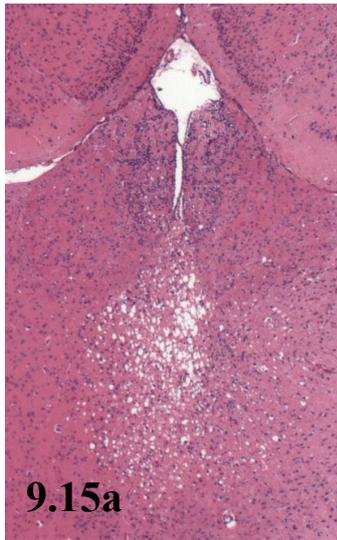
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.20: Granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nuclei vestibulares und Nuclei tegmenti sowie in der Raphe der Medulla einer mit S 17/02 infizierten VM95-Maus.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.21: Unterschiede in der PrP^{Sc}-Ablagerung bei einer mit S 13/02 infizierten Tgshp-Maus (9.21a) und einer VM95-Maus (9.21b). Bei der Tgshp-Maus sind im Corpus callosum zahlreiche Plaques vorhanden, in den umgebenden Gehirnregionen ist jedoch keine oder nur eine geringe PrP^{Sc}-Ablagerung nachweisbar. Im Gegensatz dazu prägen über alle Gehirnregionen verteilte granuläre PrP^{Sc}-Ablagerungen und PrP^{Sc}-Ablagerungen in Form kleiner Plaques das immunhistologische Bild bei den infizierten VM95-Mäusen.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit dem klassischen Scrapieisolat S 29/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.22: Multizentrische Plaques im Thalamus einer mit S 29/02 infizierten Tgshp-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

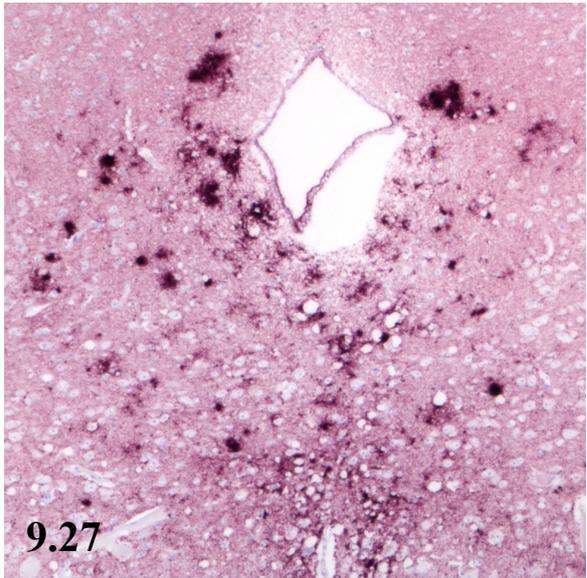
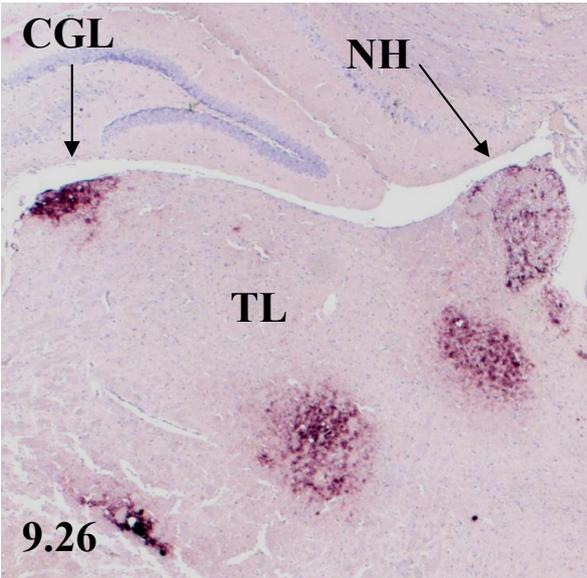
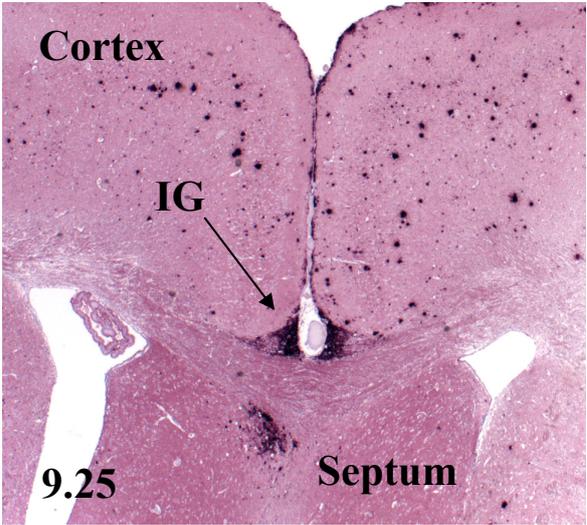
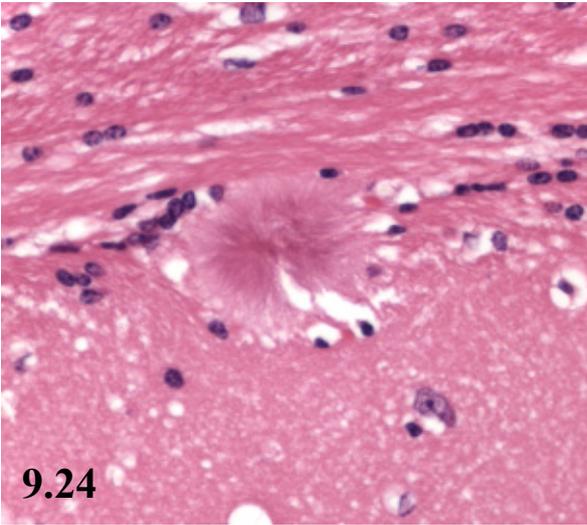
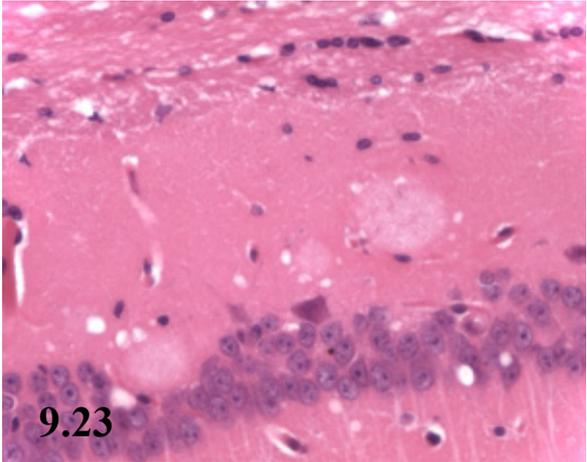
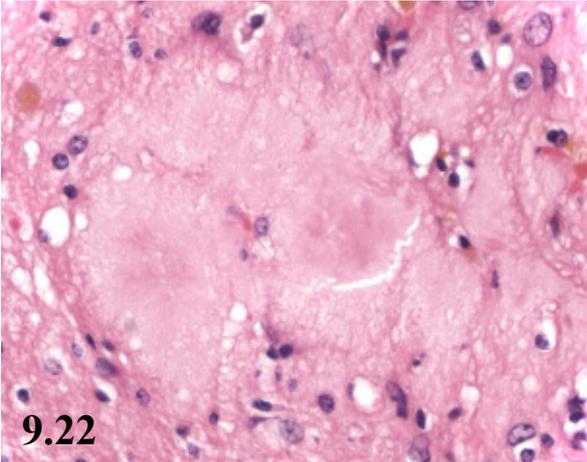
Abb. 9.23: Einfache Plaques in der Granularzellschicht und Molekularschicht des Ammons-
horns (Hippocampus) einer mit S 29/02 infizierten VM95-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.24: Klassisches Plaque im Corpus callosum einer mit S 29/02 infizierten Tgshp-Maus.
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.25: PrP^{Sc}-Ablagerungen im Cortex, im Indusium griseum (IG) und im dorsalen Sep-
tum einer mit S 29/02 infizierten VM95-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.26: Lokale PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nuclei habenulares (NH), im Corpus genicula-
tum laterale (CGL) und in verschiedenen Kerngebieten des lateralen Thalamus (TL) einer mit
S 29/02 infizierten RIII-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.27: Granuläre bis plaqueartige PrP^{Sc}-Ablagerungen ventral des Aquaeductus im Mit-
telhirn einer mit S 29/02 infizierten Tgshp-Maus.
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 31,25x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit den klassischen Scrapieisolaten S 32/02 bzw. S 33/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.28: Vakuolisierung in den Nuclei tegmenti und Nuclei vestibulares bei einer mit S 32/02 infizierten RIII-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.29: Einfache Plaques und Vakuolisierung ventral des Hippocampus im lateralen Thalamus einer mit S 32/02 infizierten VM95-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.30: Einfaches Plaque im Thalamus einer mit S 32/02 infizierten VM95-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.31: Vakuolisierung der Granularzellschicht vom Kleinhirn bei einer mit S 33/02 infizierten RIII-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.32: Herdförmige Ansammlung plaqueartiger Ablagerungen und Vakuolen im Corpus callosum und Übergriff dieser pathologischen Veränderungen auf den Hippocampus bei einer mit S 33/02 infizierten RIII-Maus.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.33: Klassische Plaques im Corpus callosum einer mit S 33/02 infizierten VM95-Maus.

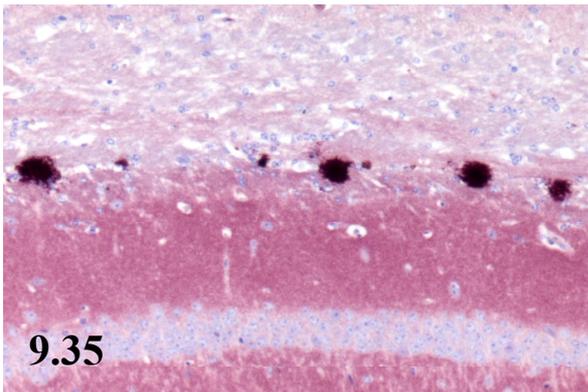
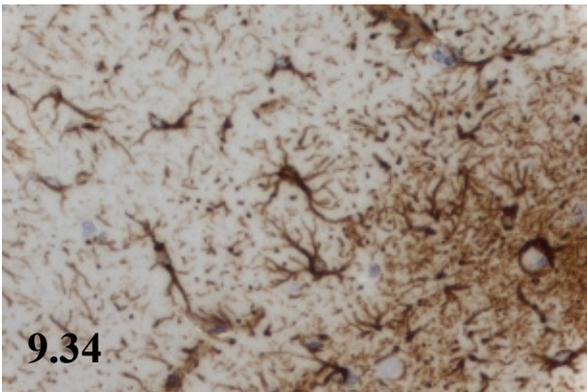
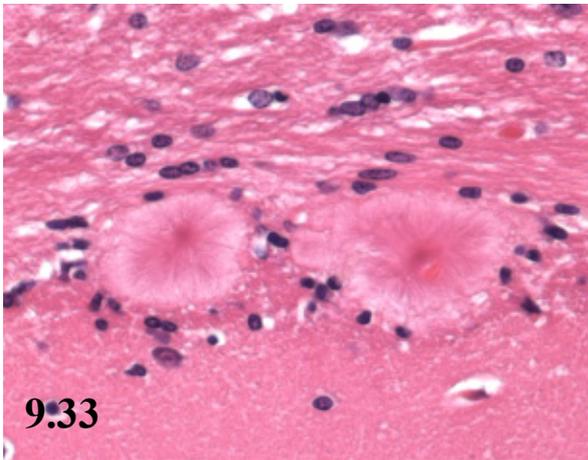
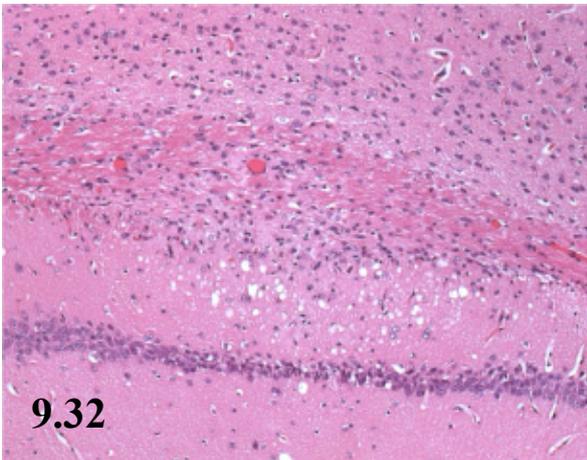
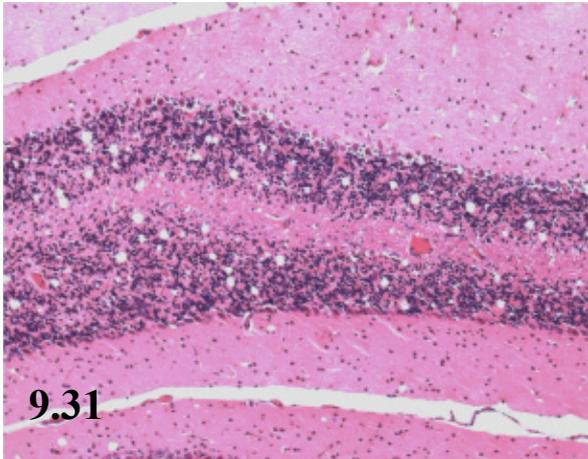
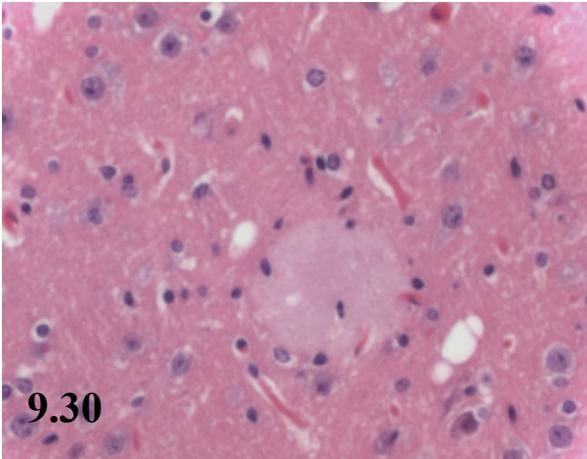
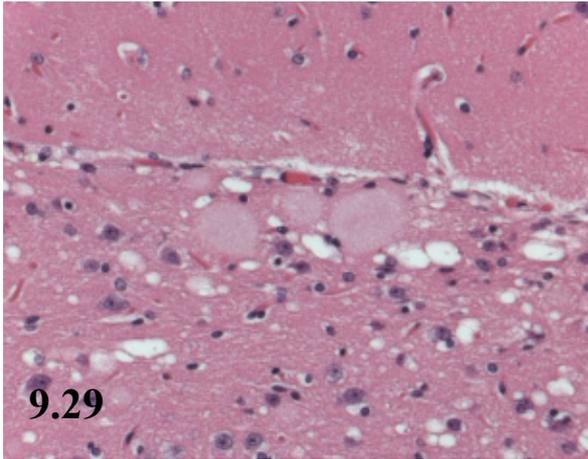
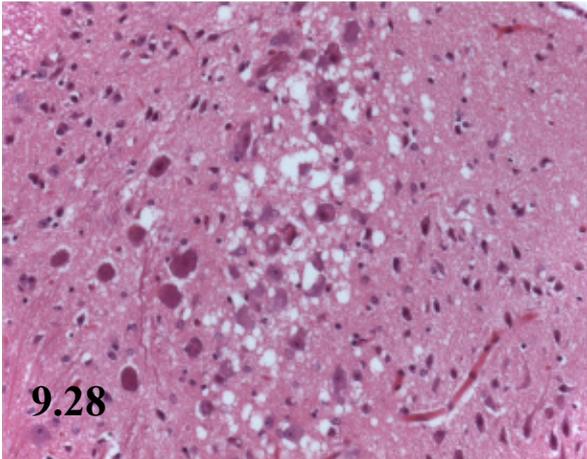
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.34: Gliose im Hippocampus einer mit S 33/02 infizierten VM95-Maus.

Immunhistologie, MAK anti-GFAP, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.35: PrP^{Sc}-Plaques im Corpus callosum einer mit S 32/02 infizierten Tgshp-Maus.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 31,25x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit den klassischen Scrapieisolaten S 32/02 bzw. S 33/02 infizierten Mäusen

Abb. 9.36: Gliose (9.36a) und korrelierende PrP^{Sc}-Ablagerung (9.36b) in den Nuclei vestibulares und in der Raphe der Medulla bei einer mit S 33/02 infizierten VM95-Maus.

Abb. 9.36a: Immunhistologie, MAK anti-GFAP, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.36b: Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.37: PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Nervenzellen der Kleinhirnkerne bei einer mit S 32/02 infizierten Tgshp-Maus (9.37a) und im Nucleus ruber einer mit S 33/02 infizierten Tgshp-Maus (9.37b).

Abb. 9.37a: Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.37b: Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 62,5x.

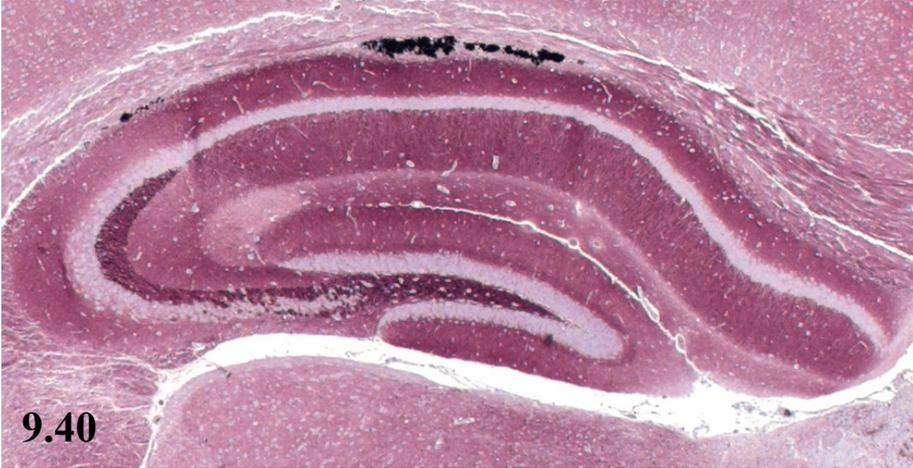
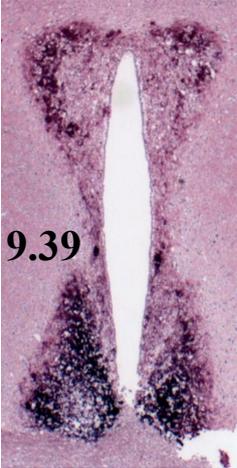
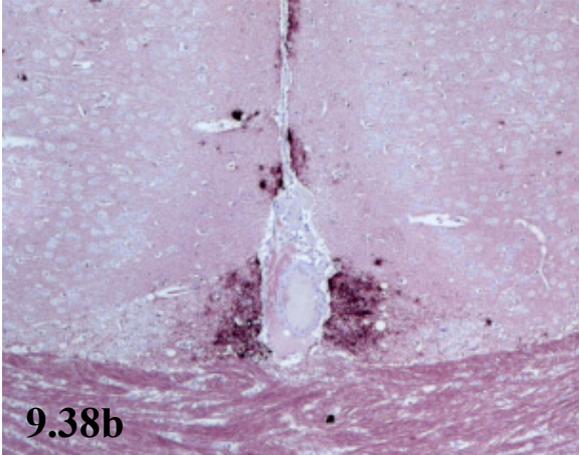
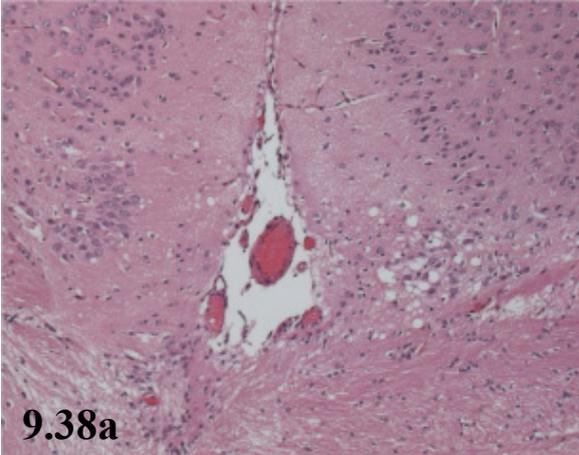
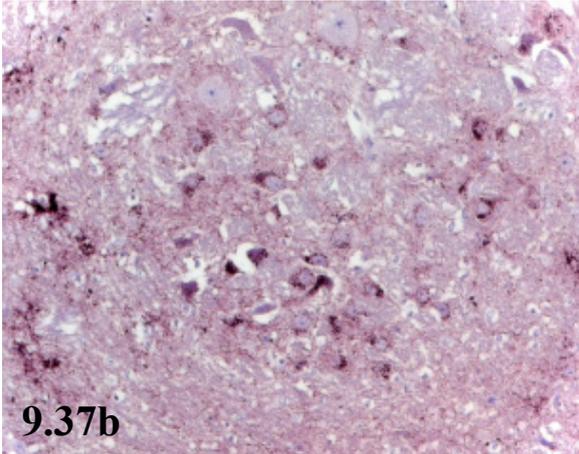
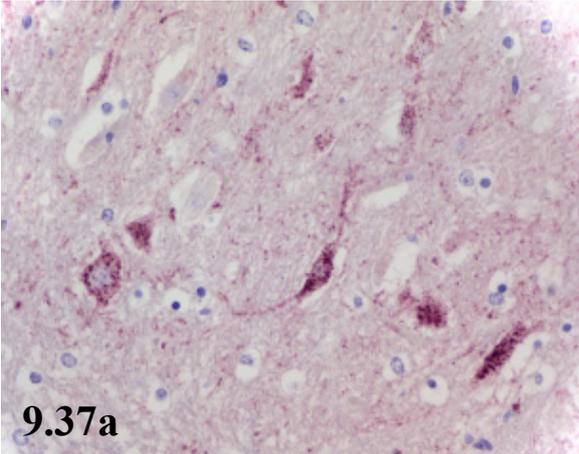
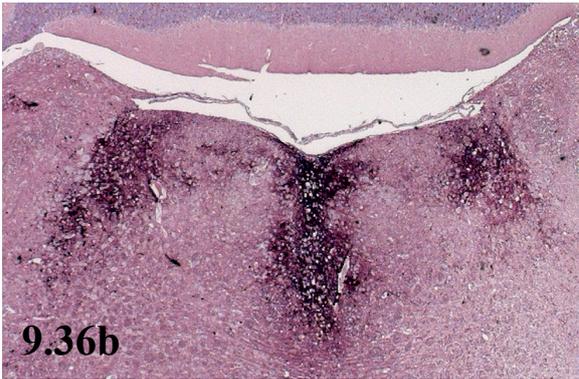
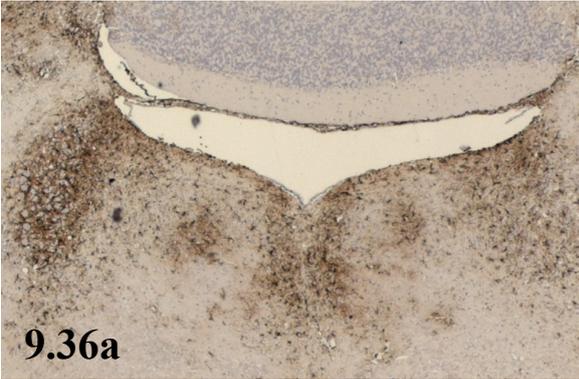
Abb. 9.38: Vakuolisierung (9.38a) und granuläre PrP^{Sc}-Ablagerung (9.38b) im Indusium griseum bei einer mit S 33/02 infizierten VM95-Maus.

Abb. 9.38a: H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.38b: Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.39: PrP^{Sc}-Ablagerungen im Hypothalamus einer mit S 32/02 infizierten VM95-Maus. Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.40: PrP^{Sc}-Plaques im Corpus callosum einer mit S 33/02 infizierten Tgshp-Maus. Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen VIP, Gerätevergrößerung 12,5x.



Immunhistologische Befunde im Kleinhirn bei mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

Abb. 9.41: Grobschollige PrP^{Sc}-Ablagerung in der Molekularschicht vom Kleinhirn einer mit S 37/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 333 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.42: Grobschollige PrP^{Sc}-Ablagerung in der Molekularschicht vom Kleinhirn einer mit S 38/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 371 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

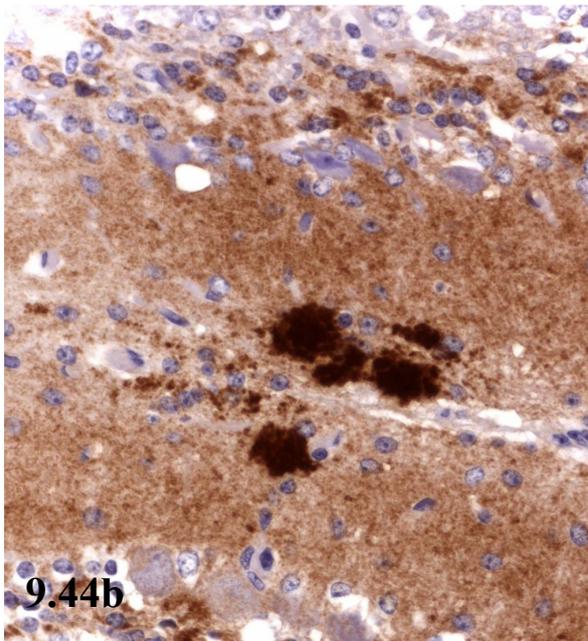
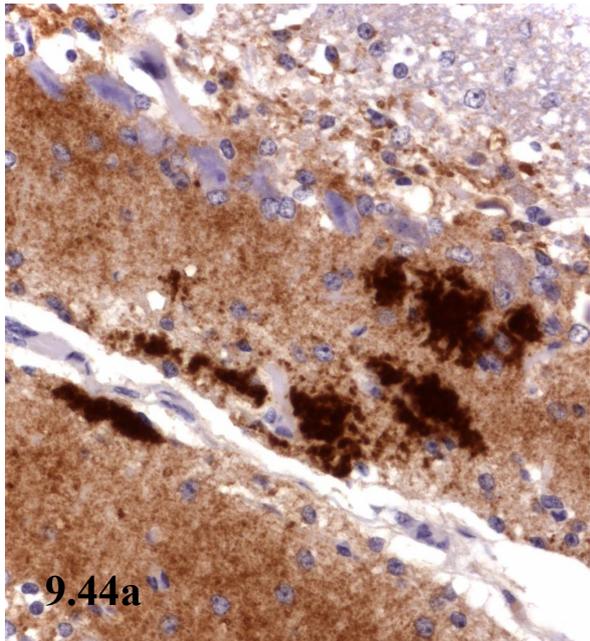
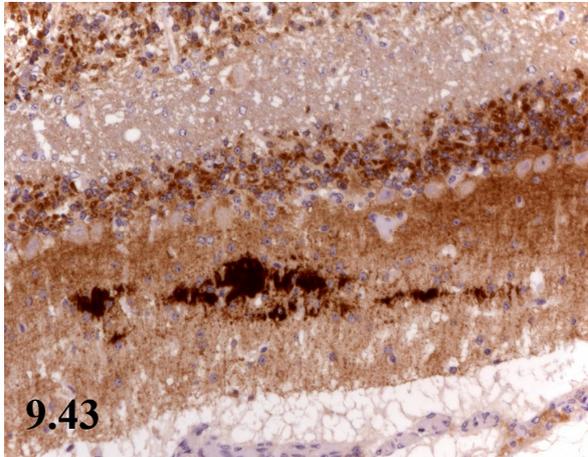
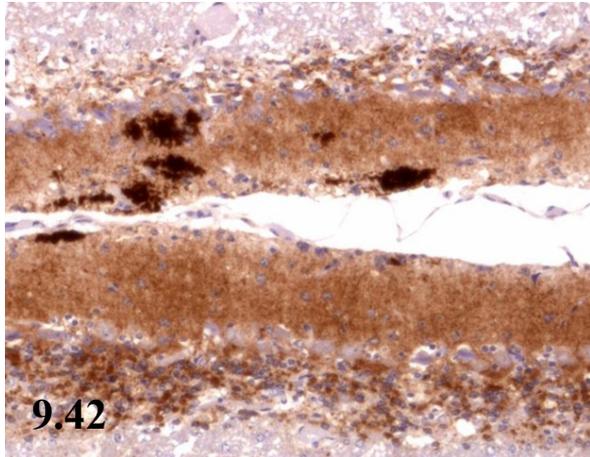
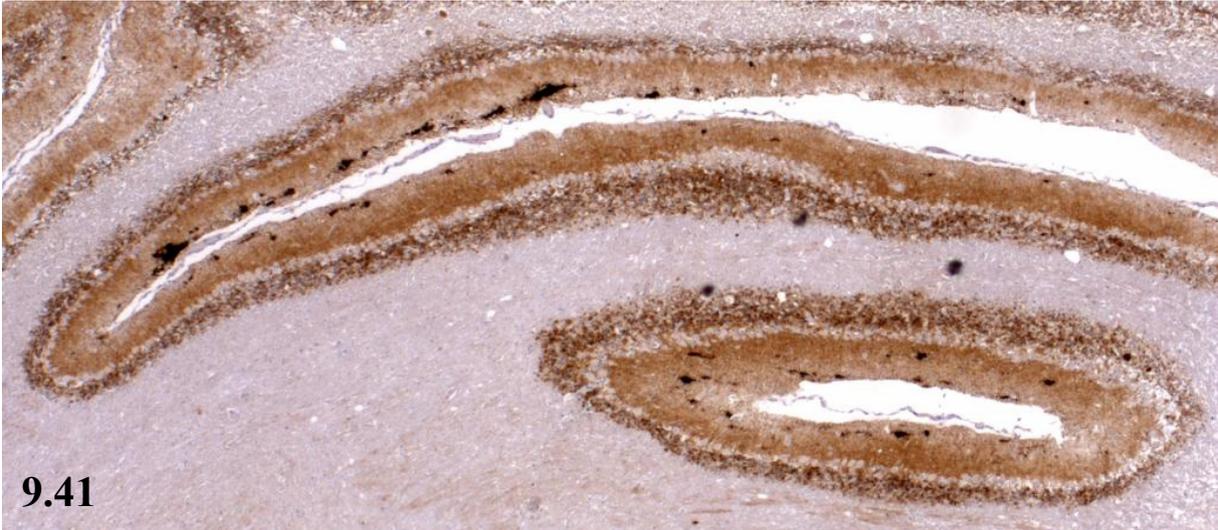
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.43: Grobschollige PrP^{Sc}-Ablagerung in der Molekularschicht vom Kleinhirn einer mit S 36/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 396 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.44a und b: Grobschollige PrP^{Sc}-Ablagerung in der Molekularschicht vom Kleinhirn einer mit S 38/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 371 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 125,0x.



Immunhistologische Befunde bei mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

Abb. 9.45: Verschiedene Formen der PrP^{Sc}-Ablagerung bei einer mit S 38/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 371 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde.

Abb. 9.45a: PrP^{Sc}-Plaques im Corpus callosum.

Abb. 9.45b: Granuläre bis grobschollige PrP^{Sc}-Ablagerung in der lakunaren Molekularschicht vom Hippocampus.

Abb. 9.45c: Granuläre PrP^{Sc}-Ablagerung im Corpus callosum.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.46: Hochgradige Gliose und Vakuolisierung im Hippocampus einer mit S 14/03 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 276 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

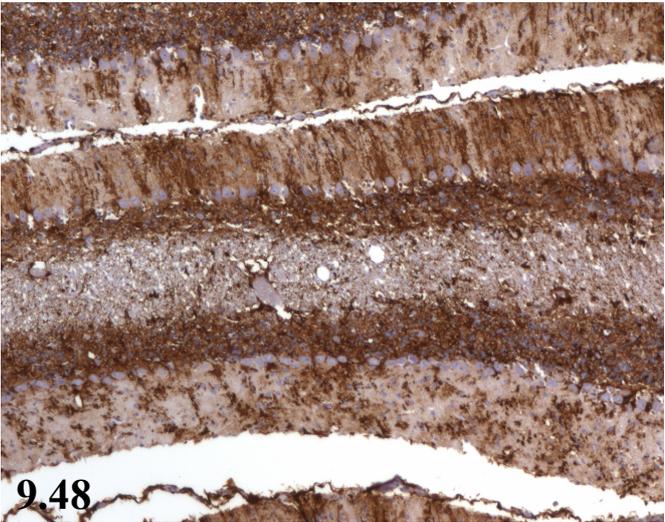
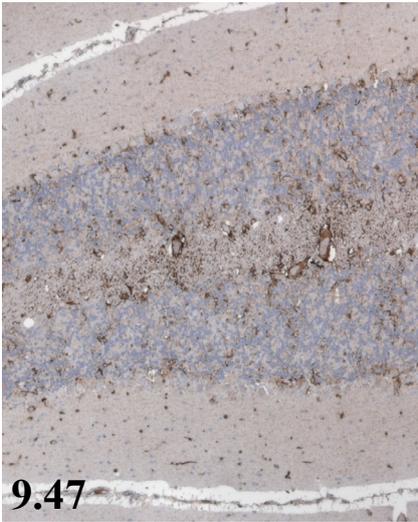
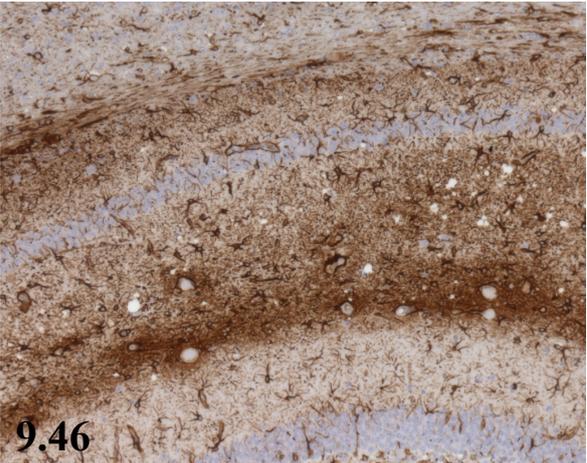
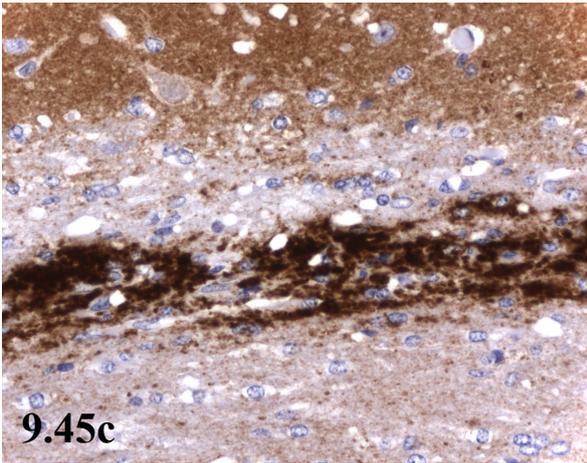
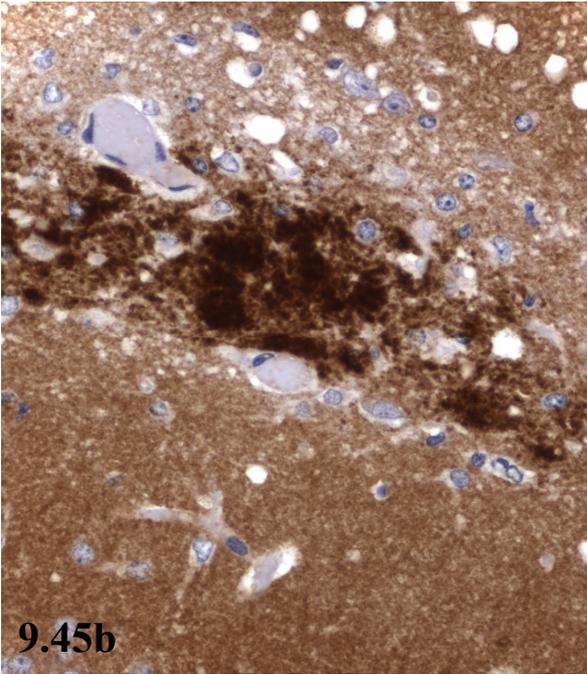
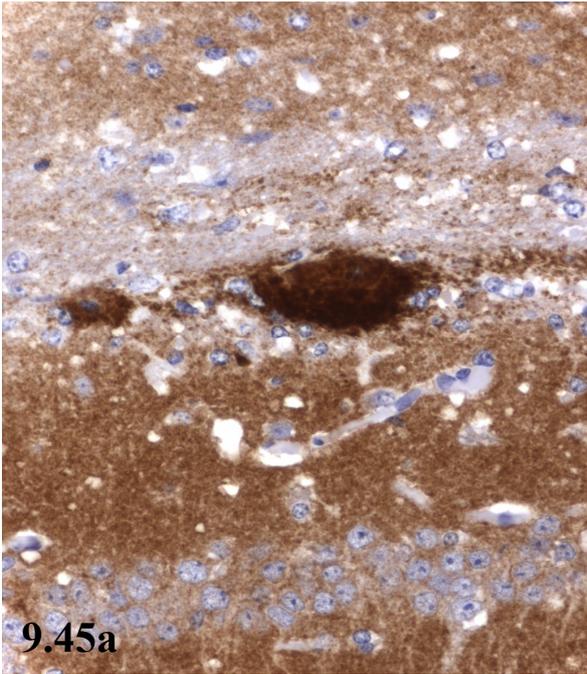
Immunhistologie, GFAP, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.47: Immunhistologische Darstellung nach GFAP-Färbung der Granular- und Molekularschicht vom Kleinhirn bei einer Tgshp-Kontrollmaus, welche mit Gehirnhomogenat eines PrP^{Sc}-negativen Schafes inokuliert wurde. Diese Maus war nach 406 Tagen wegen Abmagerung euthanasiert worden.

Immunhistologie, GFAP, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.48: Hochgradige Gliose in der Molekular- und Granularschicht vom Kleinhirn einer mit S 18/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 298 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

Immunhistologie, GFAP, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 31,25x.



Histopathologische Befunde bei mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

Abb. 9.49: Vakuolisierung im Hippocampus einer mit S 14/03 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 276 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x

Abb. 9.50: Vakuolisierung im Hippocampus einer mit S 26/03 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 345 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.51: Auflockerung der Granularschicht vom Kleinhirn bei einer mit S 18/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 401 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x

Abb. 9.52: Morphologie der Granularschicht bei einer der Tgshp-Kontrollmäuse, welche mit Gehirnhomogenat eines PrP^{Sc}-negativen Schafes inokuliert wurden waren. Diese Tgshp-Maus wurde nach 490 Tagen wegen eines Tumors euthanasiert. In der weißen Substanz des Kleinhirns sind zahlreiche Altersvakuolen zu erkennen.

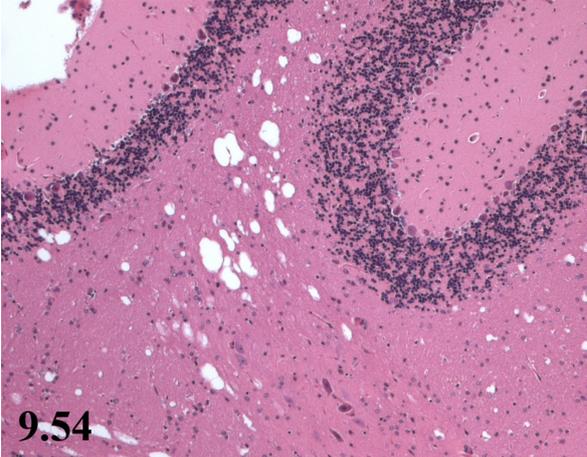
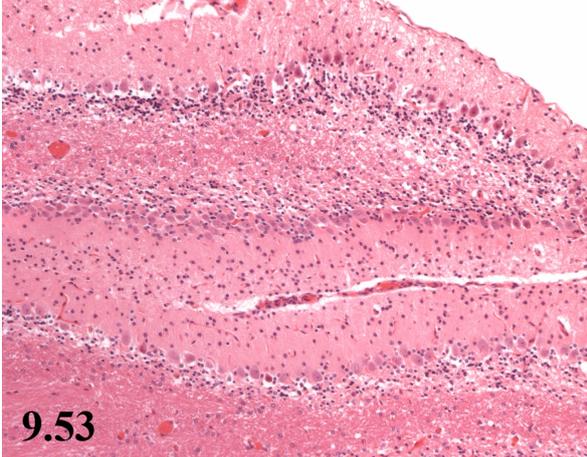
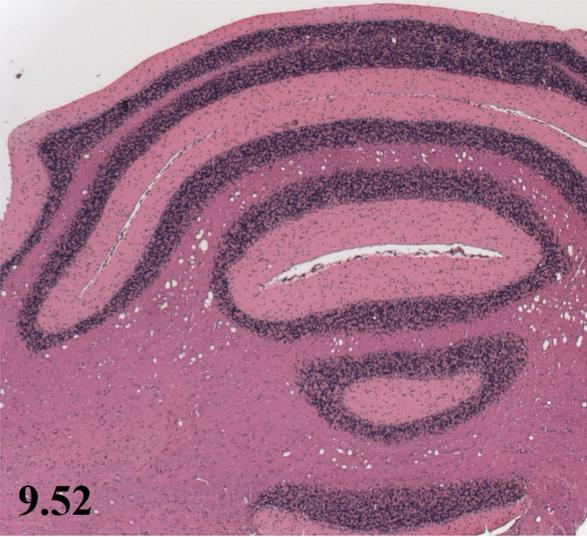
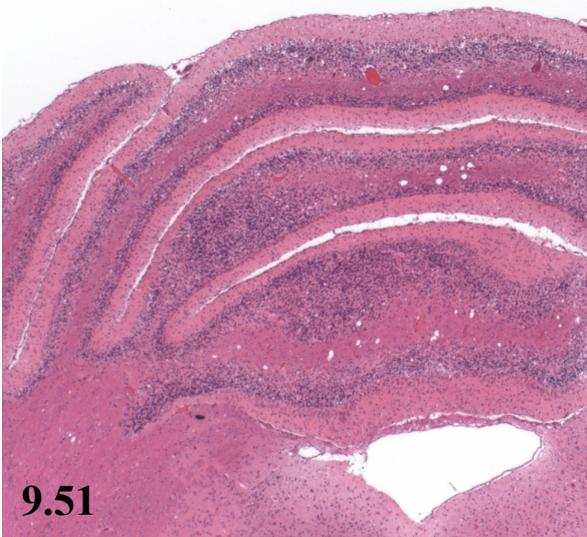
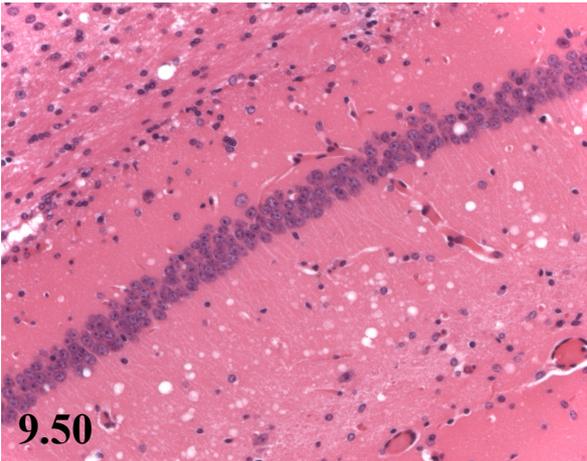
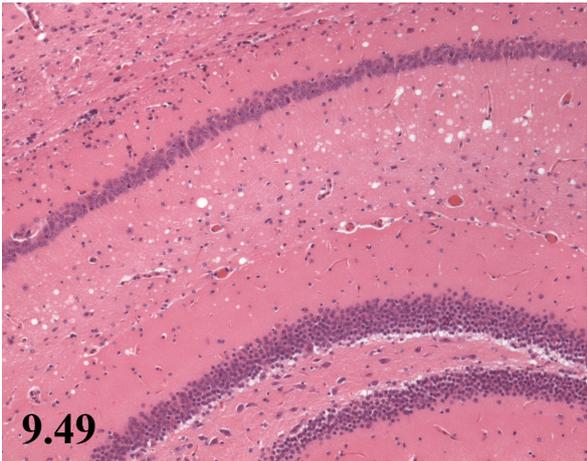
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 12,5x

Abb. 9.53: Auflockerung der Granularschicht vom Kleinhirn bei einer mit S 40/02 infizierten Tgshp-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 349 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde und bei der in der Immunhistologie und im Western Blot PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.54: Morphologie der Granularschicht bei einer der Tgshp-Kontrollmäuse, welche mit isotoner NaCl-Lösung inokuliert wurden waren. In der weißen Substanz des Kleinhirns sind zahlreiche Altersvakuolen zu erkennen. (1034)

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.



Histopathologische und immunhistologische Befunde bei mit atypischen deutschen Scrapieisolaten infizierten Wildtypmäusen

Abb. 9.55: Fein-granuläres Reaktionsmuster in der lakunaren Molekularschicht des Hippocampus bei einer mit S 37/02 infizierten VM95-Maus, die nach einer Inkubationszeit von 612 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde, bei der jedoch im Western Blot kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.56: Fein-granuläres Reaktionsmuster in der lakunaren Molekularschicht des Hippocampus bei einer mit S 38/02 infizierten VM95-Maus, die nach einer Inkubationszeit von 667 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde, bei der jedoch im Western Blot kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 125,0x.

Abb. 9.57: Homogen erscheinendes Reaktionsmuster in mehreren Milzfollikeln einer mit S 39/02 infizierten C57Bl6-Maus, die nach einer Inkubationszeit von 630 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde, bei der jedoch weder im Western Blot noch in der Immunhistologie PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 12,5x.

Abb. 9.58: Homogen erscheinendes Reaktionsmuster in einem Milzfollikel einer mit S 36/02 infizierten C57Bl6-Maus, die nach einer Inkubationszeit von 395 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde, bei der jedoch weder im Western Blot noch in der Immunhistologie PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

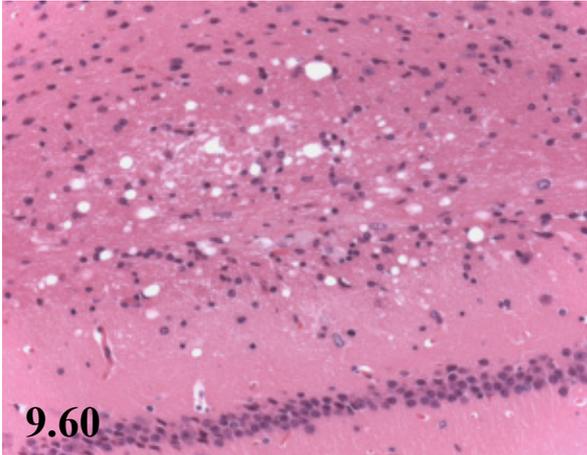
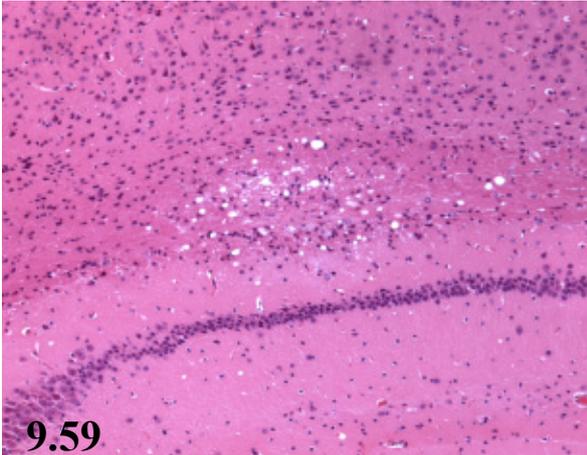
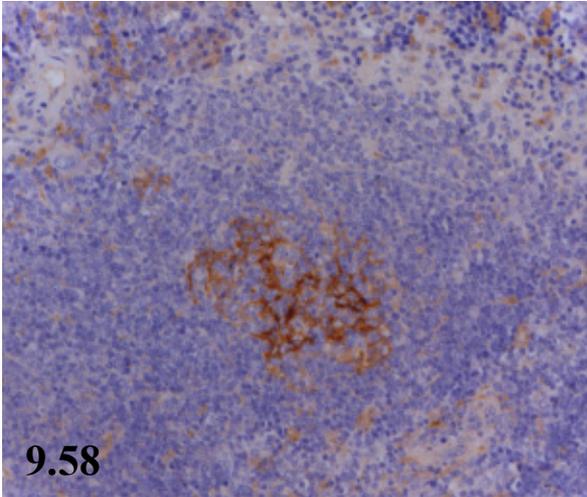
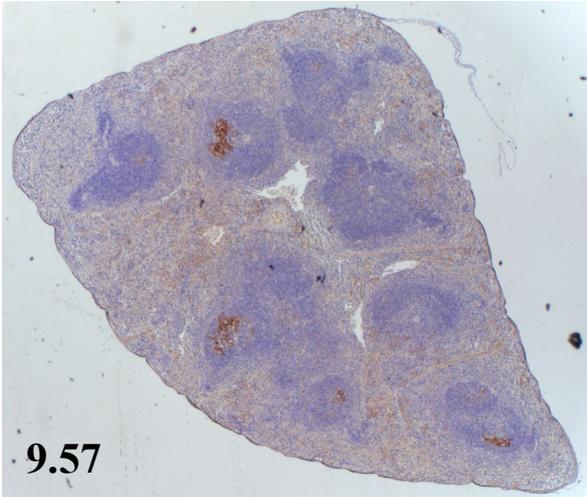
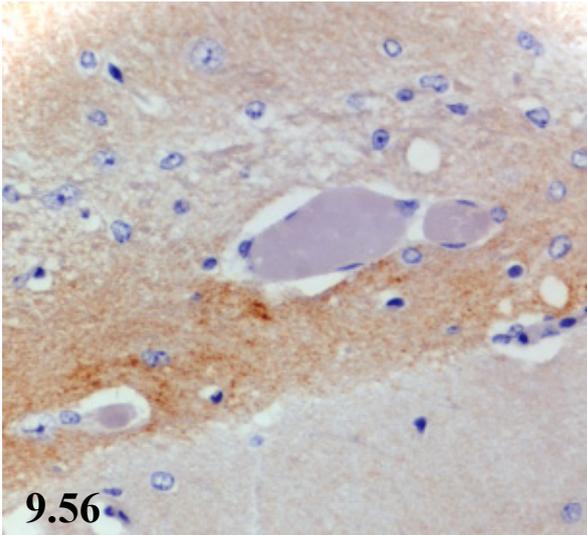
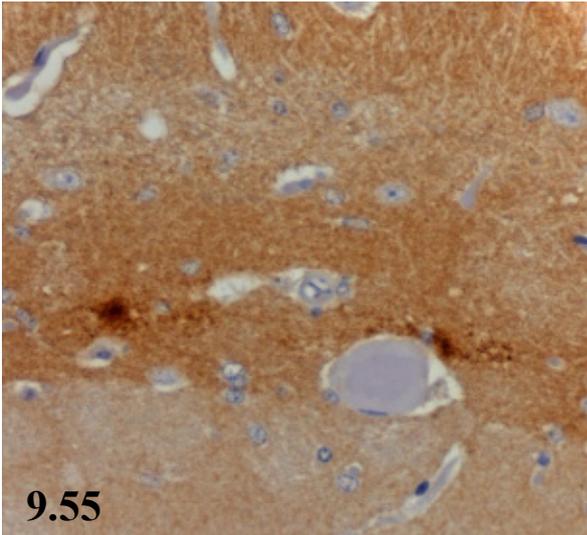
Immunhistologie, MAK 14D11, Chromogen DAB, Gerätevergrößerung 62,5x.

Abb. 9.59: Vakuolennest mit zahlreichen Makrophagen im Corpus callosum einer mit S 39/02 infizierten RIII-Maus, welche nach einer Inkubationszeit von 692 Tagen aufgrund klinischer Symptome euthanasiert wurde, bei der jedoch weder im Western Blot noch in der Immunhistologie PrP^{Sc} nachgewiesen werden konnte.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 31,25x.

Abb. 9.60: Vakuolennest aus Abb. 5 in einer größeren Vergrößerung.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 125,0x.



9.5 Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1: Transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Tieren und Menschen
Tab. 2.2: Scrapie-Ausbrüche und Scrapie-positive Schafe in Deutschland
Tab. 2.3: PrP-Genotypen bei Schafen
Tab. 3.1: Schafisolate mit klassischer Scrapie, Übersicht
Tab. 3.2: Schafisolate mit klassischer Scrapie, weitere Informationen
Tab. 3.3: Schafisolate mit atypischer Scrapie, Übersicht
Tab. 3.4: Schafisolate mit atypischer Scrapie, Schnelltestuntersuchungen
Tab. 3.5: Überblick über die Inokulationen in Mäuse
Tab. 3.6: Formeln zur Ermittlung von Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler
Tab. 3.7: Rezepturen für Trenn- und Sammelgele
Tab. 3.8: Läsionsprofil: Regionen der grauen und weißen Substanz
Tab. 3.9: Bewertung der Gehirnläsionen
Tab. 3.10: Inokulationen der Kontrollen in RIII-, VM95- und C57Bl6-Mäuse
Tab. 3.11: Inokulationen der Kontrollen in Tgshp-Mäuse
Tab. 4.1: PrP^{Sc}-Bandenmuster und Molekularmasse, atypische Scrapie
Tab. 4.2: Einteilung der Antikörper in 5 Gruppen, atypische Scrapie
Tab. 9.1.1: PrP-Antikörper, die für den Western Blot am Mausmaterial verwendet wurden
Tab. 9.1.2: PrP-Antikörper, die für die Histologie am Mausmaterial verwendet wurden
Tab. 9.1.3: PrP-Antikörper, die für den Western Blot am Schafmaterial verwendet wurden
Tab. 9.3.1: Proteinbiochemie, klassische Scrapieisolate, Schafmaterial (FLI-Test)
Tab. 9.3.2: Inkubationszeit, Übertragungsrate und mittlere Lebensdauer, Kontrolltiere
Tab. 9.3.3: Inkubationszeit, Übertragungsrate und mittlere Lebensdauer, klassische Scrapie
Tab. 9.3.4: Inkubationszeit, Übertragungsrate und mittlere Lebensdauer, atypische Scrapie
Tab. 9.3.5: Proteinbiochemie, klassische Scrapieisolate, RIII-Mäuse
Tab. 9.3.6: Proteinbiochemie, klassische Scrapieisolate, Tgshp-Mäuse
Tab. 9.3.7: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten RIII-Mäusen
Tab. 9.3.8: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten VM95-Mäusen
Tab. 9.3.9: Läsionsprofile von mit klassischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen
Tab. 9.3.10: Läsionsprofile von mit atypischen Scrapieisolaten infizierten Tgshp-Mäusen

9.6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische Darstellung aufgereinigter Scrapie-assoziiierter Fibrillen
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des monomeren PrP²⁷⁻³⁰
Abb. 2.3: Anzahl der BSE-Fälle bei Rindern in Deutschland
Abb. 2.4: Anzahl der Scrapie-Fälle pro Jahr in Deutschland
Abb. 2.5: Schematische Darstellung der PK-Schnittstellen beim PrP^{Sc}
Abb. 3.1: Position der Gehirnschnitte für das „Lesion Profile Scoring“
Abb. 3.2: Beurteilung der Vakuolisierungsgrade
Abb. 3.3: Läsionsprofil, Ebene D, Kleinhirn und Medulla oblongata, Maus
Abb. 3.4: Läsionsprofil, Ebene C, Mittelhirn, Maus
Abb. 3.5: Läsionsprofil, Ebene B, Zwischenhirn, Maus
Abb. 3.6: Läsionsprofil, Ausschnitt Ebene B, Hippocampus, Maus

- Abb. 3.7: Läsionsprofil, Ebene A, Endhirn, Maus
- Abb. 4.1: Dreiecksdiagramm der Glykosylierungsverhältnisse des PrP^{Sc} am Schafmaterial
- Abb. 4.2: Molekularmasse und Antikörperbindung, PrP^{Sc}, Schaf, Western Blot
- Abb. 4.3: Molekularmasse, PrP^{Sc}, Schaf, Diagramm
- Abb. 4.4: Antikörperbindungsverhältnis, PrP^{Sc}, Schaf, Diagramm
- Abb. 4.5: Inkubationszeiten der Mauslinien Tgshp, RIII, VM95 und C57Bl6
- Abb. 4.6: Übertragungsraten der Mauslinien Tgshp, RIII, VM95 und C57Bl6
- Abb. 4.7: Differenz der Inkubationszeiten
- Abb. 4.8: Molekularmasse, PrP^{Sc}, RIII-Mäuse, Diagramm
- Abb. 4.9: Molekularmasse, PrP^{Sc}, Tgshp-Mäuse, Diagramm
- Abb. 4.10: Glykosylierungsverhältnisse, PrP^{Sc}, RIII- und Tgshp-Mäuse, Dreiecksdiagramm
- Abb. 4.11: Antikörperbindungsverhältnis, PrP^{Sc}, RIII-Mäuse, Western Blot
- Abb. 4.12: Antikörperbindungsverhältnis, PrP^{Sc}, Tgshp-Mäuse, Western Blot
- Abb. 4.13: Antikörperbindungsverhältnis, PrP^{Sc}, RIII-Mäuse, Diagramm
- Abb. 4.14: ProteinaseK-Langzeit-Verdau, PrP^{Sc}, RIII-Mäuse, Diagramm
- Abb. 4.15: ProteinaseK-Langzeit-Verdau, PrP^{Sc}, Tgshp-Mäuse, Diagramm
- Abb. 4.16: ProteinaseK-Langzeit-Verdau, PrP^{Sc}, RIII- und Tgshp-Mäuse, Western Blot
- Abb. 4.17: Läsionsprofil der mit ‚BSE Höxter‘ inokulierten Mauslinien.
- Abb. 4.18: Läsionsprofil der mit S 3/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.19: Läsionsprofil der mit S 5/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.20: Läsionsprofil der mit S 13/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.21: Läsionsprofil der mit S 17/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.22: Läsionsprofil der mit S 29/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.23: Läsionsprofil der mit S 30/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.24: Läsionsprofil der mit S 32/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.25: Läsionsprofil der mit S 33/02 inokulierten Mauslinien
- Abb. 4.26: Läsionsprofil aller klassischen Scrapieisolate in RIII-Mäusen
- Abb. 4.27: Dendrogramm, RIII-Mäuse, klassische Scrapie
- Abb. 4.28: Läsionsprofil aller klassischen Scrapieisolate in VM-Mäusen
- Abb. 4.29: Dendrogramm, VM-Mäuse, klassische Scrapie
- Abb. 4.30: Läsionsprofil aller klassischen Scrapieisolate in Tgshp-Mäusen
- Abb. 4.31: Dendrogramm, Tgshp-Mäuse, klassische Scrapie
- Abb. 4.32: Dendrogramm der klassischen Scrapieisolate in allen Mauslinien
- Abb. 4.33: PrP^{Sc}-Bandenmuster, Molekularmasse, Antikörperbindung, atypische Scrapie
- Abb. 4.34: Antikörperbindung Gruppe 1, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.35: Antikörperbindung Gruppe 2, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.36: Antikörperbindung Gruppe 3, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.37: Antikörperbindung Gruppe 4, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.38: Antikörperbindung Gruppe 5, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.39: Antikörperbindungsverhältnis, atypische Scrapie, Diagramm
- Abb. 4.40: PK-Stabilität, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.41: Deglykosylierung, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.42: Übertragungsraten und Inkubationszeiten, atypische Scrapie, Tgshp-Mäuse
- Abb. 4.43: Übertragungsraten und Inkubationszeiten, atypische Scrapie, RIII-Mäuse
- Abb. 4.44: Übertragungsraten und Inkubationszeiten, atypische Scrapie, VM95-Mäuse

- Abb. 4.45: Übertragungsraten und Inkubationszeiten, atypische Scrapie, C57Bl6-Mäuse
- Abb. 4.46: PrP^{Sc}-Bandenmuster, atypische Scrapie, Western Blot
- Abb. 4.47: Läsionsprofile, Tgshp-Mäuse, atypische Scrapie
- Abb. 4.48: Läsionsprofil, Tgshp-Mäuse, atypische Scrapie
- Abb. 4.49: Dendrogramm, Tgshp- und Tg338-Mäuse, atypische Scrapie
- Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Epitope von PrP^{Sc} bei Scrapie und BSE
- Abb. 9.1 bis 9.60: Histologische Abbildungen

Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. M.H. Groschup für die Bereitstellung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Bei Frau Dr. Anne Buschmann bedanke ich mich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und der Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen danke ich für die externe Betreuung, sein Interesse an dieser Arbeit und deren Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Leipzig.

Ein besonderes Dankeschön geht an Martin Eiden: Danke für das Einführen in die Geheimnisse der Molekularbiologie, besonders bei widerspenstigen Antikörpern und mysteriösen Western Blots, für das Versorgen mit immer neuen Markern und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön geht an meine Vorgängerinnen Erdi und Frauke: Danke für alle Telefonate, Mails und euer stet offenes Ohr bei meinen Sorgen mit Mäusen, Western Blots und Histoschnitten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen weiteren Kollegen und Mitarbeitern des INNT am FLI auf der Insel Riems. Gerhild als stets hilfsbereite Zimmerkollegin, Chris als Hilfe bei allen Histoproblemen, Bärbel und Artur bei der Betreuung der zahlreichen Mäuse.

Gesine möchte ich für die unermüdliche Hilfe im BSE-Labor danken, Ines für ihr stets aufmunterndes Wesen und Birke für die stets gute und lustige Zusammenarbeit.

Danke auch an Ute, Antje, Dan, Cindy, Christina, Claudia, Leila, Jule, Anja, Markus und Anja.

Danken möchte ich auch den Tierpflegern, ganz besonders aber Uwe und Volker für die Hilfe bei der Mäusezucht.

Frau Ogonowski danke ich für ihre stets große Hilfsbereitschaft bei allen organisatorischen Problemen und Frau Riebe für die unermüdliche Hilfe bei der Literaturrecherche.

Frau Gesine Lühken vom Institut für Tierzucht und Genetik der Universität Gießen danke ich für die Bereitstellung der Genotypen der Scrapieisolate.

Prof. Dr. Markus Glatzel vom Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Dreiecksdiagramme.

Meinem Vater und meiner Schwester möchte ich für die Hilfe bei allen Computerproblemen sowie für die Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis beim Entstehen dieser Arbeit danken.

Cornelia Zschunke, Sandra Halwachs und Claudia Seidel möchte ich ganz herzlich für die vielen Mails, Telefonate und immerwährende Freundschaft und Unterstützung danken.