

Aus dem Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der
Tierärztlichen Hochschule Hannover

Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit des Rindes

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Petra Sander
aus Celle

Hannover 2005

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Tosso Leeb

1. Gutachter: Prof. Dr. Tosso Leeb
2. Gutachter: PD Dr. Martin H. Groschup

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2005

Meiner Mutter und Thoralf

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Zeitschriften veröffentlicht oder eingereicht:

SANDER P, HAMANN H, PFEIFFER I, WEMHEUER W, BRENIG B, GROSCHUP MH, ZIEGLER U, DISTL O, LEEB T (2004) Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. *Neurogenetics* **5**:19-25

© Springer-Verlag 2004

SANDER P, HAMANN H, DRÖGEMÜLLER C, KASHKEVICH K, SCHIEBEL K, LEEB T (2005) Bovine prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in Bovine Spongiform Encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.* **280**:37408-37414

© American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2005

LEEB T, SANDER P (2005) Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit beim Rind – Mythos oder Realität? *Nova Acta Leopoldina (zum Druck angenommen)*

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | Abkürzungen | 7 |
| II. | Einleitung | 9 |
| 1. | Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) | 9 |
| a) | Definition | 9 |
| b) | TSE des Menschen | 9 |
| c) | TSE der kleinen Wiederkäuer | 10 |
| d) | TSE beim Rind | 10 |
| e) | TSE bei Primaten, Feliden, Wildwiederkäuern und Nerzen | 11 |
| f) | TSE der Hirsche | 11 |
| 2. | Das Prion Protein | 11 |
| 3. | Pathogenese der TSE | 13 |
| 4. | Das Prion Protein Gen (<i>PRNP</i>) | 15 |
| 5. | Polymorphismen des <i>PRNP</i> Gens bei Mensch und Schaf | 16 |
| a) | Sporadische TSE des Menschen | 16 |
| b) | vCJD des Menschen | 17 |
| c) | Scrapie des Schafes | 17 |
| 6. | Assoziation zwischen Polymorphismen des bovinen <i>PRNP</i> Gens und dem Auftreten der BSE beim Rind | 18 |
| 7. | Promotoren bei Eukaryonten | 21 |
| 8. | Intention der Arbeit | 22 |
| III. | Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (<i>PRNP</i>) in German cattle breeds | 24 |
| IV. | Bovine prion protein gene (<i>PRNP</i>) promoter polymorphisms modulate <i>PRNP</i> expression and may be responsible for differences in Bovine Spongiform Encephalopathy susceptibility | 32 |
| V. | Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit beim Rind – Mythos oder Realität? | 48 |
| VI. | Übersicht | 62 |

| | |
|--|-----------|
| VII. Diskussion | 63 |
| 1. Mutationsanalyse des bovinen <i>PRNP</i> Gens | 63 |
| 2. Assoziationsstudie | 64 |
| 3. <i>In silico</i> Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindestellen | 65 |
| 4. Transkriptionsfaktor-Bindungskapazität zu DNA-Abschnitten des <i>PRNP</i> Promotors | 65 |
| 5. Einfluss von Allelvarianten auf die <i>PRNP</i> Promotoraktivität <i>in vitro</i> | 66 |
| 6. Modulation der <i>PRNP</i> Promotor-Varianten durch Überexpression von Transkriptionsfaktoren | 67 |
| 7. Einfluss der Indel Polymorphismen des <i>PRNP</i> Promotors auf die Expression <i>in vivo</i> | 68 |
| VIII. Zusammenfassung | 69 |
| IX. Summary | 70 |
| X. Literaturverzeichnis | 71 |
| XI. Publikationsliste | 83 |
| 1. Veröffentlichungen in Zeitschriften | 83 |
| a) Originalartikel | 83 |
| b) Übersichtsartikel | 83 |
| 2. Poster | 83 |
| 3. Vorträge | 84 |

I. Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| A | Alanin |
| AP2 | Aktivator Protein 2 |
| AS | Aminosäure |
| BCL6 | B-Zell Lymphom 6 |
| BSE | Bovine Spongiforme Enzephalopathie |
| bp | Basenpaar |
| CJD | Creutzfeldt-Jakob-Krankheit |
| vCJD | Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit |
| CWD | <i>Chronic Wasting Disease</i> |
| D | Asparaginsäure |
| DC | Dendritische Zellen |
| DMEM | Dulbecco´s modifiziertes Eagle´s Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dpl | DOPPEL-Protein |
| EGR4 | <i>early growth response 4</i> |
| ENS | Enterales Nervensystem |
| EMSA | <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> |
| FDC | Follikular Dendritische Zellen |
| FFI | Familiäre Fatale <i>Insomnia</i> , „Schlaflosigkeit“ |
| FSE | Feline Spongiforme Enzephalopathie |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| H | Histidin |
| Indel | Insertion-/Deletions-DNA-Polymorphismus |
| kb | Kilobase |
| L | Leucin |
| LRS | Lymphoretikuläres System |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| NEUROG1 | Neurogenin 1 |
| Octarepeat | Octapeptid-Repeat-Protein-Polymorphismus, <i>repeat</i> = Wiederholungen |
| ORF | <i>open reading frame</i> , „offener Leserahmen“ |
| P | Prolin |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |

| | |
|-------------------|--|
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| POZ | <i>pox virus and zinc finger protein</i> |
| PRND | DOPPEL Gen |
| PRNP | Prion Protein Gen |
| PrP | Prion Protein, allgemein |
| PrP ^c | Zelluläres Prion Protein, physiologische PrP Form |
| PrP ^{Sc} | Scrapie assoziiertes Prion Protein, pathologische PrP Form |
| Q | Glutamin |
| qRT-PCR | quantitative <i>Real-Time-PCR</i> , „Echtzeit-PCR“ |
| R | Arginin |
| RLU | <i>relative light units</i> , „Relative Licht Einheiten“ |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RP58 | Repressor-Protein 58 |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> , „Einzelbasen-DNA-Polymorphismus“ |
| SP1 | Stimulierendes Protein 1 |
| TDT | Transmission-Disequilibrium Test |
| TF | Transkriptionsfaktor/en |
| TME | <i>transmissible mink encephalopathy</i> , „TSE der Nerze“ |
| TSE | Transmissible Spongiforme Enzephalopathie |
| V | Valin |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

II. Einleitung

1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

a) *Definition*

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind Erkrankungen des Zentralen Nervensystems bei Mensch und Tier, die stets zum Tode führen. Es gibt bislang für keine der TSE-Formen eine Prophylaxe oder eine Therapie. Nach jahrelanger Inkubationszeit sterben die Nervenzellen ab, was mit mikroskopisch sichtbaren schwammartigen, so genannten spongiformen Veränderungen des Gehirns einhergeht. TSE können histopathologisch und immunhistochemisch anhand abgelagerter Amyloid-Plaques nachgewiesen werden, welche aus pathologischen unlöslichen Prion-Proteinen bestehen (KITAMOTO et al. 1991). Diese nicht-entzündliche neurale Degeneration (Enzephalopathie) führt zu neurologischen Ausfallserscheinungen wie Dysästhesie und Gangataxie, beim Menschen auch zur Demenz und zu psychischen Symptomen. Da bisher alle TSE-Formen experimentell und z.T. auch natürlich auf andere Individuen derselben und anderer Spezies übertragen werden konnten, spricht man von „transmissibel“ (MORGAN 1988).

b) *TSE des Menschen*

Mutationen im Prion Protein Gen (*PRNP*) des Menschen führen zur Ausbildung der autosomal dominant vererbten familiär gehäuften Krankheitsbilder Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, Tödliche Familiäre Schlaflosigkeit (familial fatal insomnia, FFI) oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (CREUTZFELDT 1920, GERSTMANN et al. 1936, GAJDUSEK 1977, LUGARESI et al. 1986, PALMER et al. 1991). Die pathologische Isoform des Prion Proteins kann aber auch als infektiöses Agens fungieren, wie z.B. bei der Kuru, welche in Kannibalismus praktizierenden Völkern vorkommt. Die CJD tritt nicht nur familiär, sondern auch iatrogen und sporadisch auf (BROWN 1998, HILL et al. 2003). Eine neue Variante der CJD (vCJD) wird auf eine Übertragung der BSE vom Rind zum Menschen zurückgeführt (COLLINGE et al. 1996, BRUCE et al. 1997, HILL et al. 1997, SCOTT et al. 1999, ASANTE et al. 2002). Es sind bislang ca. 150 Fälle der vCJD (Stand 01.04.2005) bekannt. Im Gegensatz zur sporadischen CJD-Form, die in ca. 90% der Fälle bei Menschen auftritt, die älter als 60 Jahre sind, sind bei der vCJD insbesondere jüngere, durchschnittlich 28 Jahre alte Patienten betroffen. Der Krankheitsverlauf der vCJD ist mit ca. 14 Monaten deutlich länger als bei der innerhalb von 6 Monaten tödlich verlaufenden klassischen CJD (PEDEN & IRONSIDE 2004).

c) *TSE bei kleinen Wiederkäuern*

Die Scrapie bei Schafen und Ziegen ist schon seit dem achtzehnten Jahrhundert bekannt (PARRY 1983) und mittlerweile wurde sie in nahezu allen Ländern der Welt mit Ausnahmen von Australien und Neuseeland beschrieben. Juckreiz, Bewegungsstörungen und körperlicher Verfall zeichnen dieses stets tödlich endende Krankheitsbild aus. Die aufgrund der bei diesen Spezies besonderen klinischen Symptomatik auch Gnubber- oder Traberkrankheit genannte TSE-Form tritt in Herden meist gehäuft auf, da der Hauptübertragungsweg von Muttertieren auf Lämmer über die infektiöse Nachgeburt und Fruchtwässer erfolgt (DETWILER & BAYLIS 2003). Das Scrapie-Protein weist eine besonders hohe Tenazität auf, wodurch Weiden und Ablammplätze jahrelang infektiös bleiben (BROWN & GAJDUSEK 1991) und sich somit alle Tiere einer Herde infizieren können.

d) *TSE beim Rind*

Die Bovine Spogiforme Enzephalopathie (BSE) wurde erstmals 1986 in Großbritannien diagnostiziert (WILESMITH et al. 1988). Bislang sind weltweit ca. 189.400 Tiere und davon allein im Vereinigten Königreich ca. 184.200 Rinder erkrankt (Stand 04.05.2005; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, OIE; www.oie.int). Der Ursprung des BSE-Erregers ist allerdings noch ungeklärt. Eine Übertragung des Scrapie-Erregers von infizierten Schafen auf Rinder oder spontane Fälle von BSE bei Rindern sind möglich (EDDY 1990, EDDY 1995). Auf Grundlage epidemiologischer Untersuchungen vermutet man, dass die Ansteckung mit BSE auf die Verfütterung ungenügend erhitzter Tiermehle zurückzuführen ist, welche von infizierten Tieren stammten (MORGAN 1988).

Der Verlauf der BSE erstreckt sich über mehrere Wochen bis Monate, die klinischen Symptome treten progressiv verstärkt auf. Zu den Hauptsymptomen zählen Verhaltensänderungen, wie Übererregbarkeit, Nervosität, Ängstlichkeit, selten Aggressivität, ein gestörtes Sensorium und Bewegungsstörungen, wie Tremor und Ataxie (SAEGERMAN et al. 2004). Leistung und Gewicht sind trotz lang erhaltender Fresslust rückläufig. Die Behandlung erkrankter Tiere ist erfolglos. Da BSE nur selten horizontal übertragen wird (HOINVILLE et al. 1995), ist es in der Regel eine Einzeltiererkrankung und unterscheidet sich somit epidemiologisch von der Scrapie. Vertikale Übertragungen kommen selten vor (DONNELLY 1998).

Durch Exporte von verseuchten Tiermehlen und infizierten Rindern konnte sich BSE von Großbritannien aus weltweit ausbreiten, mittlerweile wurde BSE in fast ganz Europa und Nordamerika sowie in Japan diagnostiziert. In der Bundesrepublik Deutschland wurde die Verfütterung von Tiermehlen an Wiederkäuer am 18. März 1994 verboten. Seit Oktober 2000 müssen alle EU-Mitgliedstaaten Risikomaterial von Schlachtkörpern entfernen und

unschädlich beseitigen. Zum Risikomaterial zählen Schädel einschließlich Gehirn, Augen und Tonsillen, Rückenmark, Wirbelsäule, Spinalganglien von über zwölf Monate alten Rindern und der gesamte Darm einschließlich Mesenterium aller Rinder.

Aufgrund der langen Inkubationszeit der BSE von 4-6 Jahren ist die Eliminierung infizierter Rinder schwierig und die Gefahr, dass infektiöses Material weiterhin in die Nahrungsmittelkette gelangt, groß. Seit dem 01.01.2001 müssen innerhalb der EU alle Schlachtrinder, die älter als 30 Monate sind, vor dem Inverkehrbringen als Lebensmittel auf BSE getestet werden. Dies wird mit Hilfe des so genannten Schnelltests durchgeführt (s. Abschnitt 2).

e) *TSE bei Primaten, Feliden, Wildwiederkäuern und Nerzen*

Der BSE-Erreger hat mittlerweile mehrmals die Speziesbarriere überwunden und löste entsprechende TSE-Formen bei Wildwiederkäuern und Primaten in Zoos, sowie bei Haus- und Wildkatzen aus (WYATT et al. 1991, PEARSON et al. 1992, KIRKWOOD et al. 1993, COLLINGE et al. 1996, BONS et al. 1999). Die Transmissible Enzephalopathie der Nerze (TME) wird in manchen Fällen ebenfalls auf den BSE-Erreger zurückgeführt, bei denen durch so genannte sporadische Fälle von BSE bei Rindern („downer cattle“) Nerze durch Übertragung über das Futter infiziert wurden (MARSH et al. 1991, MARSH & BESEN 1993). Andere Fälle wiederum werden auf die Verfütterung von Scrapie-infiziertem Schaf- oder Ziegenfleisch zurückgeführt (MARSH & HADLOW 1992).

f) *TSE der Hirsche*

Ein eigenständiger Stamm scheint der Erreger der Chronic-Wasting Disease (CWD) nordamerikanischer Hirscharten darzustellen (MILLER & WILLIAMS 2002), obgleich das klinische Bild und die horizontale Übertragungsrate der Scrapie gleicht (WILLIAMS & MILLER 2002).

2. Das Prion Protein

Das Prion Protein (PrP) existiert in zwei verschiedenen Isoformen, dem PrP^c und dem PrP^{Sc}. Physiologisches, zelluläres PrP (PrP^c) wird in allen Geweben von Säugern exprimiert, allerdings besonders stark in neuralem Gewebe (BROWN et al. 1990, CAUGHEY 1991, PRUSINER 1991, HORIUCHI et al. 1995, FORD et al. 2002a). Seine Funktion ist immer noch nicht ausreichend geklärt. Es wird unter anderem angenommen, dass es eine Rolle bei Reizleitung an den Synapsen (LOFFNER et al. 1986, COLLINGE et al. 1994, LEDO et al. 1996)

oder der zirkadianen Rhythmus spielt (TOBLER et al. 1996). Transgene *knock out* Mäuse, die kein PrP bilden können, entwickeln sich allerdings normal (BUELER et al. 1992).

PrP^{Sc} stellt das Agens der TSE dar, wobei „Sc“ für „Scrapie-assoziiert“ steht, was aber nur geschichtlichen Charakter hat und auf weitere TSE-Formen übertragen wurde. Prusiner formulierte im Jahre 1982 die „Protein only“- Theorie (PRUSINER 1982), laut derer das PrP^{Sc} als „Prion“ der einzige Bestandteil des Erregers der TSE ist, da das Agens keinerlei erregerspezifische Nukleinsäuren enthält (PRUSINER & SCOTT 1997). Dieser Theorie gegenüber steht das Modell der Virino-Hypothese, wobei kleine virale Nukleinsäuren von wirts- statt viruseigener Proteine umhüllt sind (HOPE 1994). Für letztere Theorie spricht die Existenz von verschiedenen TSE-Erregerstämmen, welche sich in unterschiedlichen Glykosilierungen, Inkubationszeiten, Proteinase-Resistenzen, Inaktivierungsmöglichkeiten und klinischer Symptomatik äußern (KUCZIUS & GROSCHUP 1999, WEISSMANN 2004).

Während beim Schaf schon lange viele verschiedene Prionenstämme bekannt sind (BRUCE 2003, NOVAKOFSKI et al. 2005), wurde erst vor kürzerem in Frankreich (BIACABE et al. 2004) und Italien (CASALONE et al. 2004) über atypische BSE-Fälle bei Rindern berichtet, die auf neue BSE-Stämme zurückzuführen sind.

Es existiert kein Unterschied in der Aminosäuresequenz, sondern nur ein struktureller Unterschied zwischen den beiden Isoformen des PrP (Abb. 1). Die dreidimensionale Struktur des PrP^{C} besteht überwiegend aus α -helikalnen Bereichen und einem nur geringen Anteil an β -Faltblattstruktur (RIEK et al. 1996). Diese Konformation ändert sich bei der Konversion zu PrP^{Sc} , welches vorwiegend aus β -Domänen besteht (PAN et al. 1993). Das PrP^{Sc} zeichnet sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Proteinase K aus. Im Unterschied zum komplett verdaubaren PrP^{C} spaltet das Enzym beim PrP^{Sc} lediglich ein Fragment ab, welches auch aufgrund seiner Masse von 27-30 kDa als PrP^{27-30} bezeichnet wird (PRUSINER et al. 1984). Der so genannte Schnelltest basiert auf dem direkten Nachweis des mit Proteinase K verdauten Prion-Proteins (PrP^{Sc}) mittels spezifischer Antikörper.

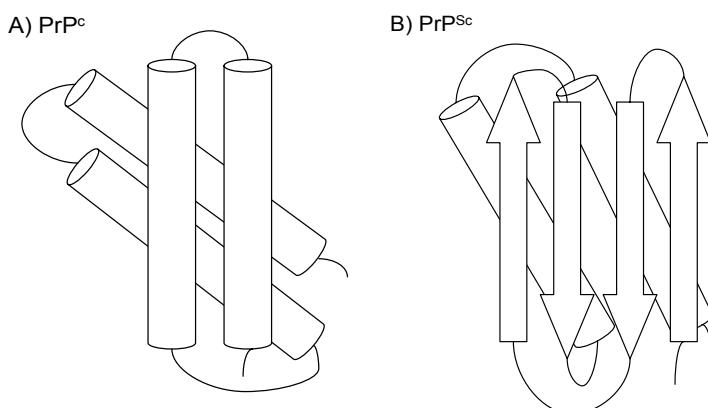


Abbildung 1: Das zelluläre Prion Protein PrP^{C} (A) hat gemäß hypothetischer Modellskizze vier α -Helices (Zylinder). Diese konformieren sich beim pathologischen PrP^{Sc} (B) z.T. in antiparallele β -Stränge (Pfeile) um.

Im Gegensatz zu konventionellen Erregern wie Viren oder Bakterien weisen Prionen eine ungewöhnlich hohe Tenazität auf. Weder ultraviolette oder ionisierende Strahlen, noch Desinfektionsmittel wie Alkohol oder Formaldehyd zerstören das Agens. Hoch konzentrierte Natriumhypochlorit-, Guanidium-Isothiozyanat- und Natriumhydroxid- Lösungen sowie Autoklavieren unter erhöhten Drücken gelten als zuverlässige Inaktivatoren (BROWN et al. 1986, TAYLOR 1991, KIMBERLIN 1993). Es wird kontrovers diskutiert, ob die Konversion des physiologischen Proteins in die pathologische Isoform über einen „Keim“ (seed) erfolgt (WEISSMANN 2004). Laut seeding-Modell steht PrP^{Sc} im Gleichgewicht mit PrP^c, wobei letzteres die bevorzugte Form darstellt. Selten bildet sich ein Aggregationskeim aus mehreren PrP^{Sc}-Molekülen, an welchen sich PrP^{Sc}-Monomere schnell anlagern können und somit eine stabile Einheit formieren. Nach Teilung dieser gewachsenen Keime entstehen weitere Aggregate, die erneut als „seed“ fungieren (WEISSMANN 2004).

Das „Refolding“-Modell (PRUSINER 1997) geht davon aus, dass PrP^c an sich stabil ist und nur eine Anlagerung von PrP^{Sc} zur Umfaltung in die pathologische Form führt, wobei ein Katalysator in Form von Enzymen oder Chaperonen nicht ausgeschlossen ist. Spontane Konformationsänderungen, verursacht durch Mutationen im *PRNP* Gen, begünstigen die Umfaltung des Proteins und erklären familiäre Formen der TSE, z.B. die erbliche Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

3. Pathogenese der TSE

Zelluläres Prion Protein PrP^c ist eine Voraussetzung für die Vermehrung des Erregers und dem Ausbruch der Erkrankung. Studien an *knock out* Mäusen zeigen, dass PrP^c-defiziente Tiere nicht an TSE erkranken können (BUELER et al. 1993). Da das pathologische PrP^{Sc} dem physiologischen PrP^c in seiner Aminosäure-Sequenz gleicht, werden bei einer Prionen-Infektion keine Antikörper gebildet. Monoklonale anti-PrP Antikörper mit niedriger Affinität zu PrP^{Sc} inhibieren bei *in vivo* Versuchen die Prion-Replikation und verzögern den Ausbruch der Krankheit (WHITE et al. 2003).

Studien an Tiermodellen zeigen, dass Prionen über das Immun- und Nervensystem zum Gehirn transportiert werden (BALDAUF et al. 1997, BEEKES et al. 1998, GROSCHUP et al. 1999, GLATZEL et al. 2004), wo die Zielzellen im Zentralen Nervensystem (ZNS) infiziert werden. Eine induzierte Apoptose der Neuronen führt zu der spongiformen Struktur des Organs, wobei der neuronalen Degeneration eine Mikrogliaaktivierung vorausegeht. (KRETZSCHMAR et al. 1997, GIESE et al. 1998).

Vom Immunsystem sind im Besonderen das lymphoretikuläre System (LRS) der Milz, die Lymphknoten sowie B-Lymphozyten an der Erreger-Verbreitung beteiligt. In Nagern erfolgt nach der peripheren Aufnahme von Prionen eine Vermehrung der Erreger im lymphoretikulären System der Milz und den Lymphknoten (DAUDE 2004). Follikular Dendritische Zellen (FDC) in der Milz wurden bei der Maus als ursächliche Zellen für die Prionen-Vermehrung identifiziert (MONTRASIO et al. 2000). PrP^c-defiziente Mäuse erkranken nur, wenn ihr Lymphohämatopoetisches System durch Injektion PrP^c-exprimierender Zellen ergänzt wurde (BLATTNER et al. 1997). Die Entwicklung und Maturation der FDC bzw. die PrP^{Sc}-Vermehrung hängt von der Existenz der B-Lymphozyten ab (KLEIN et al. 1998), welche Antigene präsentieren, wohingegen T-Lymphozyten für die Erreger-Verbreitung entbehrlich sind. Dabei müssen die B-Lymphozyten selbst kein PrP^c bilden können, es wird ein PrP-unabhängiger Mechanismus angenommen. Versuche an Maus-Scrapie-Modellen zeigen, dass Dendritische Zellen (DC) die initiale Brücke vom Darmlumen zum Lymphgewebe darstellen, welche die Prionen im Darm aufnehmen und zu den Mesenteriallymphknoten transportieren (HUANG et al. 2002). Ist die Funktion der DC inhibiert, sinkt die Empfänglichkeit für TSE erheblich (MABBOTT et al. 2003). Prionen werden also im Darmlumen von DC aufgenommen, zu Lymphknoten gebracht, von dort aus über Lymphbahnen zur Milz transportiert (MAIGNIEN et al. 1999), wo eine initiale Erregervermehrung stattfindet. Über die Milz innervierende vegetative Nervenfasern werden die PrP^{Sc}- Moleküle zum ZNS geleitet (GLATZEL 2004). Bei natürlichen Scrapie-Infektionen von Schafen gilt aber auch das enterische Nervensystem (ENS) als Eintrittspforte (VAN KEULEN et al. 1999, HEGGEBO et al. 2000). Nachgewiesen wurde PrP^{Sc} bei mit BSE-Erregern oral infizierten Primaten sowohl im gesamten Darm vom Duodenum bis zum Rektum, dem ENS und Darmmukosa, als auch in den Mesenteriallymphknoten, der Milz und dem Peripheren Nervensystem (PNS) (HERZOG et al. 2004).

Bei Rindern, die mit dem BSE-Erreger oral infiziert wurden, sind außerhalb des ZNS neben dem distalen Ileum, den Peyerschen Platten und den Mesenteriallymphknoten (TERRY et al. 2003), das PNS (WELLS et al. 1998) und die Rachenmandeln Träger des infektiösen PrP^{Sc} (WELLS et al. 2005; Abb. 2). Im Gegensatz zu anderen Spezies nimmt das bovine LRS eine Sonderstellung ein. Seine Rolle bei der Pathogenese der BSE des Rindes scheint derzeit noch unklar. In der Milz von infizierten Rindern konnte bisher kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden (SOMERVILLE et al. 1997). Die Milz eines BSE-infizierten Rindes vermag Mäuse im Experiment nicht mit BSE zu infizieren (MIDDLETON & BARLOW 1993), allerdings schlägt dieser Versuch auch bei Mesenteriallymphknoten fehl, in denen das PrP^{Sc} nachgewiesen wurde (TERRY et al. 2003).

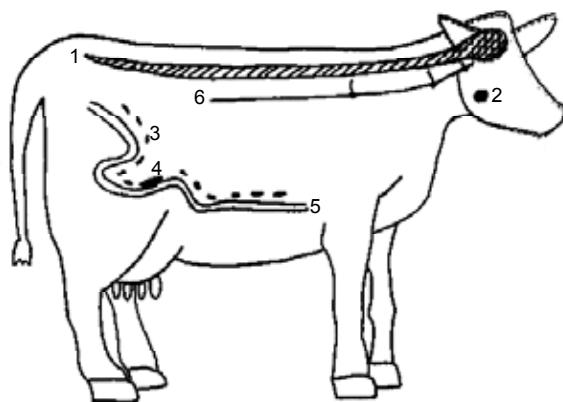


Abbildung 2: Pathogenese der BSE beim Rind. PrP^{Sc} wurde neben dem Rückenmark und Gehirn (1) beim Rind in den lymphatischen Organen Rachenmandeln (2), Mesenteriallymphknoten (3), Peyer'sche Platten (4), im distalen Ileum (5) und im PNS (6) nachgewiesen.

4. Das Prion Protein Gen (*PRNP*)

Das Prion Protein Gen (*PRNP*), welches für das zelluläre PrP^c kodiert, befindet sich beim Menschen auf Chromosom 20, bei der Maus auf Chromosom 2 (SPARKES et al. 1986), bei Schaf und Rind auf Chromosom 13 (RYAN & WOMACK 1993) und ist bei Mensch und Tier hochgradig konserviert (LEE et al. 1998). Es besteht aus 2 (Mensch) bzw. 3 (Maus, Schaf, Rind) Exons. Der offene Leserahmen (ORF) befindet sich bei allen Spezies komplett im letzten Exon.

Beim Rind enthält das dritte Exon ca. 96 % der transkribierten Sequenz (HORIUCHI et al. 1998). HORIUCHI et al. (1997) beschrieben eine gewebespezifische Spleißvariante des bovinen *PRNP*. Das Exon 1 existiert demnach nicht nur in einer 53 bp Variante (Exon 1a), sondern kann auch um 115 bp verlängert sein (Exon 1b), wobei letztere in allen Geweben nur nicht in der Milz vorkommt. Diese Gewebespezifität wird mit dem mangelnden Nachweis des PrP^{Sc} in der Milz von BSE-infizierten Rindern in Zusammenhang gebracht (DAUDE 2004). Das Translationsprodukt des *PRNP* Gens besteht bei Rindern aus 256-272 Aminosäuren (AS) (GOLDMANN et al. 1991). Die bovine Sequenz mit dem Datenbankeintrag AJ298878 umfasst mit 78 056 bp das ganze bovine *PRNP* (Abb. 3) (HILLS et al. 2001). Die potentielle Promotorregion des bovinen *PRNP* wurde von INOUE et al. (1997) auf 88 bis 30 bp vor und 123 bis 891 bp nach dem Transkriptionsstart lokalisiert. Die 88 bp vor Exon 1 enthalten einen relativ hohen GC-Gehalt (78 %) und sind zu 89 % mit der Sequenz des Schafes homolog. In dieser Region sind wie in den voraussichtlichen Promotorbereichen des Menschen und der Ratte (SAEKI et al. 1996, MAHAL et al. 2001) mögliche SP1-Bindungsstellen enthalten. In den

ersten 2,5 kb stromaufwärts des ersten Exons befinden sich beim Rind nur wenige repetitive Elemente, was eine funktionelle Beteiligung dieses Abschnitts an der Modulation des *PRNP* nahe legt.

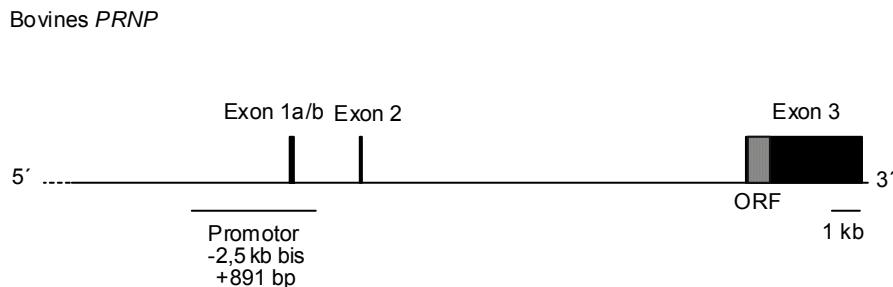


Abbildung 3: Bovines *PRNP* Gen mit den drei Exons (schwarze Boxen), dem offenen Leserahmen (ORF, grau) und der mutmaßlichen Promotorregion (2,5 kb vor dem Transkriptionsstart und Bereiche des ersten Introns) nach INOUE et al. (1997).

Bei allen bisher untersuchten Spezies befindet sich ca. 20 kb (beim Rind 16,8 kb) stromabwärts des *PRNP* das DOPPEL Gen (*PRND*), welche dem erstgenannten in seiner Genstruktur ähnlich ist (COMINCINI et al. 2001). Auch das Translationsprodukt (Dpl) weist wegen seiner 25 % Identität mit PrP^c eine gewisse Strukturhomologie zum Prion-Protein auf (MASTRANGELO & WESTAWAY 2001). Es wird vorwiegend im Hoden exprimiert und ist an der männlichen Fertilität beteiligt (TRANULIS et al. 2001). Eine Ataxie und zerebrale Degeneration bei gewissen *PRNP*-defizienten Mausstämmen, z.B. „Ngsk“, wird auf eine Überexpression des Dpl zurückgeführt (MOORE et al. 2001), was auf einer ektopischen cis-Aktivierung des *PRND* gründet (GENOUD et al. 2004).

Zwischen der Mutation T174M im humanen *PRND* Gen und der sporadischen CJD besteht eine signifikante Assoziation (SCHRODER et al. 2001). Diese Mutation taucht häufig mit dem Polymorphismus M129V im *PRNP* Gen des Menschen gekoppelt auf (CROES et al. 2004). Beim Rind wurden ebenfalls Mutationen im *PRND* gefunden, wiesen aber keine Assoziation zu BSE auf (COMINCINI et al. 2001).

5. Polymorphismen des *PRNP* Gens bei Mensch und Schaf

a) Sporadische TSE des Menschen

Alle bei Menschen beobachteten familiären Formen der TSE lassen sich auf Mutationen im *PRNP* Gen mit Änderungen in der Aminosäure-Sequenz zurückführen. Z.B. führt der Austausch der AS 102 des humanen *PRNP* von Prolin zu Leucin (P102L) zum Gerstmann-

Sträussler-Scheinker-Syndrom (GOLDFARB et al. 1990). Die Patienten der erblichen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit hingegen weisen besonders häufig homozygot die Aminosäure Methionin (M) an der Position 129 auf, während heterozygote und homozygote Valin (V) Genotypen seltener sind (PALMER et al. 1991). DE SILVA et al. (1994) beziffern die Genotypen der sporadischen CJD Fälle mit 9 % V/V, 9 % V/M und 83 % M/M. Eine höhere Empfänglichkeit weisen 129M/M Patienten offenbar auch für das Auftreten der Kuru auf, wohingegen 129M/V oder 129V/V Genotypen in den untersuchten Volksstämmen wesentlich seltener betroffen sind (GOLDFARB et al. 2004). Das Allel 129V segregiert allerdings zusammen mit dem Allel 178N der Mutation D178N mit der CJD, und das Allel 129M zusammen mit dem Allel 178N mit der Familiären Fatalen Schlaflosigkeit (FFI) (GOLDFARB et al. 1992). Verschiedene Phänotypen einer TSE lassen sich also auf unterschiedliche Mutationen im *PRNP* zurückführen.

b) *vCJD des Menschen*

Alle Patienten der Variante CJD tragen homozygot das Allel für Methionin an AS-Position 129. Personen mit homozygot Valin sind anscheinend resistent gegen diese Krankheit (WADSWORTH et al. 2004). Der heterozygote Typ mit 129 V/M wird im Gegensatz zur sporadischen CJD bei der Variante CJD nicht beobachtet (HEAD et al. 2004).

c) *Scrapie des Schafes*

Polymorphismen im ovinen *PRNP* Gen mit Änderungen der Aminosäure-Sequenz haben Einfluss auf die Empfänglichkeit von Schafen für Scrapie (GOLDMANN et al. 1990) und BSE (FOSTER et al. 2001). Insgesamt fünf Haplotypen spielen bei der Scrapie-Empfänglichkeit eine Rolle: ARR, AHQ, ARH, ARQ und VRQ. Tiere mit den Aminosäuren Alanin (A), Arginin (R) und Arginin (R) an den Codons 136, 154 und 171 des ovinen PrP gelten als äußerst wenig empfänglich, wohingegen der Haplotype VRQ (Valin, Arginin, Glutamin) das höchste Erkrankungsrisiko aufweist (HUNTER et al. 1997, BOSSERS et al. 2000). Die EU hat 2004 wegen dieses hohen genetischen Einflusses auf die Empfänglichkeit für Scrapie und BSE ein obligatorisches TSE-Resistenzzuchtprogramm für alle Schafzuchtpopulationen eingeführt. Die Schafe werden nach der Kombination der Allele in die Genotyp-Klassen 1-5 eingestuft. Doch mittlerweile sind auch Scrapie-Fälle von am günstigsten eingestuften Schafen mit dem Genotyp ARR/ARR bekannt geworden (BUSCHMANN et al. 2004a). Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit einem im Jahr 1998 erstmals in Norwegen entdeckten Erregerstamm, der daher auch Nor98 bezeichnet wird (BENESTAD et al. 2003, BUSCHMANN et al. 2004b, GRETZSCHEL et al. 2005). An diesem Stamm in einer Herde meist einzeln erkrankte Tiere werden erst in relativ hohem Alter (6,5 Jahre) mit den

Hauptsymptome Ataxie, Schreckhaftigkeit und Abmagerung klinisch auffällig (BENESTAD et al. 2003). Auch das histopathologische Bild unterscheidet sich von der „klassischen“ Scrapie. Da die Genotypen ARR und AHQ anscheinend häufiger bei dieser „atypischen“ Form vorkommen, muss die Scrapie-Suszeptibilität vom Erregerstamm abhängig gemacht werden.

6. Assoziation zwischen Polymorphismen des bovinen *PRNP* Gens und dem Auftreten der BSE beim Rind

Das *PRNP* Gen des Rindes wurde bereits vor dieser Studie in zahlreichen Arbeiten auf DNA-Polymorphismen untersucht (Tab. 1). Dabei umfassen die meisten Arbeiten das dritte Exon des bovinen *PRNP* mit seiner codierenden Sequenz, die ersten beiden Exons und Teile der Promotorregion wurde nur in wenigen Arbeiten einbezogen.

Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Octapeptid-Repeat-Polymorphismus (Octarepeat) geschenkt, da er sich in der codierenden Region des *PRNP* befindet und eine große Auswirkung auf die Länge der Aminosäuren-Sequenz hat (GOLDMANN et al. 1991, PREMZL et al. 2000). Hierbei werden 24 (-27) bp mit sehr hoher Übereinstimmung in der Sequenz 5-, 6- oder 7-mal hintereinander wiederholt. Überwiegend werden Tiere mit dem 6er Allel beobachtet (95 %), wohingegen das 5er Allel wesentlich seltener auftritt (HEATON et al. 2003). Das 7er Allel wurde bislang nur bei Deutschem Braunvieh entdeckt (SCHLAPFER et al. 1999).

Keine dieser und späterer Studien haben einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im bovinen *PRNP* und BSE untersucht bzw. zeigen können. Zwar berichteten NEIBERGS et al. (1994), dass das Octarepeat-Allel aber nicht der –Genotyp mit der Ausbildung von BSE assoziiert sei, doch konnten diese Ergebnisse in einer anderen Studie von HUNTER et al. (1994) nicht bestätigt werden.

Genomweite Recherchen nach weiteren potentiellen Kandidatengenen in Zusammenhang mit dem Auftreten der BSE führten zu unterschiedlichen Aussagen. HERNANDEZ-SANCHEZ et al. (2002) identifizierte gekoppelte DNA-Marker auf den Chromosomen 5, 10 und 20 per Transmission-Disequilibrium Test (TDT). Mittels einer „quantitative trait loci“-Studie lokalisierten ZHANG et al. (2004) signifikante Kandidatenregionen auf den Chromosomen BTA17 und X/Y, des weiteren andeutungsweise auf den Chromosomen BTA 1, 6, 13 und 19. Das unterschiedliche verwendete Datenmaterial und methodische Differenzen zwischen diesen beiden Studien sind möglicherweise für diese mangelhafte Übereinstimmung verantwortlich.

Tabelle 1*: Bowines PRMP-Gen: Polymorphismen in Datenbankbeiträgen (Stand Dezember 2003)

| Position bez. auf AJ298678 | funkt. Bereich | AJ298678 Hills 2001, 2003 | AF465161 Heaton 2002 | Humeny 2002 | D26150 Yoshimoto 1992 | D10612 Yoshimoto 1992 | AY335912 Heaton 2003 | S55629 Prusiner 1993 | X55862 Goldmann 1991 | AJ132392 Schlaifer 1999 | AF117327 Wolffner 1999 | Takasuga 2003 | AB001468 Horluchi 1998 |
|-------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|
| 65647 | Exon3, ORF | A/C | A/C | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G |
| 65671 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | G/T |
| 65686 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65704 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65715 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65731 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65764 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65788 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65789 | Exon3, ORF | A/G | A/G | C/T | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65802..65825 (4) | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | Octarepeat 5/6 | A/G |
| 65812 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65815 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65897..65898 (4) | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65895 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65900 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65905 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65917 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65938 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 66039 | Exon3, ORF | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 65133 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66154 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66208 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66230 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66253 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66256 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66343 | Exon3, ORF | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 66877 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 66906 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 66948 | Exon 3, UTR | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 67477 | Exon 3, UTR | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | |
| 67598 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 67864 | Exon 3, UTR | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | indel(5) | |
| 68019..68046 | Exon 3, UTR | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | indel AAGAA | |
| 68408..68412 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 68539 | Exon 3, UTR | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | |
| 68620 | Exon 3, UTR | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | C/T | |
| 68652 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 69085 | Exon 3, UTR | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | G/T | |
| 69660 | Exon 3, UTR | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | indel T | |
| 69664..69685 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |
| 69774 | Exon 3, UTR | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | A/G | |

* Die Tabelle umfasst Datenbankbeiträge und Literaturhinweise, die Polymorphismen im bovinen *PRNP* vermerken und vor dieser Arbeit schon bekannt waren. Das dritte Exon ist unterteilt in einen kodierenden (ORF) und untranslatierten (UTR) Bereich. Alle Positionen sind auf den Eintrag AJ298678 bezogen worden.

(1) GGGCGCGGGC

(2) GTAACTTGTCTCCATTTCATGATAATGGTCAAGTTTCTAT

(3) GAACCTGTTA

(4) Octarepeat= 24 (-27) bp in 5, 6 oder 7 Wiederholungen

(5) TTTTGTAAAGTAC

7. Promotoren bei Eukaryonten

Die RNA-Polymerase II bindet an den Promotor des eukaryontischen Gens, der sich in der Nähe des Transkriptionsstartes befindet. Beginnend am Initiator, der drei Basen vor und fünf Basen nach diesem Transkriptionsstart lokalisiert ist, beginnt sie mit der Transkription und synthetisiert mRNA bis zum 3'-Ende des Gens. Dabei benötigt sie allgemeine Transkriptionsfaktoren, welche die Erkennung der charakteristischen DNA-Sequenzelemente eines jeden Promotors übernehmen und die RNA-Polymerase in die korrekte Position bringen. Dieser entstandene basale Transkriptionskomplex bindet an den minimalen Promotor.

Gewebsspezifische oder ubiquitäre Faktoren binden an verschiedene regulatorische sequenzspezifische Promotorelemente und führen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem basalen Transkriptionskomplex und kontrollieren so die Genexpression. Solche Transkriptionsfaktoren können einen stimulierenden oder reprimierenden Einfluss ausüben (Abb. 4, LEWIN 1998).

Einzelne Punktmutationen in diesen Bindungsstellen können die Bindungskapazität zu den spezifischen Transkriptionsfaktoren herabsetzen bzw. Bindungsstellen können neu entstehen, so dass die Genexpression je nach Funktion des Faktors erhöht oder erniedrigt wird. DI PIERRO et al. (2005) zeigten, dass eine einzelne Basensubstitution in der SP1 (Stimulierendes Protein 1) Bindungsstelle des Promotors des Ferrochelatasegens zu reduzierter Transkription und somit zur Ausbildung des Krankheitsbildes der Erythropoetischen Protoporphyrrie führt.

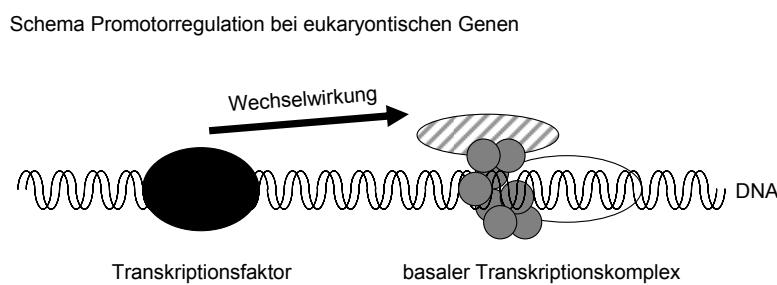


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Regulation eines eukaryontischen Promotors. Transkriptionsfaktoren können durch Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionskomplex den Promotor stimulieren oder inhibieren.

Promotoren können außerdem durch Enhancer stimuliert werden. Diese sind Sequenzabschnitte, die über beträchtliche Entfernung in beiden Orientierungen und von beiden Seiten des Gens wirksam sind. An diesen Sequenzabschnitten binden Proteine, die

durch Wechselwirkung mit dem Transkriptionskomplex zur Stimulation des Promoters führen (LEWIN 1998).

Allerdings wird die mRNA in manchen Fällen posttranskriptional reguliert, so dass unter Umständen die Menge der mRNA nicht mit der Menge des gebildeten Proteins korreliert. Dies ist auch für das zelluläre Prion Protein in Neuronen beschrieben worden (FORD et al. 2002b). Alternative Polyadenylierung der mRNA kann zu solch einer Modulation beitragen (GOLDMANN et al. 1999).

8. Intention der Arbeit

Der genetische Einfluss des *PRNP* Gens auf die Empfänglichkeit von Prionen-Erkrankungen wurde bei Mensch und Schaf hinreichend dargestellt. Bei Rindern hingegen konnte bislang kein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Prion-Protein-Gen und BSE identifiziert werden. Bisherige Studien befassten sich in der Regel mit der kodierenden Region des *PRNP*. Da Mutationen im Promotorbereich zu unterschiedlich hoher Expression des *PRNP* führen und Polymorphismen die Inkubationszeit beeinflussen können (BOSSERS et al. 1996), wurde im Rahmen dieser Studie insbesondere die Promotorsequenz beim Rind in einer Mutationsanalyse des bovinen *PRNP* in Zusammenhang mit dem Auftreten von BSE eingebunden.

Zunächst sollte die natürliche Diversität des *PRNP* Gens deutscher Rinderrassen analysiert werden. Polymorphismen, die die Aminosäuresequenz des Prion-Proteins verändern oder in regulatorisch wichtigen Bereichen des Gens liegen, sollten sodann auch bei BSE erkrankten Tieren aus Deutschland genotypisiert werden, um eine mögliche Assoziation zwischen Polymorphismen im *PRNP* und BSE untersuchen zu können (siehe Kapitel III).

Mutationen im Promotorbereich, die eine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen gesunden und an BSE erkrankten Tieren aufweisen, können für verschiedene Promotoraktivitäten des *PRNP* verantwortlich sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten im zweiten Abschnitt dieser Arbeit identifizierte Polymorphismen im Promotorbereich mit den verschiedenen Allelen in Reportergenkonstrukte kloniert und die Promotoraktivität der unterschiedlichen Konstrukte experimentell in Zellkultursystemen gemessen werden, um Anhaltspunkte für die funktionelle Bedeutung solcher Mutationen zu gewinnen (siehe Kapitel IV). Dabei sollte der kausale Mechanismus, der zur Ausbildung unterschiedlicher Expressionsmuster führt, näher untersucht werden. Bei Vorliegen einer unterschiedlichen Aktivität der verschiedenen Promotorvarianten sollte dieser Einfluss in relevanten Geweben von zufällig beprobten

Schlachtrindern aus Deutschland auf die tatsächliche Expression der unterschiedlichen Genotypen *in vivo* überprüft werden (siehe Kapitel IV).

III. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds

Petra Sander, Henning Hamann, Ina Pfeiffer, Wilhelm Wemheuer, Bertram Brenig,
Martin H. Groschup, Ute Ziegler, Ottmar Distl und Tosso Leeb

Veröffentlicht in: *Neurogenetics* 5 (2004) 19-25

Petra Sander · Henning Hamann · Ina Pfeiffer ·
Wilhelm Wemheuer · Bertram Brenig ·
Martin H. Groschup · Ute Ziegler · Ottmar Distl ·
Tosso Leeb

Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds

Received: 17 September 2003 / Accepted: 27 November 2003 / Published online: 15 January 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Different alleles of the prion protein gene (*PRNP*) of human and sheep are known to be associated with varying susceptibilities to transmissible spongiform encephalopathies. However, no polymorphisms in the bovine *PRNP* gene with an effect on susceptibility to prion diseases have been identified to date. In this study we investigated such polymorphisms in German cattle; 48 healthy animals from six different German cattle breeds and 43 cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) were analyzed. In contrast to previous studies, all three exons as well as the promoter region of the *PRNP* gene were investigated. Sequence variants in the bovine *PRNP* gene could have an impact on the amino acid sequence or the expression level of the prion protein and thus on susceptibility to BSE. We identified a total of 60 polymorphisms in the *PRNP* gene of German cattle. Of these 60 polymorphisms, 36 were newly identified, whereas 24 of these polymorphisms had been described previously. We did not detect any novel polymorphisms affecting the amino acid sequence of the prion protein. However, we identified a 23-bp insertion/deletion polymorphism in the putative *PRNP* promoter region that shows a significant association with BSE susceptibility in our animals.

Database accession BN000291.

P. Sander · H. Hamann · O. Distl · T. Leeb (✉)
Institute of Animal Breeding and Genetics,
School of Veterinary Medicine Hannover,
Bünteweg 17 p, 30559 Hannover, Germany
e-mail: Tosso.Leeb@tiho-hannover.de
Tel.: +49-511-9538874
Fax: +49-511-9538582

I. Pfeiffer · W. Wemheuer · B. Brenig
Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen,
Groner Landstrasse 2, 37073 Göttingen, Germany

M. H. Groschup · U. Ziegler
Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases,
Federal Research Center for Virus Diseases of Animals,
Boddenblick 5a, 17498 Insel Riems, Germany

Keywords Prion · *PRNP* · PrP · Bovine spongiform encephalopathy · Polymorphism · Single nucleotide polymorphism · Haplotype

Introduction

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is one of the prion diseases, which include scrapie in sheep and Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, that are characterized by neurodegenerative symptoms. The disease is manifested by dementia and/or ataxia. According to the widely accepted hypothesis of Prusiner [1] the pathogens are infectious proteins, the so-called prions. The infectious proteins arise from normal cellular proteins (PrP^c), which were postulated to play a role in normal synaptic function [2] or in neurite outgrowth and neuronal survival [3]. The physiological PrP^c can change its normal conformation to the pathological PrP^{sc}, which is infectious. It is generally believed that BSE in cattle is caused by the ingestion of meat and bone meal from scrapie-infected sheep or BSE-infected cattle. BSE poses a threat not only to cattle but also to humans, since the new variant CJD (vCJD) in humans is probably the result of an infection with BSE prions that are contained in meat products from BSE-infected cattle [4, 5, 6].

Breeding cattle lines that are resistant to BSE could be one strategy for eradicating BSE. Certain sequence variations in the gene for the prion protein (*PRNP*) lead to a very low susceptibility to prion diseases in humans and sheep [7, 8, 9, 10, 11]. At present there are no known polymorphisms that affect susceptibility to prion diseases in cattle [12]. We report here a survey of the naturally occurring *PRNP* polymorphisms in German cattle breeds, which have been rarely studied to date. Our study includes all three *PRNP* exons as well as the promoter region, which was proposed to influence the expression level of the prion protein and thus the incubation period of BSE [13].

Materials and methods

DNA samples

DNA was isolated from sperm or blood from different German cattle breeds using the Nucleon BACC2 kit (Amersham Biosciences) or QIAamp 96 DNA Blood kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. Our study included 48 healthy cattle: 8 unrelated animals each of Black-and-White German Holstein, Red-and-White German Holstein, Original German Black Pied, German Yellow, German Fleckvieh, and 4 animals each of German Red Hill and of the Angler breed. Furthermore, we included 43 DNA samples from German BSE-affected cattle of various breeds. Of the 43 BSE-infected animals, 7 were used in the complete mutation analysis, while in the remaining 36 BSE-infected animals only selected polymorphisms were genotyped.

DNA amplification

For the mutation analysis two regions spanning nucleotides 46755–52111 and 65305–69702 of the bovine *PRNP* gene (AJ298878) were amplified as seven overlapping fragments (Table 1). For the direct genotyping of 4 large indel polymorphisms, additional smaller products within the indicated regions were generated (Table 1). PCR was carried out in a 52 µl reaction volume containing 20 ng DNA, 1 unit *Taq* polymerase (GL Biotech), 10 pmol of each primer, 5 mM dNTPs (Roth), and 1.5 mM MgCl₂ in the buffer supplied by the manufacturer. The amplification was performed using an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at the annealing temperature of the specific primer pair for 45 s, and extension at 72°C for 2 min. Finally an extension step at 72°C for 5 min was performed. All PCR products were checked for yield and purity on agarose gels. PCR products intended for DNA sequencing were prepared using the PCR₉₆ Cleanup kit (Millipore).

DNA sequencing

Purified PCR products were directly sequenced with internal sequencing primers. Sequence reactions consisted of 100 ng PCR product, 1.5 µl DYEnamic ET Terminator kit (Amersham Biosciences), 7.5 pmol primer, and 0.5 µl of a dilution buffer (400 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.0) in a total volume of 7.5 µl. Thermal cycling was performed at 94°C for 90 s followed by 35 cycles of 94°C for 20 s, 50°C for 15 s, and 60°C for 2 min. The sequencing reactions were purified on Montage SEQ₉₆ ultrafiltration plates (Millipore) and separated on a MegaBACE 500 capillary sequencer (Amersham Biosciences). Sequence data were analyzed using the software Sequencher 4.1.4 (Gene Codes). The sequence information has been submitted under accession BN000291 to the EMBL database.

Statistical analyses

Allele and genotype distributions were tested for significant associations with BSE infections using Fisher's exact test. To infer haplotypes for combinations of several polymorphisms we used the program HAPLOTYPE 1.0. This program was used in an extended version, which can handle as many as 256 polymorphisms with 100 samples [14].

Table 1 Primer pairs used for PCR in this study

| Name forward primer | Sequence forward primer | Name reverse primer | Sequence reverse primer | Product size (bp) | Product number | Genomic region ^a | Annealing temperature |
|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| PRNP65305_F | AAGCAATGTTGCTGGCATTC | PRNP6845_R | GATGCCAATAAGTGGCTGTG | 1541 | PCR 1 | 65305–66845 | 58°C |
| PRNP66363_F | TAGTAGGATAGGGCAACC | PRNP67933_R | AGGATACACAAAGTGCAG | 1571 | PCR 2 | 66363–67933 | 58°C |
| PRNP67701_F | AAATTAGGTCCCTGGTTCTG | PRNP69702_R | GTGTGCACACTGGTGAAAAC | 2002 | PCR 3 | 67701–69702 | 58°C |
| PRNP46755_F | CACCATTTCCGAATACTACC | PRNP48392_R | ATTGGCCAGCTGAAATG | 1638 | PCR 4 | 46755–48392 | 58°C |
| PRNP48109_F | AAAGGCTGAGTTGGCATT | PRNP49673_R | GCTGGCAAAACCAACGAG | 1565 | PCR 5 | 48109–49673 | 58°C |
| PRNP49443_F | AGCCGCAGAGCTGAGAG | PRNP50640_R | ACCCGGCCATGAGATAAG | 1198 | PCR 6 | 49443–50640 | 56°C |
| PRNP50266_F | GCGAAATTTCCTGGTCCTG | PRNP52111_R | ATTGGTGATCCCAGCCCTTC | 1844 | PCR 7 | 50266–52111 | 58°C |
| PRNP49686_F | TTACCCCTCCCTGGTTAGGAG | PRNP49777_R | CTAGAATTCTACACACCAC | 91/103 | PCR 12 | 49686–49777 | 56°C |
| PRNP67976_F | CTGTTAGAGCAATTAAACATCTG | PRNP68070_R | CTAGGGATTAAACCAACGTC | 97/83 | PCR 14 | 67976–68070 | 60°C |
| PRNP47784_F | GTGCCAGCCATGTAAGTG | PRNP47883_R | TGGACAGGCCACAATGGG | 100/123 | PCR 23 | 47784–47883 | 56°C |
| PRNP65782_F | GGGCCAGCCTCATGGA | PRNP65910_R | TTCCATTGACCGTGGGTA | 129/105 | PCR 24 | 65782–65910 | 55°C |

^a Nucleotide positions refer to AJ298878

Results

Sequence variants

We re-sequenced a total of 9,350 bp of the bovine *PRNP* gene in 55 animals in order to screen for novel *PRNP* polymorphisms in German cattle breeds. The mutation analyses covered two functionally important regions of the bovine *PRNP* gene. The first region consisted of 5,200 bp comprising the putative promoter region together with exons 1 and 2. A region of approximately 2.5 kb upstream of the transcription start site was considered as the promoter region due to its noticeable lack of repetitive sequences. The second investigated region consisted of 4,150 bp containing the entire third exon with the 795 bp *PRNP* open reading frame.

In total we identified 60 *PRNP* polymorphisms (Table 2, Fig. 1). Of these 60 polymorphisms, 36 had not been reported previously; 24 previously described polymorphisms were confirmed in the German cattle breeds in this study. Among the newly identified variants are 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs), 3 polymorphisms involving two adjacent nucleotides, 3 single base insertions/deletions (indels), 1 two-base indel, and 1 23-base indel polymorphism. Most of the newly identified variations are in the 5'-flanking region of the *PRNP* gene. None of the newly identified polymorphisms had an effect on the amino acid sequence of the prion protein. We did not observe any mutation that was only present in BSE-affected animals.

Allele distribution and haplotype structure

To assess whether genetic variants at the *PRNP* locus are associated with BSE susceptibility we selected 4 polymorphisms that either had a demonstrated effect on the prion protein amino acid sequence (octapeptid repeat, [12]) or could have a possible effect on *PRNP* expression. Polymorphisms for the latter group were selected based on the quality of the polymorphisms and their location within the *PRNP* gene, and included the 23-bp indel in the promoter, the 12-bp indel in intron 1 [15], and the 14-bp indel in the 3'-untranslated region (UTR) [16]. The rationale for including only indels was the assumption that these polymorphisms are more likely to have a regulatory effect than single nucleotide substitutions. The 4 described polymorphisms were genotyped in an additional 36 German BSE-affected animals (Fig. 2). The allele frequencies of these polymorphisms are shown in Table 3. The haplotypes of the 4 polymorphic sites were inferred by a Bayesian algorithm and revealed that in our samples six different haplotypes were present (Table 3).

Association with BSE susceptibility

For each of the 4 polymorphisms we investigated whether there were any differences in the allele and/or genotype distributions between healthy and BSE-affected cattle (Table 3). Statistical analysis showed that the allele distribution but not the genotype distribution of the 12-bp indel polymorphism in intron 1 showed statistically significant differences between healthy and BSE-affected cattle. In the case of the newly discovered 23-bp indel in

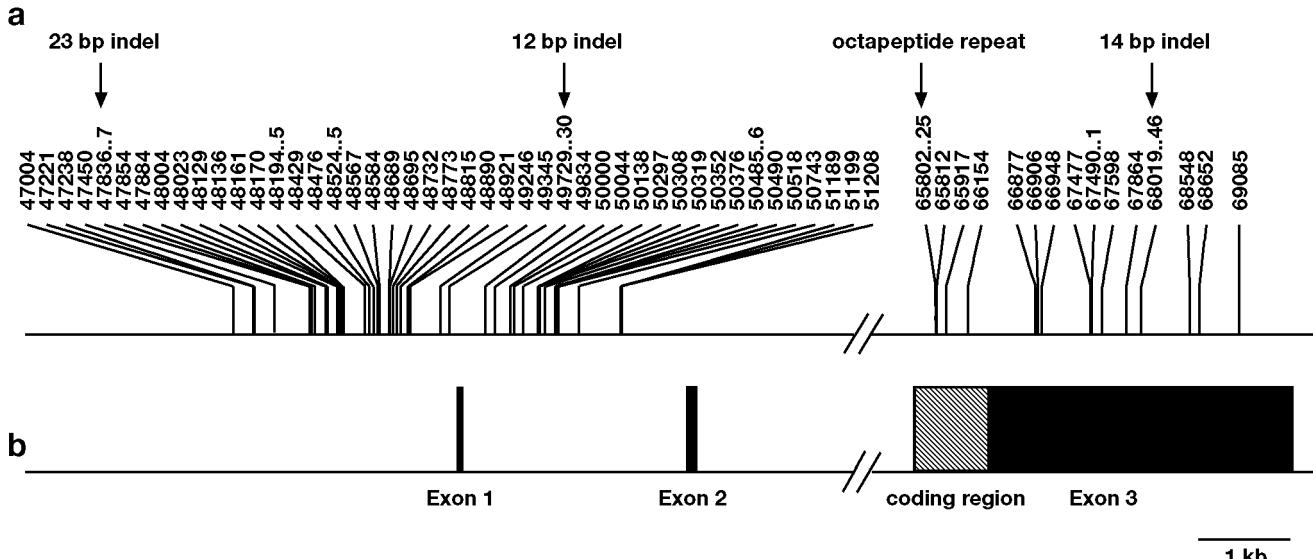


Fig. 1 Diagram illustrating the genomic architecture of the bovine *PRNP* gene. **a** The positions of 60 polymorphisms that were detected in German cattle are indicated with respect to the *PRNP* reference sequence ([15]; AJ298878). The 4 large indel polymor-

phisms that were used for the association analysis with respect to BSE susceptibility are indicated by arrows. **b** The three *PRNP* exons are represented by black boxes, the protein coding region is shown as a hatched box within exon 3

Table 2 Sequence variants in the bovine *PRNP* gene

| Position ^a | Variant | Reference | Allele frequency of the variant ^g |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|--|
| 47004 | A/G | AF465161 | 0.52 |
| 47221 | C/T | AF465161 | 0.42 |
| 47238 | C/T | AF465161 | 0.39 |
| 47450 | C/T | This study | 0.39 |
| 47836..47837 | 23 bp ins ^b | This study | See Table 3 |
| 47854 | A/G | This study | 0.40 |
| 47884 | A/G | This study | 0.40 |
| 48004 | C/G | This study | 0.40 |
| 48023 | A/G | This study | 0.40 |
| 48129 | C/T | This study | 0.40 |
| 48136 | C/G | This study | 0.40 |
| 48161 | A/C | This study | 0.40 |
| 48170 | G/T | This study | 0.40 |
| 48194..48195 | CG/GA | This study | 0.40 |
| 48429 | A del | This study | 0.39 |
| 48476 | C/T | This study | 0.32 ^h |
| 48524..48525 | GG/C | This study | 0.40 |
| 48567 | C/T | This study | 0.40 |
| 48584 | A/C | This study | 0.40 |
| 48689 | C/T | This study | 0.40 |
| 48695 | G/T | This study | 0.41 |
| 48732 | A/C | This study | 0.41 |
| 48773 | A/C | This study | 0.37 |
| 48815 | A/C | This study | 0.40 |
| 48890 | A/T | This study | 0.40 |
| 48921 | C/T | This study | 0.40 |
| 49246 | A/G | AJ298878 | 0.40 |
| 49345 | G/T | [22] | 0.40 |
| 49729..49730 | 12 bp ins ^c | AJ298878 ^f | See Table 3 |
| 49834 | A/G | This study | 0.41 ^h |
| 50000 | A/G | AJ298878 | 0.35 ^h |
| 50044 | C/T | This study | 0.20 ^h |
| 50138 | A/G | This study | 0.41 ^h |
| 50297 | A/G | AJ298878 | 0.41 ^h |
| 50308 | A/G | This study | 0.41 ^h |
| 50319 | A/G | AJ298878 | 0.41 ^h |
| 50352 | A/G | AJ298878 | 0.67 ^h |
| 50376 | A/G | This study | 0.42 ^h |
| 50485..50486 | CC/TT | This study | 0.65 ^h |
| 50490 | C/T | This study | 0.48 ^h |
| 50518 | T del | This study | 0.48 |
| 50743 | G/T | This study | 0.28 |
| 51189 | T del | This study | 0.05 |
| 51199 | A/G | AJ298878 | 0.46 |
| 51208 | C/T | This study | 0.29 |
| 65802..65825 | 24 bp 5/6 ^d | AJ298878 ^f | See Table 3 |
| 65812 | A/G | AJ298878 ^f | 0.40 |
| 65917 | C/T | AY335912 ^f | 0.01 |
| 66154 | C/T | AJ298878 ^f | 0.08 |
| 66877 | C/T | AJ298878 | 0.43 |
| 66906 | A/G | AJ298878 | 0.06 |
| 66948 | C/T | AJ298878 | 0.11 |
| 67477 | G/T | AJ298878 | 0.05 |
| 67490..67491 | AG del | This study | 0.12 |
| 67598 | A/G | AJ298878 ^f | 0.28 |
| 67864 | A/G | AJ298878 | 0.40 |
| 68019..68046 | 14 bp 1/2 ^e | AJ298878 | See Table 3 |
| 68548 | A/T | This study | 0.26 |
| 68652 | C/T | AJ298878 | 0.26 |
| 69085 | A/G | AJ298878 | 0.11 |

^a Position in reference sequence AJ298878^b TCTCAGATGTCTCCAACAGCA^c GGGGGCCGCGGC^d Octapeptide repeat; GCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTG^e TTTTTGTAAGGTAC^f This polymorphism was also mentioned in other studies^g Allele frequency in the 55 sequenced samples^h Incomplete genotyping information because of flanking heterozygous indels

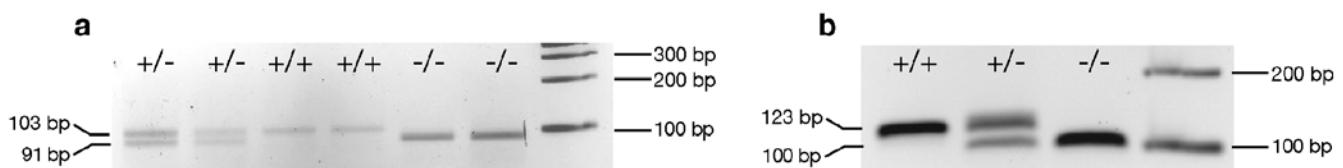


Fig. 2 Genotyping of indel polymorphisms. **a** 4% NuSieve agarose gel showing the genotyping of the 12-bp indel polymorphism in intron 1 of the bovine *PRNP* gene. Genotypes of 6 different animals are indicated as presence (+) or absence (-) of the 12-bp insertion

above the bands. **b** 2% agarose gel with the products of PCR containing the 23-bp indel polymorphism in the 5'-flanking region of the bovine *PRNP* gene. Genotypes of three different animals are indicated above the bands

Table 3 Allele and genotype frequencies

| | 23-bp indel | n | Allele frequency | | | Genotype frequency | | | |
|--------------------------|-------------|----|------------------|-------|---------|--------------------|-------|-------|--------|
| | | | + | - | P | ++ | +- | -- | P |
| Total | | 91 | 0.35 | 0.65 | 0.0296* | 0.13 | 0.44 | 0.43 | 0.0485 |
| Healthy | | 48 | 0.43 | 0.57 | | 0.21 | 0.44 | 0.35 | |
| BSE affected | | 43 | 0.27 | 0.73 | | 0.05 | 0.44 | 0.51 | |
| 12-bp indel | n | | Allele frequency | | | Genotype frequency | | | |
| | | | + | - | P | ++ | +- | -- | P |
| Total | | 91 | 0.41 | 0.59 | 0.0344 | 0.15 | 0.52 | 0.33 | n.s. |
| Healthy | | 48 | 0.49 | 0.51 | | 0.21 | 0.56 | 0.23 | |
| BSE affected | | 43 | 0.33 | 0.67 | | 0.09 | 0.47 | 0.44 | |
| 24-bp indel ^a | n | | Allele frequency | | | Genotype frequency | | | |
| | | | 6 | 5 | P | 66 | 56 | 55 | P |
| Total | | 91 | 0.95 | 0.05 | n.s. | 0.90 | 0.10 | 0.00 | n.s. |
| Healthy | | 48 | 0.95 | 0.05 | | 0.90 | 0.10 | 0.00 | |
| BSE affected | | 43 | 0.95 | 0.05 | | 0.91 | 0.09 | 0.00 | |
| 14-bp indel ^b | n | | Allele frequency | | | Genotype frequency | | | |
| | | | 2 | 1 | P | 22 | 12 | 11 | P |
| Total | | 91 | 0.93 | 0.07 | n.s. | 0.88 | 0.11 | 0.01 | n.s. |
| Healthy | | 48 | 0.95 | 0.05 | | 0.90 | 0.10 | 0.00 | |
| BSE affected | | 43 | 0.92 | 0.08 | | 0.86 | 0.12 | 0.02 | |
| 23+12+24+14 indels | n | | Haplotypes | | | | | | |
| | | | - +62 | - +52 | - -62 | - -61 | + +62 | + +61 | P |
| Total | | 91 | 0.01 | 0.05 | 0.53 | 0.06 | 0.35 | 0.01 | n.s. |
| Healthy | | 48 | 0.01 | 0.05 | 0.46 | 0.05 | 0.43 | 0.00 | |
| BSE affected | | 43 | 0.01 | 0.05 | 0.60 | 0.07 | 0.26 | 0.01 | |

* Nominal significance $P < 0.05$, significance after Bonferroni correction for multiple testing $P < 0.0253$

^a Octapeptide repeat polymorphism, 5 or 6 repeats

^b 14-bp indel, 1 or 2 repeats

Table 4 Allele frequencies of the 23-bp indel in different breeds

| | Black-and-White German Holstein | Red-and-White German Holstein | Original German Black Pied | German Yellow | German Fleckvieh | German Red Hill | Angler |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------|------------------|-----------------|--------|
| 23 bp (-) | 0.61 | 0.66 | 0.69 | 0.44 | 0.79 | 0.75 | 0.30 |
| 23 bp (+) | 0.39 | 0.34 | 0.31 | 0.56 | 0.21 | 0.25 | 0.70 |
| No. of animals | 23 | 16 | 8 | 8 | 14 | 4 | 5 |

the promoter region, the allele distribution and the genotype distribution showed statistically significant differences between healthy and BSE-affected cattle. The allele distribution of the 23-bp indel did not show any

significant associations with the different breeds (Table 4). Analysis of the haplotype frequency did not result in a more obvious division between healthy and BSE-affected cattle. However, the genotype frequency of the haplotypes

still differed significantly between healthy and BSE-affected cattle ($P=0.038$).

Discussion

We analyzed the variability of the bovine *PRNP* gene and investigated a much larger DNA region than most previous studies. We investigated a region that also included the *PRNP* promoter, as it seems possible that mutations affecting the *PRNP* expression level might have an influence on BSE incubation time and BSE susceptibility [13]. The promoter region of the bovine *PRNP* has been partially characterized and includes regulatory sequences in intron 1 [17]. In addition to the data from [17], the noticeably low frequency of repetitive elements in the ~2.5 kb upstream of exon 1 suggested the presence of additional functional elements, which was the rationale for including this region in the analysis. In the region of the newly discovered 23-bp indel, the bovine *PRNP* sequence contains a fragment of retroviral origin. As it has been shown in other instances that such retroviral insertions may constitute essential parts of mammalian promoters [18], the observed 23-bp polymorphism could be an interesting candidate for a hypothetical regulatory mutation. The large ~4.1-kb exon 3 was investigated completely, as it also seemed possible that polymorphisms in the 3'-UTR might influence mRNA processing [19].

In total we found 60 polymorphic sites in the investigated region in the cattle studied. Analysis of existing database entries and publications on other cattle breeds revealed the presence of 48 additional polymorphic sites in this DNA region that were monomorphic in the animals of this study.

Detailed analysis of 4 selected polymorphisms revealed that these 4 polymorphisms give rise to six different haplotypes in the investigated animals. Without recombination one would expect $n+1$ haplotypes between n adjacent polymorphic sites, therefore the existence of six different haplotypes indicates the occurrence of at least one recombination event in the past between these 4 polymorphic sites.

In most of the previous studies on *PRNP* variability, the so-called octapeptide repeat polymorphism (octarepeat) in exon 3 was studied in numerous cattle breeds [12, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. At this site alleles with five, six, and seven octapeptide repeats have been described. In the animals studied here we did not observe the allele with seven octapeptide repeats, and similar to other studies the frequency of the allele with five octapeptide repeats was very low. Consequently, the dominating genotype in the animals was the 6/6 genotype. We did not observe any animals carrying the homozygous 5/5 genotype. Similar to a study in Scottish cattle, we did not detect any significant differences in the allele or genotype distribution of the octapeptide repeat polymorphism between healthy and BSE-infected animals [12].

Some other polymorphisms involving indels of more than 10 bp that might have an influence on *PRNP* expression were also investigated with respect to BSE susceptibility. In contrast to the octapeptide repeat, the allele frequency as well as the genotype frequency of the 23-bp indel revealed a significantly different distribution between BSE-affected and healthy animals. The 23-bp insertion is more frequently found in healthy cattle. It should be emphasized that the allele distribution of this 23 indel polymorphism is comparable between the different breeds of this investigation and that it is not a breed-specific polymorphism. Among the other tested distributions the allele frequency of the 12-bp indel also showed a statistically significant association with BSE, which is not unexpected as the 12-bp and the 23-bp indel are tightly linked. Inclusion of the haplotype information did not reveal a strong association with any specific haplotypes. This might be because in our limited samples some haplotypes were very rare and therefore statistically significant associations could not be detected.

In summary, we have demonstrated a tentative association of BSE susceptibility with the insertion or deletion of a 23-bp motive in the 5'-flanking sequence of the *PRNP* gene. Thus it might be worthwhile investigating this polymorphism in more animals and other breeds to confirm this association.

Acknowledgements This work was supported by the German Research Council (DFG Le1032/10-1) and by the German TSE Research Platform, which is cooperatively funded by the German Federal Ministries for Consumer Protection, Nutrition and Agriculture and for Education and Research. We would like to thank all those who have made sample contributions, especially H. Geldermann for sharing BSE samples. We also thank S. Neander and H. Klippert-Hasberg for expert technical assistance.

References

- Prusiner SB (1998) Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 95:13363–13383
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. Nature 370:295–297
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003) Prion protein as *trans*-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. Mol Cell Neurosci 22:227–233
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Sutcliffe A, McCurdie L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. Nature 389:498–501
- Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. Proc Natl Acad Sci U S A 96:15137–15142
- Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, Welch J, Hill AF, Lloyd SE, Wadsworth JD, Collinge J (2002) BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. EMBO J 21:6358–6366

7. Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J (1990) Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2476–2480
8. Hunter N, Foster JD, Hope J (1992) Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. *Vet Rec* 130:389–392
9. Laplanche JL, Chatelain J, Westaway D, Thomas S, Dussaucy M, Brugere-Picoux J, Launay JM (1993) PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15:30–37
10. Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 76:509–517
11. Bossers A, Vries R de, Smits MA (2000) Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J Virol* 74:1407–1414
12. Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J (1994) Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet Rec* 135:400–403
13. Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA (1996) PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* 77:2669–2673
14. Niu T, Qin ZS, Xu X, Liu JS (2002) Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 70:157–169
15. Hills D, Comincini S, Schlaepfer J, Dolf G, Ferretti L, Williams JL (2001) Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Anim Genet* 32:231–232
16. Hills D, Schlaepfer J, Comincini S, MacLean I, Dolf G, Ferretti L, Olsaker I, Williams JL (2003) Sequence variation in the bovine and ovine PRNP genes. *Anim Genet* 34:183–190
17. Inoue S, Tanaka M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M (1997) Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci* 59:175–183
18. Medstrand P, Landry JR, Mager DL (2001) Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem* 276:1896–1903
19. Goldmann W, O'Neill G, Cheung F, Charleson F, Ford P, Hunter N (2001) PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J Gen Virol* 80:2275–2283
20. Goldmann W, Hunter N, Martin T, Dawson M, Hope J (1991) Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J Gen Virol* 72:201–204
21. Yoshimoto J, Iinuma T, Ishiguro N, Horiuchi M, Imamura M, Shinagawa M (1992) Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells. *Virus Genes* 6:343–356
22. Premzl M, Bozic P, Gamulin V (2000) PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. *Anim Genet* 31:408–409
23. Schlapfer I, Saitbekova N, Gaillard C, Dolf G (1999) A new allelic variant in the bovine prion protein gene (PRNP) coding region. *Anim Genet* 30:386–387
24. Hunyadi A, Schiebel K, Seeber S, Becker CM (2002) Identification of polymorphisms within the bovine prion protein gene (Prnp) by DNA sequencing and genotyping by MALDI-TOF-MS. *Neurogenetics* 4:59–60
25. Walawski K, Czarnik U (2003) Prion octapeptide-repeat polymorphism in Polish Black-and-White cattle. *J Appl Genet* 44:191–195

IV. Bovine prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in Bovine Spongiform Encephalopathy susceptibility

Petra Sander, Henning Hamann, Cord Drögemüller, Kseniya Kashkevich, Katrin Schiebel und Tosso Leeb

Veröffentlicht in: *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 37408-37414

Bovine Prion Protein Gene (*PRNP*) Promoter Polymorphisms Modulate *PRNP* Expression and May Be Responsible for Differences in Bovine Spongiform Encephalopathy Susceptibility^{*§}

Received for publication, June 10, 2005, and in revised form, July 20, 2005. Published, JBC Papers in Press, September 1, 2005, DOI 10.1074/jbc.M506361200

Petra Sander[†], Henning Hamann[†], Cord Drögemüller[†], Kseniya Kashkevich[§], Katrin Schiebel[§], and Tosso Leeb^{†,1}

From the [†]Institute for Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Bünteweg 17p, 30559 Hannover, Germany and the [§]Institute for Biochemistry, University of Erlangen-Nürnberg, Fahrstrasse 17, 91054 Erlangen, Germany

The susceptibility of humans to the variant Creutzfeldt-Jakob disease is greatly influenced by polymorphisms within the human prion protein gene (*PRNP*). Similar genetic differences exist in sheep, in which *PRNP* polymorphisms modify the susceptibility to scrapie. However, the known coding polymorphisms within the bovine *PRNP* gene have little or no effect on bovine spongiform encephalopathy (BSE) susceptibility in cattle. We have recently found a tentative association between *PRNP* promoter polymorphisms and BSE susceptibility in German cattle (Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M., Ziegler, U., Distl, O., and Leeb, T. (2004) *Neurogenetics* 5, 19–25). A plausible hypothesis explaining this observation could be that the bovine *PRNP* promoter polymorphisms cause changes in *PRNP* expression that might be responsible for differences in BSE incubation time and/or BSE susceptibility. To test this hypothesis, we performed a functional promoter analysis of the different bovine *PRNP* promoter alleles by reporter gene assays *in vitro* and by measuring *PRNP* mRNA levels in calves with different *PRNP* genotypes *in vivo*. Two variable sites, a 23-bp insertion/deletion (indel) polymorphism containing a RP58-binding site and a 12-bp indel polymorphism containing an SP1-binding site, were investigated. Band shift assays indicated differences in transcription factor binding to the different alleles at the two polymorphisms. Reporter gene assays demonstrated an interaction between the two postulated transcription factors and lower expression levels of the ins/ins allele compared with the del/del allele. The *in vivo* data revealed substantial individual variation of *PRNP* expression in different tissues. In intestinal lymph nodes, expression levels differed between the different *PRNP* genotypes.

Bovine spongiform encephalopathy (BSE)² is the bovine analog to variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans, scrapie in sheep, chronic

wasting disease in elk and deer, feline spongiform encephalopathy in cats, and transmissible mink encephalopathy. The causative agents of these transmissible spongiform encephalopathies are infectious proteins, the so-called prions according to the widely accepted hypothesis of Prusiner (2). Normal host cellular prion protein (PrP^C) changes its conformation due to triggering by inoculated scrapie PrP^{Sc}. Ingestion of meat and bone meal from scrapie-infected sheep and BSE-infected cattle initiated the large BSE outbreak in the United Kingdom in the last decade of the 20th century (3). Prions are transported eventually from the gastrointestinal tract to the brain, in which spongiform degeneration of brain structure leads to neurodegenerative disorder. There is evidence that the immune system is involved in this process. Specifically, intestinal lymph nodes, B-lymphocytes, follicular dendritic cells, and the spleen are essential for carrying PrP^{Sc} to the target organ brain (4–9).

At least for some transmissible spongiform encephalopathies, host genetic factors modulate susceptibility to prion infection. This phenomenon was initially discovered in sheep, in which several mutations within the coding sequence of the prion protein gene (*PRNP*) are known to lead to increased or decreased scrapie susceptibility (10–14). In humans, a polymorphism at codon 129 of the *PRNP* coding sequence is strongly correlated with susceptibility to variant Creutzfeldt-Jakob disease, as all human variant Creutzfeldt-Jakob disease patients share the homozygous Met¹²⁹/Met¹²⁹ genotype, whereas Val¹²⁹/Val¹²⁹ and heterozygous individuals have not been diagnosed with variant Creutzfeldt-Jakob disease so far. However, in cattle, none of the known polymorphisms within the bovine *PRNP* coding sequence seem to have an influence on BSE susceptibility. Alternatively, it has been speculated that the promoter region of the *PRNP* gene might influence the expression level of the protein and thus the incubation period of transmissible spongiform encephalopathies (15).

We previously reported the first tentative association of BSE susceptibility with polymorphisms in the *PRNP* gene promoter (1). In our previous study, the allele frequencies at two linked insertion/deletion (indel) polymorphisms within the bovine *PRNP* promoter differed significantly between the 48 healthy and 43 BSE-affected German cattle analyzed. The most common haplotypes at these two polymorphisms contained either both insertions (referred to as ins/ins) or both deletions (referred to as del/del). The frequency of the del/del haplotype was higher in the BSE-affected group. We therefore hypothesized that the observed differences in haplotype frequencies may reflect differences in *PRNP* promoter activity. According to this hypothesis, the del/del allele, which was over-represented in the affected group, should show stronger promoter activity than the ins/ins allele. To test our hypothesis, we investigated the functional properties of different allelic variants of the

* This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Le1032/10; the Bavarian Prion Research Initiative; and the German TSE Research Platform, which is cooperatively funded by the German Federal Ministries for Consumer Protection, Nutrition, and Agriculture and for Education and Research. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–3 and Tables 1–3.

¹ Present address and to whom correspondence should be addressed: Institute of Genetics, Bremgartenstr. 109a, 3001 Berne, Switzerland. Tel.: 41-31-631-2326; E-Mail: Tosso.Leeb@itz.unibe.ch.

² The abbreviations used are: BSE, bovine spongiform encephalopathy; PrP, prion protein; PrP^C, cellular prion protein; PrP^{Sc}, scrapie prion protein; indel, insertion/deletion; qRT, quantitative real-time; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; PT, proximal tubular; SP1, stimulating protein-1; RP58, repressor protein of 58 kDa; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; POZ, pox virus and zinc finger protein; AP2, activator protein-2; EGR4, early growth response-4; BCL6, B-cell lymphoma-6.

bovine *PRNP* promoter by performing reporter gene assays *in vitro* and by quantitative real-time (qRT) PCR *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

In Silico Analysis of Transcription Factor-binding Sites—The computer software MatInspector was used to scan the bovine *PRNP* promoter region for possible transcription factor-binding sites (16). The region spanned from positions 46754 to 51993 according to the bovine *PRNP* genomic sequence (GenBank™ accession number AJ298878), including the putative promoter (17). Different allelic variants of the promoter sequence as determined previously (1) were analyzed for differences in transcription factor-binding site content (see Fig. 1A).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)—Nuclear extracts were prepared from bovine brain and PT cells transfected with the vector pRP58 (see below) following the protocol of Dignam *et al.* (18). Approximately 50-bp oligonucleotides surrounding polymorphisms –1980T→C, –1594indel23bp, –85G→T, +300indel12bp, +571A→G, and +709A→G were designed with both alleles (see Fig. 1A). The oligonucleotides with the sequence surrounding the polymorphism +571A→G were used for EMSA with the gel shift assay system (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The other oligonucleotides were double-stranded and 32 P-labeled and used at 25 fmol for DNA-protein binding reactions with 1 μ g of poly[d(I-C)], 10 μ g of bovine serum albumin, 5 \times binding buffer (250 mM HEPES/NaOH (pH 7.9), 50 mM MgCl₂, 750 mM to 1.5 M NaCl, 5 mM dithiothreitol, 5 mM EDTA, and 25% glycerol), 2.25–8.75 μ g of nuclear extract or 300 ng of recombinant human SP1 extract (Promega), and possibly 250 fmol or 2.5 pmol of unlabeled double-stranded oligonucleotide as specific or nonspecific competitor. The binding reactions were incubated for 10 min on ice. Electrophoresis of the samples through a native 8% polyacrylamide gel (19:1 acrylamide/bisacrylamide) in 1 \times Tris borate/EDTA buffer was followed by autoradiography.

Promoter-Reporter Gene Constructs—All constructs prepared are shown in Fig. 1B. A PCR product including 2676 bp of the 5'-flanking sequence, exon 1, intron 1, and the first part of exon 2 of the bovine *PRNP* gene was cloned as an MluI-BglII fragment into the promoterless reporter vector pGL3-Basic (Promega). The following primers were used for this PCR: 5'-ATA ATT ACG CGT TCA CCA TTT CCG AAT ACA TCC-3' (forward) and 5'-TAA TTA AGA TCT TGG ATT TGT GTC TCT GGG AAG-3' (reverse). The template for generating this fragment was the bovine bacterial artificial chromosome clone CH240-120O1. The resulting construct represented the new vector pDelDel, with deletions at both –1594indel23bp and +300indel12bp.

The mutant with a 12-bp insertion at +300indel12bp, termed pDelIns, was generated by a splice overlap extension reaction on the template pDelDel (19). The mutant pInsDel with a 23-bp insertion at –1594indel23bp was made by primer extension ligation on the template pDelDel. The construct with both insertions (pInsIns) was derived by combining plasmids pInsDel and pDelIns using the restriction sites MluI and AatII.

The constructs p12Ins and p12Del were created by elongase PCR amplification (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's protocol by a touch-down protocol (20) using primers 5'-CAA GAG ATC TAG AGA TGC TTC ACT GCC CCC AAT GTG CC-3' (forward) and 5'-ATT TAG ATC TCT GGG AAG ACA GAT GCT TCG GGG CGG-3' (reverse). Genomic DNA from an animal homozygous for the 12-bp insertion or DNA from an animal homozygous for the 12-bp deletion was used as a template. The PCR products were cloned into the pGL3-Basic vector.

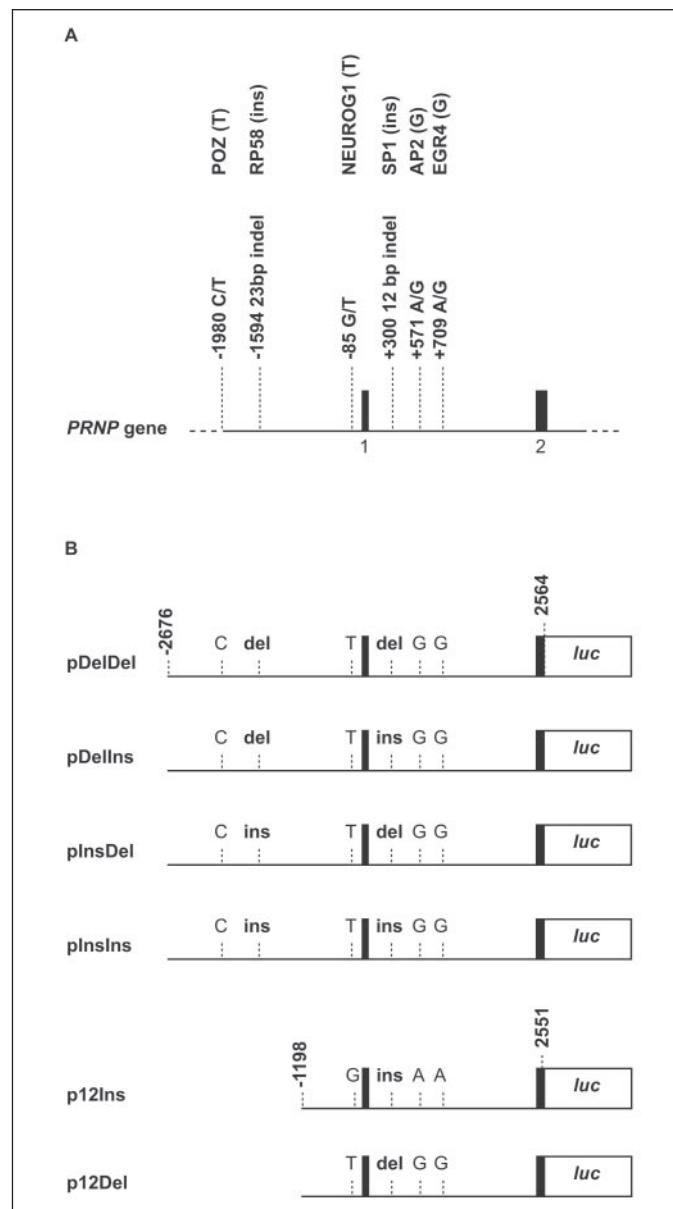


FIGURE 1. Schematic representation of the 5'-end of the bovine *PRNP* gene and the reporter gene constructs used in this study. *A*, the first two untranslated exons of the bovine *PRNP* gene are indicated as boxes. Six naturally occurring polymorphisms that affect predicted transcription factor-binding sites are indicated above the schematic gene map. The positions of the polymorphisms are given with respect to the transcription start site (position 49430 in GenBank™ accession number AJ298878). Six transcription factors whose binding sites are affected by the polymorphisms are indicated, with the respective alleles containing the binding sites in parentheses. *NEUROG1*, neurogenin-1. *B*, six reporter gene constructs in the pGL3-Basic vector were prepared. In these constructs, various alleles of the bovine *PRNP* promoter drive the expression of firefly luciferase (*luc*).

The RP58-expressing vector pRP58 was generated by cloning a PCR product with the cDNA from the human *RP58* gene into the pGL3-Control vector (Promega), replacing its luciferase box. PCR was carried out on the template clone IRAKp961E13474Q. The clone carries one discrepancy with respect to RP58 (GenBank™ accession number NM_006352), c.324C→A. This potential cloning artifact was corrected by site-directed mutagenesis so that pRP58 conformed to accession number NM_006352. The restriction sites HindIII and XbaI were used for cloning this PCR product into the pGL3-Control vector. The expression vector pRSV/SP1 was a kind gift from M. Wegner (University of Erlangen-Nürnberg). The XbaI fragment from plasmid pSP1-778C (21)

Bovine PRNP Promoter

TABLE ONE

Polymorphisms within the bovine PRNP promoter that affect transcription factor-binding sites

| Transcription factor | Binding site position | Orientation | Consensus binding site | Binding allele | Non-binding allele |
|----------------------|-----------------------|-------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| POZ (BCL6) | -1980 | + | gcTAGAaa | gcTAGAaa | gcCAGAaa |
| RP58 (ZNF238) | -1594 | - | gaCATCtg | gaCATCtg (23-bp insert) | 23-bp deletion |
| NEUROG1 | -85 | - | CCAGctg | CCAGctg | CCAGgg |
| SP1 | +300 | + | gGGCGg | gGGCGg (12-bp insert) | 12-bp deletion |
| AP2 (TFAP2A) | +571 | - | ggCCCAcgacgc | ggCCCAcgacgc | ggCCCAcgaggc |
| EGR4 | +709 | + | GCGTgcg | GCGTgcg | GCGTacg |

was cloned into the vector pRSV as described (22). All PCRs were carried out with proofreading polymerases, and all constructs were sequenced to verify successful cloning.

Cell Culture and Transient Transfection Experiments—The bovine cell lines KOP (esophageal tissue of a calf) and PT (kidney cells of a calf) were obtained from the Friedrich Loeffler Institute (Isle of Riems, Germany). These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with stable glutamine and 1 g/liter D-glucose (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrom AG) at 38 °C and 5% CO₂.

For transient transfection assays, ~6 × 10⁴ PT cells or 3 × 10⁴ KOP cells were seeded 24 h before transfection into 12-well plates (Biochrom AG). Cells reaching 60–80% confluence were transfected using 1.2 μl of Effectene reagent and 1.2 μl of Enhancer reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). If constructs were transfected without a transcription factor-building plasmid, 135 ng/well each test construct and 15 ng/well (10%) pRL-TK (*Renilla* luciferase reference control plasmid, Promega) were used. If cotransfection with pRSV/SP1 and/or pRP58 was performed, 75 ng/well each test construct, 15 ng/well pRL-TK, and 30 ng/well transcription factor plasmids were used. The pRP58 plasmid was also used alone in transfections (450 ng/25-cm² flask) for nuclear extract preparation. Cells were harvested 48 h after transfection using 200 μl of passive lysis buffer (Promega). Lysates were frozen until all experiments had been performed. All samples were measured for firefly and *Renilla* luciferase activities with a Lucy 2 luminometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Germany) using the Dual-Luciferase assay system (Promega). 50 μl of luciferase assay reagent II were injected into 10 μl of each lysate; and after a 2-s delay time and a 10-s measurement of the firefly luminescence, 50 μl of Stop & Glo reagent were injected into each well, followed by a second luminescence measurement. Relative luciferase activities are defined as the ratio of the firefly luciferase to *Renilla* luciferase mean value of each construct relative to the pGL3-Control vector, which contains the SV40 promoter. The constructs pDelDel, pDelIns, pInsDel, and pInsIns were transfected alone in three separate experiments. Cotransfection of these constructs in combination with the transcription factor expressing plasmid pRP58 or pRSV/SP1 was performed in two or three separate experiments, respectively. All assays were carried out in triplicates and in both cell lines (KOP and PT).

RNA Isolation and qRT-PCR—Tissues from ~6-month-old calves were isolated from the liver, spleen, brain stem, and intestinal lymph nodes directly after slaughtering in a commercial slaughterhouse. They were stored in RNAlater reagent (Qiagen GmbH), and the RNA was isolated using the RNeasy 96 universal tissue kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription into cDNA was performed using 4 units of Omniscript (Qiagen GmbH), an oligo(dT) primer ((T)₂₄V), and 2 μl of the isolated RNA in a 20-μl reaction. The expression levels of bovine *PRNP* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; used as an endogenous control) were determined using the following primer pairs: *PRNP*, 5'-TCC CAG

AGA CAC AAA TCC AAC TT-3' (forward) and 5'-TGT GGC TTT TCA CCA TGA TGA-3' (reverse); and *GAPDH*, 5'-GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA-3' (forward) and 5'-CCC TCC ACG ATG CCA AAG T-3' (reverse). A specific TaqMan probe for each PCR (VIC®-labeled *PRNP* probe, 5'-TGA ATC ACA GCA GAT ATA A-3'; and FAM™-labeled *GAPDH* probe, 5'-ATA CCC TCA AGA TTG TCA GCA ATG CCT CCT-3') was also used. qRT-PCR was carried out with an ABI 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) in a 20-μl reaction containing TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems), 50 μM forward primer, 50 μM reverse primer, and 10 μM TaqMan probe at an annealing and elongation temperature of 60 °C. A standard curve from linearized plasmids carrying the cloned target sequence from the *PRNP* and *GAPDH* genes was arranged over 5 log levels on each plate. The *PRNP* expression level was normalized by dividing it by the bovine *GAPDH* expression level. All assays were performed in duplicates.

DNA Isolation and Genotyping—A second piece of each tissue sample used for RNA isolation was used for DNA isolation with the Nucleospin 96 tissue kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). To determine the genotype with respect to the indel polymorphisms -1594indel23bp and +300indel12bp, PCRs flanking the polymorphisms were carried out as described above, and product sizes were evaluated on agarose gels (1).

Statistical Analysis—Differences between constructs were tested for significance using the procedure MIXED of the SAS software package (23). A linear model was applied, including the effects of the constructs and the repeated measurements. Contrasts between least-square means were calculated and tested for significance in both cell lines separately. All *p* values are provided in supplemental Tables 1–3. The same model was used for the qRT-PCR data from the four different bovine tissues.

RESULTS

Putative Transcription Factor-binding Sites—The bovine *PRNP* promoter region from positions -2676 to +2564 was screened *in silico* for transcription factor-binding sites. This region comprises 5'-flanking sequence as well as intron 1 because it has been shown that both regions contribute to promoter activity (17).

All alleles for each polymorphic position were screened for transcription factor-binding sites. This led to the identification of 18 differences in putative transcription factor-binding sites between the different alleles. We excluded 12 of these differential sites based on the properties of the potentially binding transcription factors. For example, we did not follow up a differential transcription factor-binding site of hepatic nuclear factor-4, as this transcription factor is involved mainly in liver-specific gene regulation. Consequently, we selected six transcription factor-binding sites that seemed most likely to be functionally relevant for the regulation of *PRNP* transcription (TABLE ONE).

Binding of Putative Transcription Factors to Selected Sections of the PRNP Promoter—Oligonucleotides surrounding the six selected polymorphic transcription factor-binding sites were designed and used as

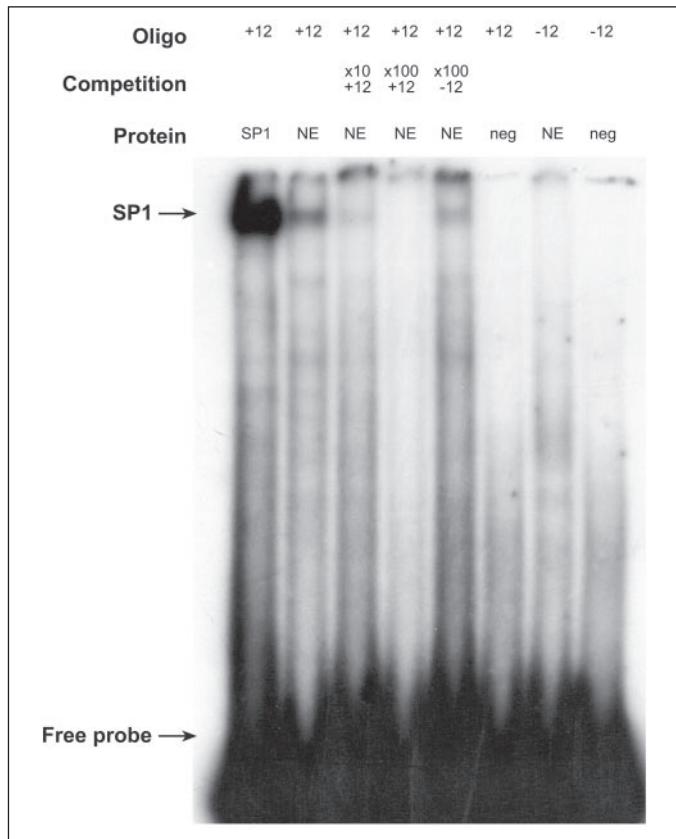


FIGURE 2. EMSA analysis of SP1 binding to the PRNP promoter sequence. 25 fmol of 32 P-radiolabeled double-stranded oligonucleotides (*Oligo*) corresponding to the two alleles at the 12-bp indel polymorphism in intron 1 were used as probes: +12, 5'-CTG GGA ATG TGG GCG GGG GCC GCG GCT GGC TG TCC CCC TC-3' (sense); and -12, 5'-CAT TTA CTC GGA ATG TGG GCT GG CTG TGG TCC CCC TCC CGA G-3' (sense). Competitions were performed by the addition of unlabeled double-stranded oligonucleotides (250 fmol or 2.5 pmol) to the binding reaction. The binding buffer contained 0.75 M NaCl. Purified SP1 protein (300 ng/lane) was used as a positive control. Nuclear extract (NE; 5.25 μ g/lane) was prepared from bovine brain. Negative controls (*neg*) lacked protein. The +12 oligonucleotide probe produced a shift with purified SP1 protein and with nuclear extract from bovine brain. The observed SP1 binding to the +12 oligonucleotide was specific, as it could be competed with the unlabeled +12 oligonucleotide, but not with the nonspecific unlabeled -12 oligonucleotide. The shifted band with nuclear extract was the same size as the shifted band with purified SP1, which also corroborates the identity of the bound protein. The labeled -12 oligonucleotide did not bind SP1.

probes in EMASAs. Every probe was designed with one or the other allele of the polymorphisms described in TABLE ONE.

The most striking differences in transcription factor binding to different *PRNP* alleles were observed in the case of the 12-bp indel polymorphism at position +300 and the transcription factor SP1 (Fig. 2). The 12-bp insertion allele was able to bind SP1, whereas the 12-bp deletion allele did not bind SP1.

EMSA was also performed with the potential RP58-binding site within the 23-bp indel polymorphisms at position -1594 in the 5'-flanking sequence. Using the same brain nuclear extract as used in the SP1 EMASAs, no band shifts were initially visible (data not shown). However, reproducible band shifts with nuclear extracts from prP^c-overexpressing cells were obtained (Fig. 3). The experiment showed that the 23-bp insertion allele produced strong and specific band shifts with transcription factor RP58. However, the deletion allele produced only a weak band shift that could be competed with the unlabeled insertion allele, indicating that RP58 has a higher affinity for the insertion allele than for the deletion allele.

The polymorphic transcription factor-binding sites for POZ (position -1980), neurogenin-1 (position -85), AP2 (position +571), and

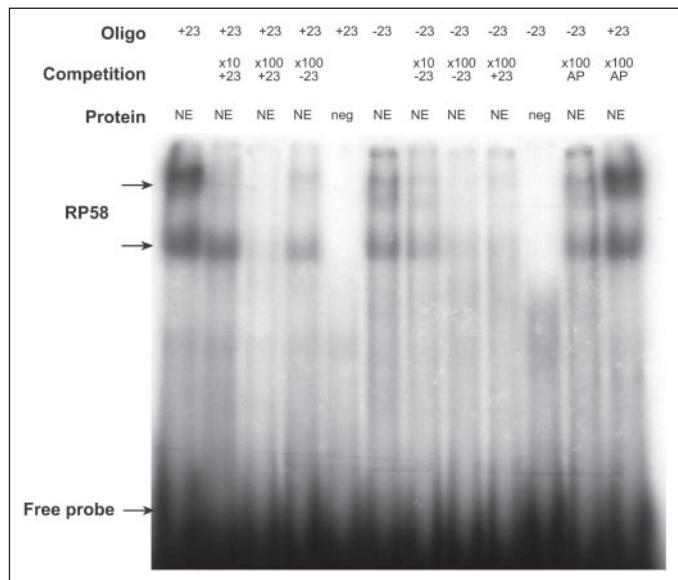


FIGURE 3. EMSA analysis of RP58 binding to the PRNP promoter sequence. 25 fmol of 32 P-radiolabeled double-stranded oligonucleotides (*Oligo*) corresponding to the two alleles at the 23-bp indel polymorphism in the 5'-flanking sequence were used as probes: +23, 5'-TAG CTA TCA CGT CAA TCT CAG ATG TCT TCC CAA CAG CAG CCT CAG ACG TCA TG-3' (sense); and -23, 5'-ATT CCA ACT CCT AGC TAT CAC GTC AAG CCT CAG ACG TCA TGG GGC AGA GTC A-3' (sense). Competitions were performed by the addition of the unlabeled +23 or -23 oligonucleotide (250 fmol or 2.5 pmol) or the unlabeled AP_G oligonucleotide (2.5 pmol; sense, 5'-GGC GTG AGG AGT GCC GGA TCC GTG GGC CCC CAG CCG C-3') to the binding reaction. The binding buffer contained 1.125 M NaCl. Nuclear extract (NE; 3.33 μ g/lane) was prepared from PT cells transfected with an expression construct for transcription factor RP58. Negative controls (*neg*) lacked protein. The +23 oligonucleotide produced a strong band shift that could be competed with an excess of the unlabeled +23 oligonucleotide. Competition with the -23 oligonucleotide reduced the intensity of the shifted bands; however, it did not completely abolish binding of RP58 to the +23 oligonucleotide. On the other hand, the -23 oligonucleotide produced a weak band shift with RP58 that could be competed with both the unlabeled -23 and +23 oligonucleotides. The completely unrelated AP_G oligonucleotide was not able to compete with either the +23 or -23 band shift.

EGR4 (position +709) were also evaluated in similar EMASAs (supplemental Fig. 1). In these four instances, no conclusive differences in the binding properties of the different respective alleles were observed. Both allelic POZ probes produced identical band shift patterns with two shifted bands for each probe. In the case of the -85G→T polymorphism, both allelic probes led to a shifted band of the same size. The shifted band with the G allele had a higher intensity; however, as this allele was predicted to be the non-binding allele for NEUROG1, the polymorphism was not further studied. Both allelic AP2 probes did not produce any band shift, whereas a control oligonucleotide with a perfect AP2 consensus site led to a shifted band of the expected size. In the case of EGR4, both allelic probes produced identical band shift patterns with two bands for each probe. This led to the conclusion that only the 23- and 12-bp indel polymorphisms are involved in differential allelic *PRNP* promoter modulation and thus in PrP^c expression. Therefore, our further experiments focused on these two polymorphisms.

Promoter-Reporter Gene Assays—Plasmids pDelDel, pDelIns, pInsDel, pInsIns, p12Ins, and p12Del carrying the firefly luciferase open reading frame under the control of different *PRNP* promoter alleles were cotransfected into two different bovine cell lines, PT and KOP, with the pRL-TK normalization vector (Fig. 1). Each assay was carried out in triplicates at 6 (PT) or 5 (KOP) separate weeks ($n_{PT} = 18$ and $n_{KOP} = 15$). Every week, cells were also transfected with the pGL3-Control vector for standardization of these six or five passages. The activity of firefly luciferase compared with that of *Renilla* luciferase reflected the promoter activity. The mean values of each test construct are indicated in Fig. 4.

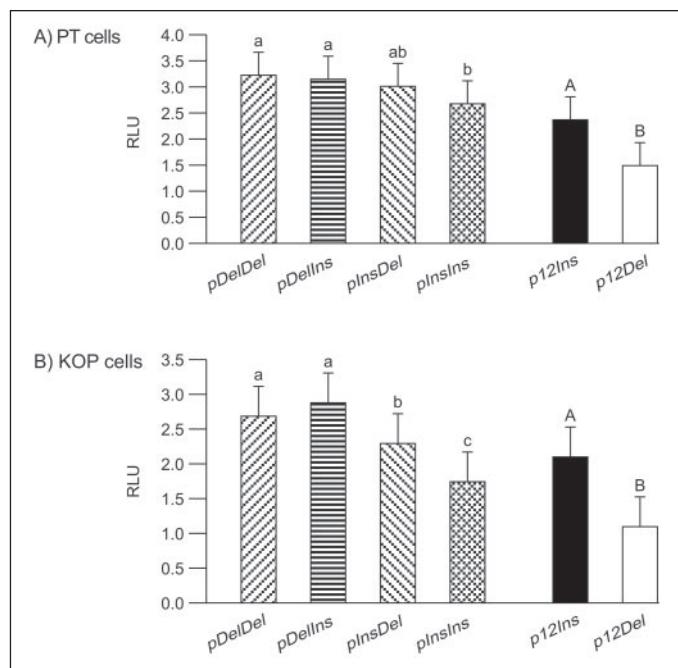


FIGURE 4. Reporter gene assays: effect of different polymorphisms of the bovine *PRNP* promoter on its activity in PT and KOP cells. The data show the expression levels of the firefly luciferase activity of each construct compared with the *Renilla* luciferase activity of the pRL-TK normalization vector. The pGL3-Control vector (with the standard SV40 promoter) was used for normalization between different experiments (relative light units (RLU) = (firefly luciferase_{construct}/Renilla luciferase_{construct})/(firefly luciferase_{control}/Renilla luciferase_{control})). Cells were harvested 48 h after transfection. Error bars indicated S.E. The letters represent significantly different expression levels ($p < 0.05$), e.g. if two columns do not share a common letter, then they are significantly different, with $p < 0.05$.

In both cell lines, the p12Ins vector yielded a significantly higher expression level than the p12Del vector ($p < 0.0001$). The order of expression levels of the longer reporter gene constructs in PT cells was as follows: pDelDel, pDellns, pInsDel, pInsIns. In KOP cells, the order was as follows: pDellns, pDelDel, pInsDel, pInsIns. In both cell lines, the pDelDel vector yielded significantly higher expression levels than the pInsIns vector ($p_{\text{KOP}} < 0.0001$ and $p_{\text{PT}} = 0.0034$). Thus, the effect of the isolated 12-bp indel polymorphism in the shorter reporter gene constructs p12Ins and p12Del was reversed in the longer reporter gene constructs pInsIns and pDelDel. The pInsDel and pDellns constructs displayed inconsistent expression levels in the two cell lines. However, it must be kept in mind that pDellns is a very rare haplotype and that pInsDel has not yet been found in an animal at all, not in the previous studies (1) or in the present qRT-PCR study (see below).

Promoter-Reporter Gene Assays with Overexpression of Specific Transcription Factors—We transfected the PT and KOP cell lines with the pDelDel, pDellns, pInsDel, pInsIns, p12Ins, and p12Del plasmids, similar to the initial reporter gene assays. In addition to the reporter gene constructs, the transcription factor-expressing plasmids pRP58 and pRSV/SP1 were added to some wells. This study was performed in triplicates at 3 (PT) or 2 (KOP) separate weeks ($n_{\text{PT}} = 9$ and $n_{\text{KOP}} = 6$) (supplemental Fig. 2).

The addition of pRSV/SP1 to the p12Ins and p12Del vectors resulted in elevated luciferase expression levels with both constructs in PT cells, but only with p12Del in KOP cells (PT, $p_{\text{p12Ins}} = 0.0078$ and $p_{\text{p12Del}} < 0.0001$; and KOP, $p_{\text{p12Del}} < 0.0001$). In PT cells, the increase in expression was also much more pronounced with p12Del than with p12Ins. The p12Del reporter gene construct includes three putative SP1-binding sites (positions -98 to -93, +351 to +356, and +901 to +906). In addition to these three SP1-binding sites, the

p12Ins vector harbors an additional one within the 12-bp insertion at position +300.

In the long constructs, the overexpression of SP1 consistently led to slightly increased luciferase expression if the 23-bp deletion was present at position -1594, regardless of whether the 12-bp indel polymorphism with the SP1 site was present or not. However, in three of four assays with the 23-bp insertion at position -1594, the overexpression of SP1 had no significant effect on luciferase expression. SP1 overexpression also led to an increase in reporter gene expression with pInsIns in the PT cell line. Thus, the presence of the 23-bp insertion in the 5'-flanking sequence seemed to reduce the SP1-induced activation of the *PRNP* promoter. The overexpression of recombinant RP58 also increased luciferase expression in all four constructs with the 23-bp deletion at position -1594, whereas the expression level did not change significantly in all four constructs with the 23-bp insertion.

qRT-PCR Experiments—We collected 96 bovine tissue samples from each the brain stem, intestinal lymph nodes, spleen, and liver. RNA was isolated and used for qRT-PCR experiments measuring the absolute transcript quantities of the *PRNP* and *GAPDH* genes by the standard curve method. A relative quantification was performed by dividing the *PRNP* expression level by the *GAPDH* expression level. DNA from the same tissue samples was used for genotyping with regard to the 23- and 12-bp indel polymorphisms. Five different genotypes were identified: 23del:12del ($n = 27-30$), 23del:12het ($n = 5-6$), 23het:12het ($n = 39-41$), 23het:12ins ($n = 6-7$), and 23ins:12ins ($n = 15-16$). The results from qRT-PCR were evaluated with respect to these five genotype groups.

The expression levels of the four different tissues differed widely. The highest *PRNP* mRNA expression levels were encountered in the brain, followed by the spleen, liver, and intestinal lymph nodes. Within these tissue groups, the brain stem, spleen, and liver showed no significant differences in mean expression levels with respect to the genotypes. In lymph node samples, the 23het:12ins expression levels were lower than the 23del:12del, 23del:12het, and 23het:12het expression levels (supplemental Fig. 3). The raw data were not in a normal distribution. Often, single animals showed dramatic variations relative to the average. Intestinal lymph node expression levels of the most common genotypes are shown in Fig. 5. The liver expression levels were an exception; here, the raw data fit better to a normal distribution, and smaller standard errors were observed compared with the other tissues. The complete qRT-PCR data from all tissues are shown in supplemental Fig. 3.

DISCUSSION

In a previous mutation analysis of the bovine *PRNP* gene (1), we investigated a region that includes the *PRNP* promoter. We hypothesized that mutations affecting the *PRNP* expression level might have an influence on BSE incubation time and/or BSE susceptibility. We demonstrated a tentative association of BSE susceptibility with respect to the *PRNP* genotypes at the 23-bp indel polymorphisms in the 5'-flanking sequence and the 12-bp indel polymorphism in intron 1. The 12-bp indel polymorphism and a couple of single nucleotide polymorphisms within the putative promoter region are in strong linkage disequilibrium with the 23-bp indel polymorphism. We presumed that one of these polymorphisms might have an influence on the promoter activity leading to modified susceptibility.

The mutations -1980T→C, -1594indel23bp, -85G→T, +300indel12bp, +571A→G, and +709A→G were preselected for further experiments by an *in silico* analysis of transcription factor-binding sites. Allelic variants at these six potential transcription factor-binding sites differ with respect to the consensus binding sites, and the involved transcription fac-

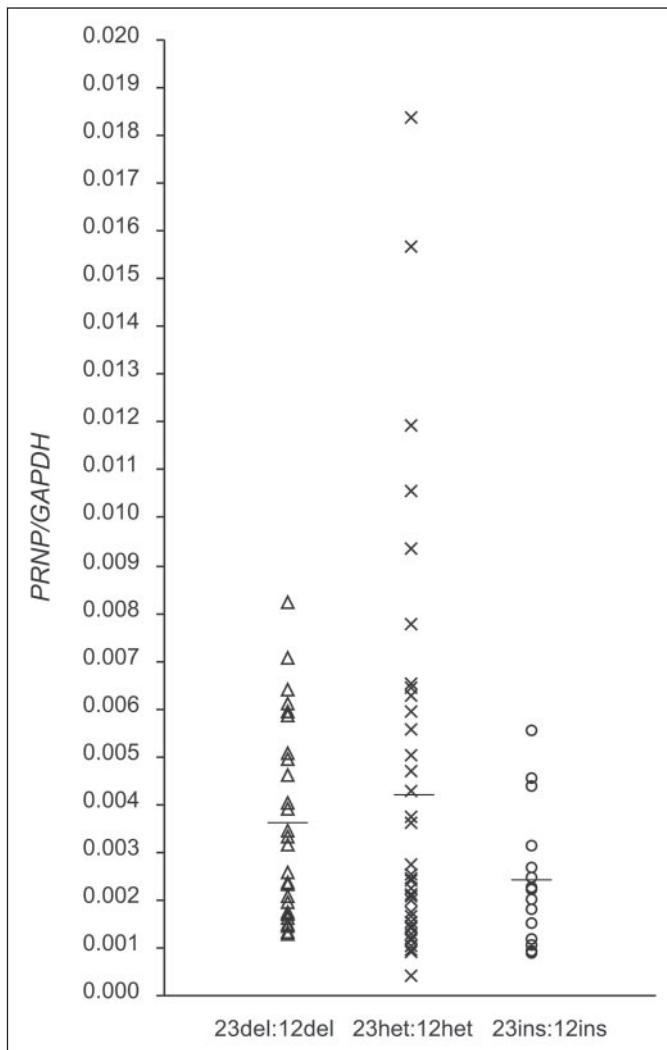


FIGURE 5. Expression levels of *PRNP* in cattle intestinal lymph nodes with different *PRNP* promoter genotypes. RNA was isolated from 96 bovine tissue samples. Transcript quantities were analyzed by qRT-PCR. Absolute *PRNP* and GAPDH expression levels were determined by the standard curve method. The relative expression levels of *PRNP* normalized to bovine GAPDH (*PRNP*/GAPDH) are shown for all animals with the common genotypes 23ins:12ins, 23het:12het, and 23del:12del. The mean values of each genotype group are indicated by horizontal lines.

tors are themselves expressed in relevant tissues for BSE pathogenesis. These putative transcription factors are SP1, AP2, RP58, NEUROG1, EGR4, and POZ. SP1 is a ubiquitous protein and is involved in the regulation of many promoters (24). AP2 plays a role in tissues of ectodermal origin (25). RP58 was named according to its function and is expressed mainly in the brain (26, 27). It includes a POZ domain, which has been described as an interactor with SP1. It has been suggested that the POZ domain represses transcription by interfering with the DNA-binding activity of SP1 (28). EGR4 (also called nerve growth factor-induced clone C) is like neurogenin-1, a protein that is most likely involved in brain function (29, 30). The transcription factor POZ protein BCL6 plays a role in B-cell differentiation and represses transcription, as does RP58 (31).

All six transcription factors were studied by EMSAs. All oligonucleotide probes with the exception of the two allelic variants of the AP2-binding site produced band shifts. In the case of the two indel polymorphisms, the observed band shifts differed between allelic *PRNP* promoter variants. The specificity of the DNA-protein interaction was checked by competition with unlabeled probes. In the case of SP1, the identity of the shifted band from the nuclear brain extract was further

corroborated by a positive control experiment using purified recombinant SP1. The results of the RP58 EMSA suggest that RP58 had a higher affinity for the 23-bp insertion allele. The weak affinity of RP58 for the 23-bp deletion allele is not surprising, as the RP58-binding site is duplicated with just one mismatch outside the indel polymorphism.

Following the initial evidence from the EMSA experiments, we created reporter gene constructs with these polymorphisms in every possible combination. The 12-bp indel polymorphism in intron 1 was deliberately included in the analysis, as it has previously been shown that intron 1 elements are necessary for bovine *PRNP* promoter activity (17). Our reporter gene assays revealed an influence of the indel polymorphisms on *PRNP* transcription rates. Surprisingly, in a short construct, the 12-bp insertion alone resulted in an increased expression level, whereas in the long construct in combination with the 23-bp insertion, the 12-bp insertion caused a decreased expression level. These findings are compatible with a model in which RP58 binds to the 5'-flanking sequence of the *PRNP* gene and represses *PRNP* promoter activity by an interaction with SP1 bound within intron 1, similar to known RP58-SP1 interactions in other promoters (28).

RP58 seems to be a logical candidate for the repressing factor. At this time, the identity of the repressing factor has not been definitely proven. The EMSA results certainly hinted at an involvement of RP58; however, the cotransfection experiments with RP58 were inconclusive. A possible explanation for these results is that the recombinant human RP58 used was indeed able to bind to the recognition sequence within the bovine promoter, but not to exert its repressing function in the heterologous bovine system.

The influence of the *PRNP* promoter genotype with regard to the 23- and 12-bp indel polymorphisms on *PRNP* expression *in vivo* was further studied by qRT-PCR experiments. We chose tissue samples from the spleen, brain stem, and intestinal lymph nodes because of their importance in the infection route of the prions. The liver was chosen as a control organ because it is supposedly not involved in BSE pathogenesis. Only the lymph nodes showed a significant distribution of the five genotype groups. As the expression level of *PRNP* in intestinal lymph nodes was very low compared with that in the other organs, this result raises the intriguing question of whether the low *PRNP* amounts in intestinal lymph nodes are rate-limiting for the conversion of cellular PrP^c into PrP^{Sc} during the spread of BSE infection toward the central nervous system. The higher expression level of the pDelDel plasmid is consistent with our previous finding that the 23del:12del genotype is associated with higher susceptibility to BSE in German cattle (1).

Our results tentatively indicate that individuals with deletion alleles at the 23-bp indel polymorphism have higher *PRNP* expression levels in their intestinal lymph nodes. The influence of the promoter polymorphism on the expression levels is rather limited in comparison with the observed variance. This might be because we analyzed whole tissue samples, which may have been composed of varying proportions of different cell types. Future analyses should be performed at the single cell level, e.g. by *in situ* hybridizations, as it has previously been demonstrated that *PRNP* expression is not completely uniform within lymph nodes (32). Despite the large variance, the observed differences in *PRNP* expression levels are consistent with the notion that the 23-bp deletion allele is associated with higher susceptibility to BSE in German cattle.

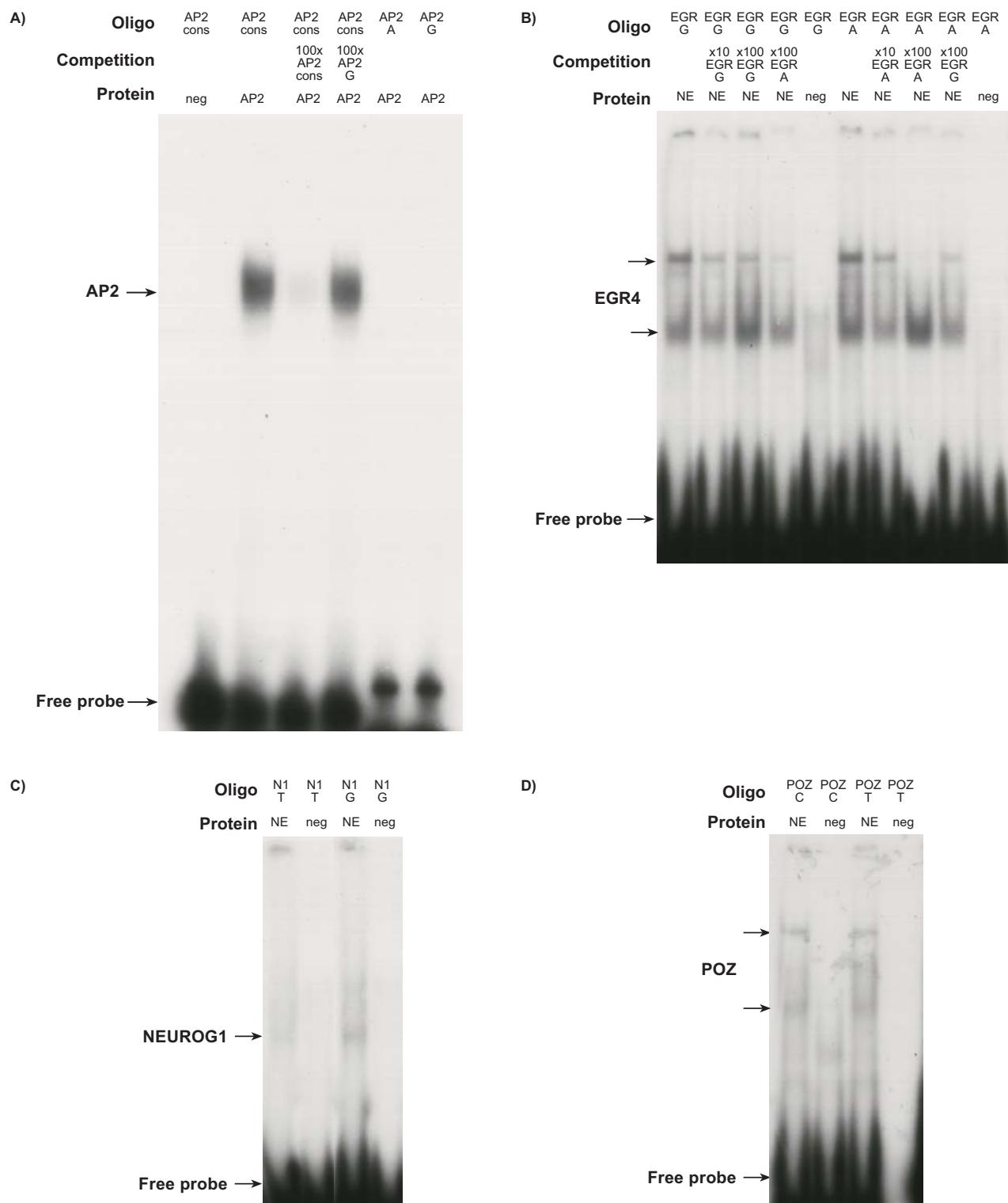
In conclusion, we have shown that two indel polymorphisms in the bovine *PRNP* promoter that contain binding sites for the RP58 and SP1 transcription factors modulate the expression level of *PRNP* *in vitro*. Our *in vivo* data show that the *PRNP* genotype may contribute to the observed high variance of *PRNP* expression in intestinal lymph nodes.

Acknowledgments—We thank D. Seinige and H. Klippert-Hasberg for expert technical assistance.

REFERENCES

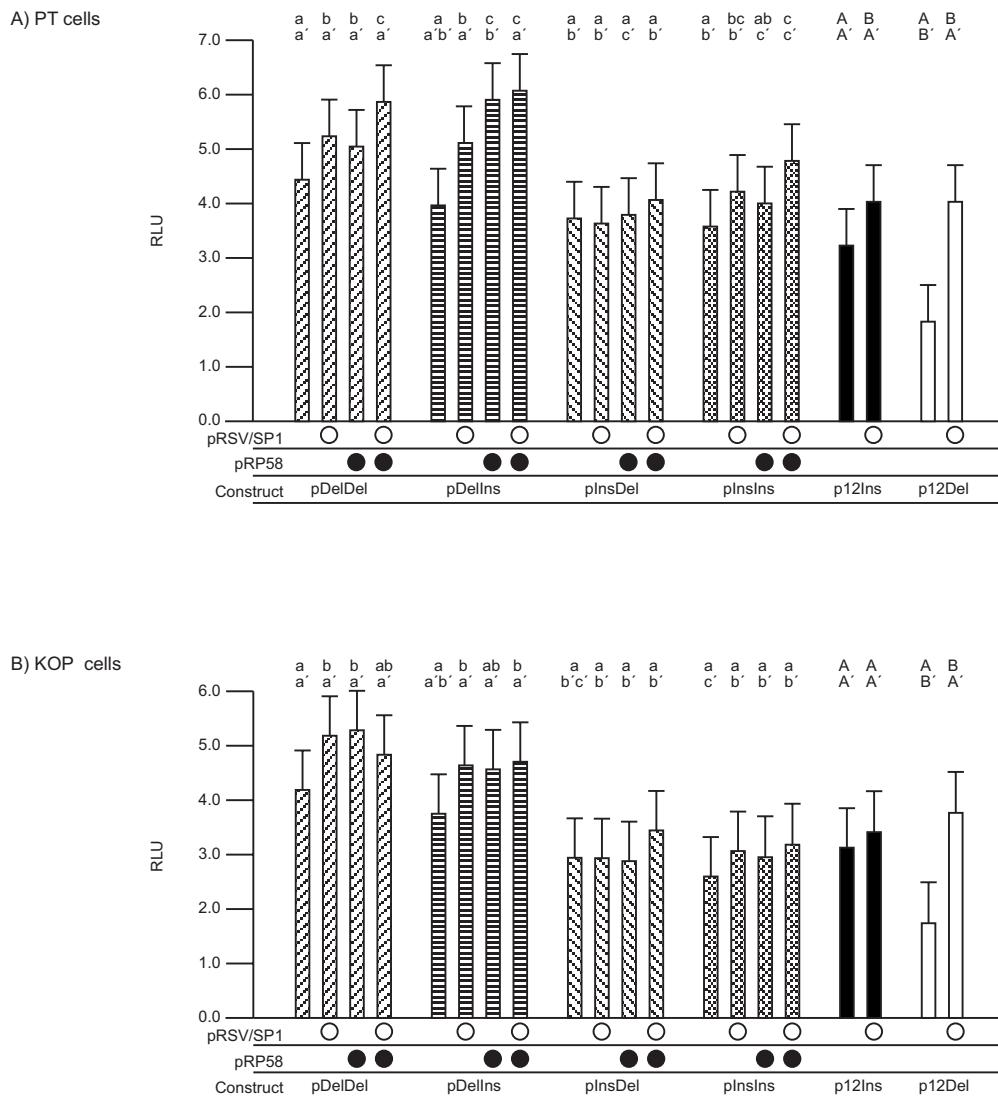
1. Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M., Ziegler, U., Distl, O., and Leeb, T. (2004) *Neurogenetics* **5**, 19–25
2. Prusiner, S. B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13363–13383
3. Eddy, R. G. (1995) *Vet. Rec.* **137**, 648
4. Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997) *Nature* **389**, 69–73
5. Daude, N. (2004) *Viral Immunol.* **17**, 334–349
6. Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E., and MacPherson, G. G. (2002) *J. Gen. Virol.* **83**, 267–271
7. Mabbott, N. A., Young, J., McConnell, I., and Bruce, M. E. (2003) *J. Virol.* **77**, 6845–6854
8. Maignien, T., Lasmezas, C. I., Beringue, V., Dormont, D., and Deslys, J. P. (1999) *J. Gen. Virol.* **80**, 3035–3042
9. Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2000) *Science* **19**, 1257–1259
10. Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K., and Hope, J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2476–2480
11. Hunter, N., Foster, J. D., and Hope, J. (1992) *Vet. Rec.* **130**, 389–392
12. Laplanche, J. L., Chatelain, J., Westaway, D., Thomas, S., Dussaucy, M., Brugere-Picoux, J., and Launay, J. M. (1993) *Genomics* **15**, 30–37
13. Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., and Smits, M. A. (1995) *J. Gen. Virol.* **76**, 509–517
14. Bossers, A., de Vries, R., and Smits, M. A. (2000) *J. Virol.* **74**, 1407–1414
15. Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B., and Smits, M. A. (1996) *J. Gen. Virol.* **77**, 2669–2673
16. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4878–4884
17. Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., and Shinagawa, M. (1997) *J. Vet. Med. Sci.* **59**, 175–183
18. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475–1489
19. Horton, R. M., Ho, S. N., Pullen, J. K., Hunt, H. D., Cai, Z., and Pease, L. R. (1993) *Methods Enzymol.* **217**, 270–279
20. Hecker, K. H., and Roux, K. H. (1996) *BioTechniques* **20**, 478–485
21. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. (1987) *Cell* **51**, 1079–1090
22. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 725–737
23. SAS Institute Inc. (2003) *SAS Version 9.1*, SAS Institute Inc., Cary, NC
24. Anderson, G. M., and Freytag, S. O. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1935–1943
25. Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A. P., Flavell, R. A., and Williams, T. (1996) *Nature* **381**, 238–241
26. Becker, K. G., Lee, I. J., Nagle, J. W., Canning, R. D., Gado, A. M., Torres, R., Polymeropoulos, M. H., Massa, P. T., Biddison, W. E., and Drew, P. D. (1997) *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**, 891–899
27. Aoki, K., Meng, G., Suzuki, K., Takashi, T., Kameoka, Y., Nakahara, K., Ishida, R., and Kasai, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26698–26704
28. Lee, D.-K., Suh, D., Edenberg, H. J., and Hur, M.-W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26761–26768
29. Crosby, S. D., Veile, R. A., Donis-Keller, H., Baraban, J. M., Bhat, R. V., Simburger, K. S., and Milbrandt, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4739–4743
30. Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001) *Cell* **104**, 365–376
31. Chang, C.-C., Ye, B. H., Chaganti, R. S. K., and Dalla-Favera, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6947–6952R. S. K.
32. Paltrinieri, S., Comazzi, S., Spagnolo, V., Rondena, M., Ponti, W., and Ceciliani, F. (2004) *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 1639–1645

Additional EMSAs of AP2, EGR4, NEUROG1, and POZ



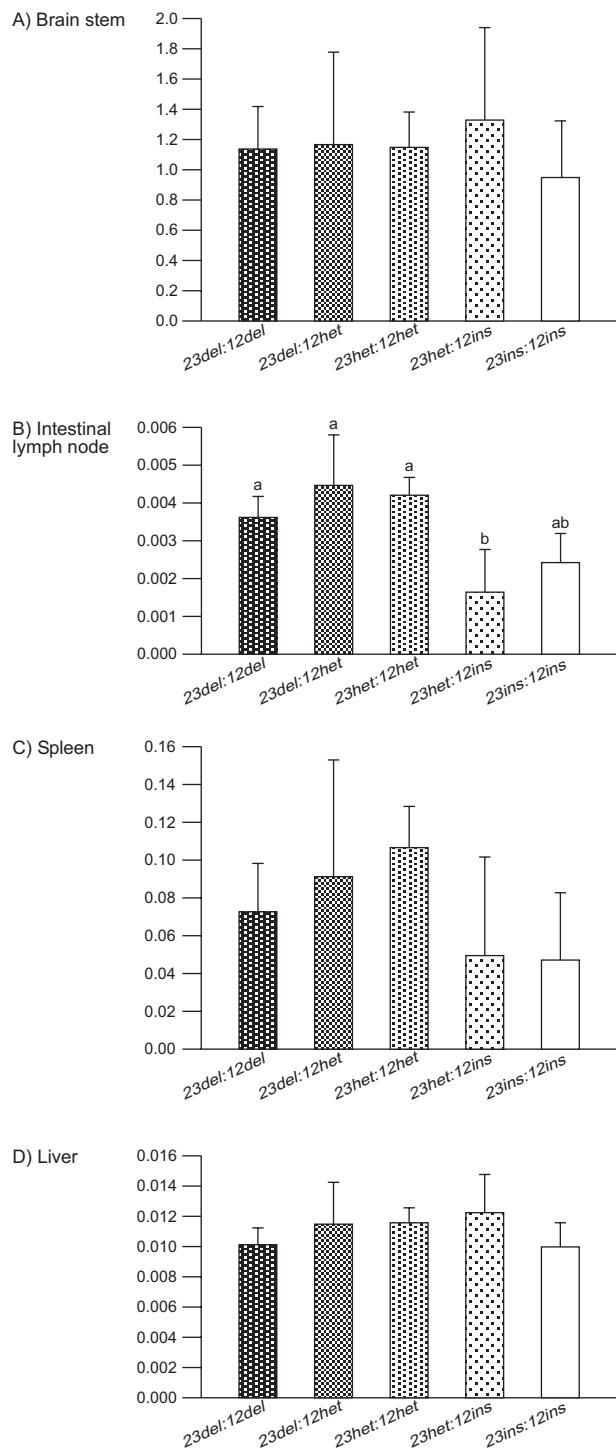
Supplemental Fig. 1. EMSA of AP2 (A), EGR4 (B), NEUROG1 (C) and POZ (BCL6) (D) binding to the PRNP promotor sequence. (A) The AP2 EMSA was performed according to the Gel Shift Assay System (Promega). 1 µl AP2 extract, 25 fmol double-stranded and ³²P-radiolabeled AP2 consensus probe (AP2_cons) or AP2_G probe (sense 5'- GCG GTG AGG AGT GCC GGA GCG TCC GTG GGC CCC CAG CCG C-3') or AP2_A probe (sense 5'- GCG GTG AGG AGT GCC GGA GCR TCC GTA GGC CCC CAG CCG C-3') and Gel Shift Binding Buffer including 250 mM NaCl were used for binding reaction (10min. at room temperature). Competitions were performed by adding 2.5 pmol cold oligonucleotide. Electrophoresis was made on a 4% polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide 60:1) in 0.5x TBE. Negative control (neg) lacked protein. The consensus probe but neither the AP_A nor the AP_G probe led to a specific band shift. (B,C,D) Nuclear extracts (NE) were prepared from bovine brain. The oligonucleotides EGR_G (sense 5'- GGA TCG GCT CTG GCG GGC GTG CGT GGC CTG GGC TTC AGC CTC-3'), EGR_A (sense 5'- GGA TCG GCT CTG GCG GGC GTA CGT GGC CTG GGC TTC AGC CTC-3'), N1_T (sense 5'- GTA AAC CCC GGG CGC CGG CAG CTG GTG CGC CTG AGC GTG CGC GCG C-3'), N1_G (sense 5'- GTA AAC CCC GGG CGC CGG CAG CGG GTG CGC CTG AGC GTG CGC GCG C-3'), POZ_C (sense 5'- GGC AGT TTT CAA AAA TGG CCA GAA ATT CTT TGA TAC TCT TC-3'), and POZ_T (sense 5'- GGC AGT TTT CAA AAA TGG CTA GAA ATT CTT TGA TAC TCT TC-3') were double-stranded and ³²P-radiolabeled. For binding reactions, 25 fmol probe, eventually 250 fmol or 2.5 pmol cold probe as competitor, 5.25 µg (EMSA for POZ and EGR4) or 8.75 µg (EMSA for NEUROG1) nuclear extract and binding buffer including 0.75 M (POZ), 1.5 M (NEUROG1) or 1.125 M (EGR4) NaCl. Negative control (neg) lacked protein. In EMSAs B, C, and D, both allelic probes led to similar or identical band shift patterns with bands for each probe.

Promoter-reporter gene assays with overexpression of specific transcription factors



Supplemental Fig. 2. Reporter gene assays - effect of different polymorphisms of the bovine PRNP promoter on its activity in PT or KOP cells during overexpression of specific transcription factors. Columns show expression levels of firefly luciferase activity of each test construct compared to the renilla luciferase activity of the normalization vector pRL-TK. The control vector pGL3control with standard promoter SV40 was used for normalization between different experiments (relative light units RLU = [firefly luciferase_{construct}/renilla luciferase_{construct}] / [firefly luciferase_{control}/renilla luciferase_{control}]). In addition to the reporter gene constructs expression plasmids for SP1 (pRSV/SP1) and/or RP58 (pRP58) were cotransfected into PT or KOP cells. Cells were harvested 48 h after transfection. Standard error levels are indicated. Two lines of letters at the top illustrate significantly differing expression levels ($p < 0.05$). The upper line provides significances between columns within a construct. The lower line provides significances within the identical cotransfections (different reporter gene construct, constant expression construct for transcription factor).

qRT-PCR data on PRNP expression *in vivo*



Supplemental Fig. 3. Expression levels of PRNP in different bovine tissues. RNA was isolated from 96 bovine tissue samples: A, brain stem, B, intestinal lymph node, C, spleen, and D, liver. Transcript quantities were analyzed by qRT-PCR. Absolute PRNP and GAPDH expression levels were determined by the standard curve method. Columns show relative expression levels of PRNP normalized to bovine GAPDH [PRNP/GAPDH]. Samples were genotyped for the 23 bp and 12 bp indel polymorphisms. Expression levels are given with respect to the genotype. Standard error levels are indicated. Different superscript letters represent significantly differing expression levels in intestinal lymph nodes ($p < 0.05$). No significant differences between genotypes were observed in the other tissues. Note the large tissue-specific differences in expression levels between brain stem, intestinal lymph node, spleen, and liver.

Supplementary table 1: P-values for the comparisons of expression values between the different constructs in figure 4. p-values for KOP cells are given above, p-values for PT-cells below the diagonal.

| | pDel12 | pDelDel | pDellns | pIns12 | pInsDel | pInsIns |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pDel12 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| pDelDel | <0.0001 | | 0.6785 | <0.0001 | 0.2439 | 0.0034 |
| pDellns | <0.0001 | 0.2841 | | <0.0001 | 0.4511 | 0.0110 |
| pIns12 | <0.0001 | 0.0015 | <0.0001 | | 0.0007 | 0.0956 |
| pInsDel | <0.0001 | 0.0302 | 0.0015 | 0.2828 | | 0.0696 |
| pInsIns | 0.0005 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0478 | 0.0027 | |

Supplementary table 2: P-values for the comparisons of expression values between the different constructs in supplemental figure 2.
 p-values for KOP cells are given above, p-values for PT-cells below the diagonal.

| | pDel12 | pDel12 SP | pDelDel | pDelDel RP | pDelDel SP | pDelDel SP+RP | pDellns | pDellns RP |
|---------------|---------|-----------|---------|------------|------------|---------------|---------|------------|
| pDel12 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| pDel12 SP | <0.0001 | | 0.0278 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.5246 | <0.0001 |
| pDelDel | <0.0001 | 0.3143 | | 0.0429 | 0.0082 | <0.0001 | 0.1156 | <0.0001 |
| pDelDel RP | <0.0001 | 0.0004 | 0.0100 | | 0.5258 | 0.0066 | 0.0004 | 0.0045 |
| pDelDel SP | <0.0001 | 0.0010 | 0.0190 | 0.8096 | | 0.0359 | <0.0001 | 0.0261 |
| pDelDel SP+RP | <0.0001 | 0.0120 | 0.1247 | 0.2839 | 0.4053 | | <0.0001 | 0.8971 |
| pDellns | <0.0001 | 0.9692 | 0.2962 | 0.0004 | 0.0009 | 0.0108 | | <0.0001 |
| pDellns RP | <0.0001 | 0.0582 | 0.3677 | 0.0884 | 0.1422 | 0.5214 | 0.0534 | |
| pDellns SP | <0.0001 | 0.0391 | 0.2829 | 0.1252 | 0.1950 | 0.6402 | 0.0357 | 0.8617 |
| pDellns SP+RP | <0.0001 | 0.0267 | 0.2189 | 0.1681 | 0.2542 | 0.7563 | 0.0243 | 0.7403 |
| pIns12 | 0.0012 | 0.1284 | 0.0125 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.1382 | 0.0008 |
| pIns12 SP | 0.0001 | 0.3978 | 0.0658 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0009 | 0.4195 | 0.0068 |
| pInsDel | 0.0049 | 0.0506 | 0.0035 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0552 | 0.0002 |
| pInsDel RP | 0.0074 | 0.0360 | 0.0022 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0394 | 0.0001 |
| pInsDel SP | 0.0051 | 0.0488 | 0.0033 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0532 | 0.0002 |
| pInsDel SP+RP | <0.0001 | 0.4412 | 0.0774 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0012 | 0.4643 | 0.0084 |
| pInsIns | 0.0424 | 0.0061 | 0.0002 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0068 | <0.0001 |
| pInsIns RP | 0.0045 | 0.0535 | 0.0038 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0584 | 0.0002 |
| pInsIns SP | 0.0020 | 0.0956 | 0.0083 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.1034 | 0.0005 |
| pInsIns SP+RP | 0.0008 | 0.1642 | 0.0177 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0001 | 0.1761 | 0.0013 |

| pDellns SP | pDellns SP+RP | plns12 | plns12 SP | plnsDel | plnsDel RP | plnsDel SP | plnsDel SP+RP | plnsIns |
|------------|---------------|---------|-----------|---------|------------|------------|---------------|---------|
| <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.0679 | 0.3919 | 0.8687 | 0.9560 | 0.6312 | 0.3322 | 0.5060 |
| 0.0250 | <0.0001 | <0.0001 | 0.1753 | 0.0182 | 0.0319 | 0.0077 | 0.2141 | 0.0044 |
| 0.8243 | 0.0007 | <0.0001 | 0.0008 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0012 | <0.0001 |
| 0.6798 | 0.0056 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0001 | <0.0001 |
| 0.0124 | 0.4913 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| 0.0002 | <0.0001 | 0.0143 | 0.8255 | 0.4230 | 0.5611 | 0.2650 | 0.7380 | 0.1940 |
| 0.0086 | 0.5761 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| | 0.0016 | <0.0001 | 0.0004 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | 0.0006 | <0.0001 |
| 0.8750 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| 0.0005 | 0.0003 | | 0.0078 | 0.0964 | 0.0601 | 0.1767 | 0.0056 | 0.2431 |
| 0.0041 | 0.0025 | 0.4956 | | 0.3073 | 0.4230 | 0.1823 | 0.9093 | 0.1292 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.6565 | 0.2612 | | 0.8254 | 0.7529 | 0.2567 | 0.6171 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.5548 | 0.2048 | 0.8838 | | 0.5925 | 0.3603 | 0.4714 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.6451 | 0.2546 | 0.9873 | 0.8964 | | 0.1480 | 0.8530 |
| 0.0051 | 0.0032 | 0.4491 | 0.9396 | 0.2307 | 0.1793 | 0.2246 | | 0.1031 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.2069 | 0.0535 | 0.4117 | 0.4995 | 0.4208 | 0.0450 | |
| 0.0001 | <0.0001 | 0.6749 | 0.2720 | 0.9798 | 0.8638 | 0.9671 | 0.2406 | 0.3975 |
| 0.0003 | 0.0002 | 0.8816 | 0.4068 | 0.7673 | 0.6585 | 0.7551 | 0.3655 | 0.2649 |
| 0.0007 | 0.0004 | 0.8954 | 0.5821 | 0.5647 | 0.4705 | 0.5540 | 0.5314 | 0.1640 |

| plnsIns RP | plnsIns SP | plnsIns SP+RP |
|------------|------------|---------------|
| <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| 0.4482 | 0.1400 | 0.0009 |
| 0.1463 | 0.4623 | 0.2477 |
| 0.0006 | 0.0061 | 0.3799 |
| <0.0001 | 0.0008 | 0.1314 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.0004 |
| 0.9026 | 0.3992 | 0.0068 |
| <0.0001 | <0.0001 | 0.0002 |
| 0.0003 | 0.0031 | 0.2717 |
| <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| 0.0103 | 0.0011 | <0.0001 |
| 0.9218 | 0.5332 | 0.0127 |
| 0.3559 | 0.1012 | 0.0005 |
| 0.4819 | 0.1553 | 0.0011 |
| 0.2164 | 0.0513 | 0.0002 |
| 0.8320 | 0.6105 | 0.0172 |
| 0.1556 | 0.0331 | <0.0001 |
| | 0.4708 | 0.0097 |
| 0.7867 | | 0.0596 |
| 0.5819 | 0.7792 | |

Supplementary table 3: P-values for the comparisons of expression values between the different genotypes in four selected tissues

| Brain stem | 23del:12del | 23del:12het | 23het:12het | 23het:12ins | 23ins:12ins |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 23del:12del | | | | | |
| 23del:12het | 0,9446 | | | | |
| 23het:12het | 0,7712 | 0,8130 | | | |
| 23het:12ins | 0,3817 | 0,4602 | 0,4598 | | |
| 23ins:12ins | 0,9294 | 0,9943 | 0,7345 | 0,3772 | |
| Lymph node | 23del:12del | 23del:12het | 23het:12het | 23het:12ins | 23ins:12ins |
| 23del:12del | | | | | |
| 23del:12het | 0,4960 | | | | |
| 23het:12het | 0,7280 | 0,3827 | | | |
| 23het:12ins | 0,0129 | 0,0190 | 0,0185 | | |
| 23ins:12ins | 0,0821 | 0,0810 | 0,1208 | 0,2696 | |
| Spleen | 23del:12del | 23del:12het | 23het:12het | 23het:12ins | 23ins:12ins |
| 23del:12del | | | | | |
| 23del:12het | 0,6287 | | | | |
| 23het:12het | 0,4672 | 0,9048 | | | |
| 23het:12ins | 0,9253 | 0,6403 | 0,5966 | | |
| 23ins:12ins | 0,4626 | 0,3656 | 0,1762 | 0,6710 | |
| Liver | 23del:12del | 23del:12het | 23het:12het | 23het:12ins | 23ins:12ins |
| 23del:12del | | | | | |
| 23del:12het | 0,3974 | | | | |
| 23het:12het | 0,2024 | 0,8354 | | | |
| 23het:12ins | 0,4176 | 0,9388 | 0,9053 | | |
| 23ins:12ins | 0,9759 | 0,4178 | 0,2930 | 0,4411 | |

V. Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit beim Rind – Mythos oder Realität?

Tosso Leeb und Petra Sander

Zum Druck angenommen bei: *Nova Acta Leopoldina* (2005)

1 **Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit beim Rind –**
2 **Mythos oder Realität?**

4 Tosso Leeb* und Petra Sander

5 Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bünteweg 17p,
6 30559 Hannover, Deutschland

10 * Korrespondenz: Tosso Leeb, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule
11 Hannover, Bünteweg 17p, 30559 Hannover, Deutschland; Tel. 0511-953-8874; Fax. +49-511-953-8582; E-mail:
12 Tosso.Leeb@tiho-hannover.de

14 Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

17 **1. Zusammenfassung**

19 Die Empfänglichkeit des Menschen für die variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) steht
20 in engem Zusammenhang zu Polymorphismen des humanen Prion Protein Gens (*PRNP*).
21 Ähnliche genetische Variationen im ovinen *PRNP* beeinflussen die Empfänglichkeit des
22 Schafes für Scrapie. In der codierenden *PRNP* Region des Rindes hingegen sind bisher
23 keine Polymorphismen entdeckt worden, die einen Einfluss auf die BSE-Empfänglichkeit
24 ausüben. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurden Polymorphismen in der
25 Promotorregion des bovinen *PRNP* Gens entdeckt, für die eine Assoziation zu BSE besteht.
26 Eine plausible Hypothese als Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass
27 Polymorphismen im bovinen *PRNP* Promotor zu einer Veränderung der *PRNP* Expression
28 führen, welche wiederum die Inkubationszeit und Empfänglichkeit für BSE beeinflusst. Um
29 diese Hypothese zu überprüfen, wurden Promotor-Reporter-Gen-Studien *in vitro* und
30 quantitative RT-PCR-Experimente *in vivo* zur Ermittlung der *PRNP* Expressionsrate
31 durchgeführt. Dabei wurden der 23 bp und der eng gekoppelte 12 bp umfassende Indel-
32 Polymorphismus, die Bindungssequenzen für RP58 bzw. für SP1 enthalten, untersucht. In

1 Gelretentionsanalysen konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren
2 allel spezifisch binden. In den untersuchten deutschen Rinderpopulationen, kommen zwei
3 Haplotypen des *PRNP* Promoters besonders häufig vor, nämlich die Kombinationen mit zwei
4 Insertionen oder zwei Deletionen an den beiden Indel-Polymorphismen. Der Haplotype mit
5 zwei Deletionen bewirkte *in vitro* höhere *PRNP*-Expressionsraten als der Haplotype mit beiden
6 Insertionen, was sich mit der Beobachtung deckt, dass dieser Haplotype mit höherer
7 Empfänglichkeit für BSE assoziiert ist. Die *in vivo* Versuche deckten eine sehr große
8 Streuung der *PRNP* mRNA Menge zwischen unterschiedlichen Tieren auf, wobei der *PRNP*
9 Promotor-Genotyp im Mesenteriallymphknoten einen signifikanten Einfluss auf die
10 Expressionsrate zeigte.

11

12

13 **2. Summary**

14

15 The susceptibility of humans to the variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) is greatly
16 influenced by the M129V polymorphism within the human prion protein gene (*PRNP*). Similar
17 genetic differences exist in sheep where *PRNP* polymorphisms modulate scrapie
18 susceptibility. However, the known coding polymorphisms within the bovine *PRNP* gene
19 have little or no effect on BSE susceptibility in cattle. We have recently found a tentative
20 association between *PRNP* promoter polymorphisms and BSE in German cattle. A plausible
21 hypothesis explaining this observation could be that the bovine *PRNP* promoter
22 polymorphisms cause changes in *PRNP* expression, which might be responsible for
23 differences in BSE incubation time and/or BSE susceptibility. In order to test this hypothesis
24 we performed *PRNP* promoter reporter gene assays *in vitro* and measured *PRNP* mRNA
25 levels in calves with different *PRNP* genotypes *in vivo*. Two variable sites, a 23 bp indel
26 polymorphism containing the binding site for the transcription factor RP58, and a 12 bp indel
27 polymorphism containing an SP1 binding site were investigated. Electrophoretic mobility shift
28 assays indicated allele-specific binding of the transcription factors. In the investigated
29 German cattle populations two main promoter haplotypes were encountered, i.e. the
30 combination with both insertions and the combination with both deletions at the two indel
31 polymorphisms. Reporter gene assays demonstrated that the del/del haplotype showed

1 higher expression levels than the ins/ins haplotype. The *in vivo* data revealed substantial
2 individual variation of *PRNP* expression. In intestinal lymph nodes expression levels differed
3 between the different *PRNP* genotypes.

4

5

6 3. Einleitung

7

8 Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) stellt beim Rind das Analog zur varianten
9 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) beim Menschen, Scrapie beim Schaf, *Chronic Wasting*
10 *Disease* (CWD) bei nordamerikanischen Hirscharten, Feline Spongiforme Enzephalopathie
11 (FSE) bei Katzen und Spongiforme Enzephalopathie beim Nerz (TME) dar. Die Erreger
12 dieser Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSEs) sind nach der allgemein
13 anerkannten Hypothese von Prusiner (PRUSINER 1998) infektiöse Proteine, die so genannten
14 Prionen. Aufgenommene Prionen, die Prion Protein mit einer pathophysiologischen
15 Konformation (PrP^{Sc}) enthalten, bewirken, dass das endogene Prion mit der physiologischen
16 Konformation (PrP^{C}) sich ebenfalls zu PrP^{Sc} umwandelt, welches unlösliche Aggregate bildet
17 und zu Zellschädigungen führt. Die Verfütterung von Tiermehl, welches mit infektiösen
18 Prionen aus Scrapie infizierten Schafen oder BSE infizierten Rindern kontaminiert war, löste
19 den großen BSE-Ausbruch Ende des 20sten Jahrhunderts in Großbritannien aus (EDDY
20 1995). Prionen werden vom Magen-Darm-Trakt bis zum Gehirn transportiert, wo
21 spongiforme Veränderungen der Gehirnstruktur zu neurodegenerativen Funktionsstörungen
22 führen. Es gibt Hinweise darauf, dass das Immunsystem an diesem Prozess beteiligt ist.
23 Insbesondere Mesenteriallymphknoten, B-Lymphozyten, folliculär-dendritische Zellen und die
24 Milz sind für den Transport des PrP^{Sc} zum Zielorgan Gehirn essentiell (BLATTNER et al. 1997,
25 DAUDE 2004, HUANG et al. 2002, MABBOTT et al. 2003, MAIGNIEN et al. 1999, MONTRASIO et
26 al. 2000). Bei einigen Spezies sind genetische Faktoren des Wirtes bekannt, die die
27 Empfänglichkeit für eine Prioneninfektion beeinflussen. Zum Beispiel sind gewisse
28 Mutationen in der kodierenden Region des ovinen *PRNP* Gens bekannt, die zu reduzierter
29 bzw. gesteigerter Scrapie-Empfänglichkeit führen (GOLDMANN et al. 1990, HUNTER et al.
30 1992, LAPLANCHE et al. 1993, BELT et al. 1995, BOSSERS et al. 2000). Beim Menschen ist der
31 Polymorphismus des Kodons 129 der Protein kodierenden Sequenz mit dem Auftreten der

1 vCJD streng korreliert. Patienten der vCJD weisen -soweit bisher untersucht- stets
2 homozygot den Genotyp ¹²⁹Met/¹²⁹Met und niemals den Genotyp ¹²⁹Val/¹²⁹Val oder
3 ¹²⁹Met/¹²⁹Val auf (WILL 2005).

4 Beim Rind jedoch scheint keiner der bekannten Polymorphismen in der kodierenden Region
5 des bovinen *PRNP* Gens im Zusammenhang mit der BSE zu stehen. Schon relativ früh
6 wurde daher spekuliert, dass die Promotorregion des *PRNP* Gens die Expressionsrate des
7 Proteins und somit die Inkubationszeit für TSE zu beeinflussen könnte (BOSSERS et al.
8 1996).

9 In jüngster Zeit mehren sich jedoch die Berichte über Polymorphismen außerhalb der
10 kodierenden Region des bovinen *PRNP* Gens, die mit der Empfänglichkeit für BSE assoziiert
11 sind (siehe Beitrag KASHKEVICH und SCHIEBEL). In einer früheren Studie unserer
12 Arbeitsgruppe berichteten wir von einer schwachen Assoziation zwischen der BSE-
13 Empfänglichkeit des Rindes und Polymorphismen des bovinen *PRNP* Promotors (SANDER et
14 al. 2004). Hier unterschieden sich die Allelfrequenzen zweier gekoppelter
15 Insertions/Deletions-Polymorphismen (Indels) des *PRNP* Promotors zwischen 48 gesunden
16 und 43 an BSE erkrankten deutschen Rindern signifikant. Es handelte sich dabei um einen
17 23 bp Indel in der 5'-flankierenden Region und einen 12 bp Indel im ersten Intron des *PRNP*
18 Gens. Die am häufigsten vorkommenden Haplotypen dieser beiden Polymorphismen waren
19 ins/ins mit beiden Insertionen und del/del mit beiden Deletionen. In der Assoziationsstudie
20 wurde eine signifikant höhere Frequenz des Haplotyps del/del in der Gruppe der BSE
21 erkrankten Rinder als bei gesunden Rindern beobachtet. Daher formulierten wir die
22 Hypothese, dass die beobachteten Unterschiede in der Haplotypfrequenz in den beiden
23 Gruppen mit unterschiedlichen *PRNP* Promotoraktivitäten der beiden Haplotypen korreliert
24 sind. Entsprechend dieser Hypothese müsste das del/del Allel, welches in der erkrankten
25 Gruppe häufiger anzutreffen war, eine größere Promotoraktivität als das ins/ins Allel zeigen.
26 Um diese Hypothese zu überprüfen, führten wir funktionelle Analysen des bovinen *PRNP*
27 Promotors mittels Promotor-Reportergen-Studien *in vitro* und quantitative *Real-Time*
28 Experimente *in vivo* durch.

29

30

1 4. ***In silico* Analyse von Transkriptionsfaktoren**

2
3 Die Computer Software MatInspector wurde für das Durchsuchen des bovinen *PRNP*
4 Promotors nach möglichen bindenden Transkriptionsfaktoren verwendet (QUANDT et al.
5 1995). Die untersuchte Region umfasste die genomische Sequenz von Position -2676 bis
6 +2564 bezogen auf den Transkriptionsstart, welche den mutmaßlichen Promotor nach INOUE
7 et al. (1997) einschließt, jedoch zusätzlich stromaufwärts erweitert wurde. Die verschiedenen
8 *PRNP* Promotorallele wurden auf Unterschiede in den Bindungsstellen für
9 Transkriptionsfaktoren untersucht.

10 Diese Suche ergab insgesamt 18 Sequenzabschnitte, bei denen sich die Allelvarianten
11 bezüglich möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen unterscheiden. Hiervon konnten
12 sechs in die engere Wahl gezogen werden, da die betreffenden Transkriptionsfaktoren am
13 ehesten relevant für die Regulation des *PRNP* Gens zu sein schienen, z.B. weil sie in
14 Neuronen oder Zellen des Immunsystems exprimiert wurden. Unter den zwölf
15 ausgeschlossenen Transkriptionsfaktoren sind z.B. der Leberkernfaktor 4 (HNF4), welcher
16 vornehmlich eine Rolle in der Leber spielt.

17 Die sechs Transkriptionsfaktoren der engeren Wahl waren *B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc*
18 *finger protein 51)* (BCL6) mit einer allelspezifischen Bindestelle bei Position -1980, *zinc*
19 *finger protein 238 (RP58)* mit einer spezifischen Bindestelle für das Insertionsallel des 23 bp
20 Indel bei Position -1594, *Neurogenin 1 (NEUROG1)* mit einer allelspezifischen Bindestelle
21 bei Position -85, stimulierendes Protein 1 (SP1) mit einer spezifischen Bindestelle für das
22 Insertionsallel des 12 bp Indel bei Position +300 im ersten Intron, aktivierendes Protein 2
23 (AP2) mit einer allelspezifischen Bindestelle bei Position +571 und schließlich *early growth*
24 *response 4 (EGR4)* mit einer allelspezifischen Bindestelle bei Position +709 (SANDER et al.
25 2005).

26 SP1 stellt ein ubiquitär gebildetes, normalerweise stimulierendes Protein dar, dessen
27 Beteiligung bei der Promotorregulation für zahlreiche Gene beschrieben wurde (ANDERSON &
28 FREYTAG 1991). AP2 spielt eine Rolle in Geweben ektodermalen Ursprungs (ZHANG et al.
29 1996), und das Repressor-Protein RP58, welches hauptsächlich im Gehirn gebildet wird
30 (BECKER et al. 1997), wurde nach seiner Funktion benannt (AOKI et al. 1998). Letzteres
31 enthält eine Pox Virus und Zink Finger (POZ) Domäne, die als interagierende Einheit mit

1 SP1 beschrieben wurde. LEE et al. (2002) vermuten, dass die reprimierende Aktivität der
2 POZ Domäne durch eine Interaktion mit der DNA-Bindungskapazität des SP1 ausgeübt wird.
3 Der Transkriptionsfaktor EGR4, welches auch Nerv-Wachstumsfaktor induzierter Klon C
4 genannt wird, und NEUROG1 sind höchstwahrscheinlich an der Gehirnentwicklung beteiligt
5 (CROSBY et al. 1992, SUN et al. 2001). Das Protein POZ Zink Finger Protein BCL6 spielt eine
6 Rolle in der B-Zell-Differenzierung und reprimiert die Expression ähnlich wie RP58 (CHANG et
7 al 1996).

8
9

10 **5. Experimentelle Überprüfung der Transkriptionsfaktor-Bindung durch
11 Gelretentionsanalysen**

12

13 Für die experimentelle Untersuchung der allel spezifischen Bindungsfähigkeit der TF zu den
14 ausgewählten Sequenzabschnitten wurden etwa 50 bp lange doppelsträngige
15 Oligonukleotide mit den verschiedenen Allelen der sechs potentiellen Bindungsstellen als
16 Sonden in Gelretentionsanalysen eingesetzt (SANDER et al. 2005). Diese Sonden enthielten
17 also entweder das vermeintlich bindende *PRNP* Promotorallel oder das nicht-bindende Allel
18 zusammen mit konstanten flankierenden Sequenzen.

19 Der größte Unterschied in der Transkriptionsfaktor-Bindungskapazität wurde beim 12 bp
20 Indel an Position +300 des *PRNP* mit dem Transkriptionsfaktor SP1 beobachtet. SP1 bindet
21 an das 12 bp Insertionsallel, jedoch nicht an das 12 bp Deletionsallel. Ein weiterer
22 Unterschied in der Transkriptionsfaktor-Bindungskapazität wurde beim 23 bp Indel
23 beobachtet. RP58 band zwar unter den experimentellen Bedingungen an beide Allele,
24 jedoch war die Bindung an das 23 bp Insertionsallel stärker als an das 23 bp Deletionsallel
25 wie durch Kompetitionsexperimente mit unmarkierten Oligonukleotiden gezeigt werden
26 konnte. Die Gelretentionsanalysen mit den anderen vier untersuchten Transkriptionsfaktor-
27 Bindestellen für BCL6, NEUROG1, AP2 und EGR4 ergaben keine Hinweise auf
28 allel spezifische Unterschiede im Bindungsverhalten dieser Transkriptionsfaktoren.

29 Zusammengefasst aus diesen Experimenten sind also die Polymorphismen 12 bp Indel und
30 23 bp Indel die wahrscheinlichsten Polymorphismen, die für eine funktionelle Modulation des

1 *PRNP* Promotors in Frage kommen könnten. Deshalb konzentrierten sich unsere weiteren
2 Untersuchungen auf diese zwei Indels.

3

4

5 **6. Funktionelle *PRNP* Promotorstudien *in vitro***

6

7 Um die beobachteten Bindungsunterschiede von SP1 und RP58 funktionell zu analysieren,
8 wurden *PRNP* Promotor-Reportergenkonstrukte erstellt, die den offenen Leserahmen der
9 Luziferase aus Glühwürmchen unter der Kontrolle verschiedener Promotorvarianten des
10 *PRNP* beinhalten (Abbildung 1). Konkret wurden so genannte lange Reportergenkonstrukte,
11 die sowohl den 23 bp als auch den 12 bp Indel enthielten, in allen Allelkombinationen
12 hergestellt (pDelDel, pDellns, pInsDel, pInsIns). Daneben wurden auch noch zwei kurze
13 Reportergenkonstrukte, die nur den 12 bp Indel enthielten, hergestellt (p12Ins, p12Del), da
14 bereits früher gezeigt worden war, dass Elemente des Introns 1 essentiell für die
15 Promotoraktivität des bovinen Promotors sind (INOUE et al. 1997). Die Konstrukte wurden in
16 zwei verschiedene nicht-neurale bovine Zelllinien transfiziert und die Luziferase Aktivität
17 bestimmt (SANDER et al. 2005).

18 In beiden Zelllinien erzielte der p12Ins Vektor eine signifikant höhere Luziferaseaktivität als
19 der p12Del Vektor (Tabelle 1). Vermutlich bewirkte die zusätzliche SP1-Bindestelle in p12Ins
20 eine stärkere Promotoraktivierung. Überraschenderweise zeigten sich jedoch bei den vier
21 langen Konstrukten genau entgegen gesetzte Ergebnisse. Die Promotoraktivität des
22 Konstrukts pInsIns, das sowohl eine Bindestelle für RP58 als auch für SP1 enthielt, war in
23 beiden Zelllinien signifikant niedriger als die Aktivität von pDelDel. Der Effekt der 12 bp
24 Insertion kehrte sich also im Vergleich zu den kurzen Konstrukten, die nur den 12 bp Indel
25 Polymorphismus beinhalteten, bei den langen Konstrukten pInsIns und pDelDel um. Die
26 Konstrukte pDellns und pInsDel ergaben keine völlig konsistenten Ergebnisse in den beiden
27 Zelllinien. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Haplotyp Dellns nur sehr selten in
28 Rindern vorkommt. Der Haplotyp InsDel wurde bisher weder in dem Tiermaterial für die
29 früher durchgeführte Mutationsanalyse noch in der später beschriebenen qRT-PCR Studie
30 beobachtet (SANDER et al. 2004, SANDER et al. 2005).

1 Die Ergebnisse der langen Konstrukte können so interpretiert werden, dass bei dem
2 Konstrukt pInsIns der reprimierende Transkriptionsfaktor RP58 an die 5'-flankierende Region
3 des *PRNP* Gens bindet und über eine Wechselwirkung mit dem an das erste Intron
4 gebundenen Transkriptionsfaktor SP1 insgesamt zu einer Repression des *PRNP* Promotors
5 führt. Im Falle der Konstrukte mit der 23 bp Deletion kann der reprimierende Faktor RP58
6 nicht binden und es kommt zu einer höheren Expression. Dieses hypothetische Modell ist
7 konform mit früheren Studien, bei denen ebenfalls gefunden wurde, dass die POZ Domäne
8 seine reprimierende Wirkung durch eine Interaktion mit SP1 vermittelt (LEE et al 2002). Die
9 höhere Expression des Konstruktes mit beiden Deletionen ist konsistent mit der
10 Beobachtung, dass Tiere mit beiden Deletionen häufiger unter den BSE erkrankten Tieren
11 anzutreffen und somit empfänglicher für BSE sind als jene mit beiden Insertionen.

12

13

14 **7. Messung der *PRNP* Promotoraktivität *in vivo***

15

16 Zu Überprüfung, ob die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* Gültigkeit haben, wurden die *PRNP*
17 Transkriptmengen durch quantitative RT-PCR bei ca. 6 Monate alten Kälbern gemessen.
18 Dafür wurden die Gewebe Mesenteriallymphknoten, Milz und Stammhirn wegen ihrer
19 Bedeutung bei der BSE-Pathogenese ausgewählt. Die Leber, welche vermutlich keine Rolle
20 beim Erregertransport spielt, wurde als Kontrollorgan verwendet. Gewebeproben wurden
21 unmittelbar nach der Schlachtung in einem gewerblichen Schlachthof entnommen. DNA und
22 RNA wurde aus den Gewebeproben isoliert. Aus der DNA wurden die jeweiligen *PRNP*
23 Promotorgenotypen bestimmt. Die RNA wurde revers transkribiert und mittels real-time PCR
24 die Transkripte des *PRNP* Gens sowie des Haushaltsgens *GAPDH* quantifiziert. Die *PRNP*
25 Expressionsrate wurde durch Division mit der *GAPDH* Expressionsrate normalisiert (SANDER
26 et al. 2005).

27 Die Expressionsraten der vier Gewebe wiesen deutliche Unterschiede auf. Die größte *PRNP*
28 mRNA Menge wurde im Stammhirn gemessen, gefolgt von der Milz, der Leber und zuletzt
29 dem Mesenteriallymphknoten. Innerhalb der Gewebe Gehirn, Milz und Leber konnten keine
30 signifikant unterschiedlichen Werte in Bezug auf die *PRNP* Promotor-Genotypen ermittelt
31 werden. Bei den Darmlymphknoten-Proben hingegen zeigte der Genotyp 23het:12ins eine

1 signifikant geringere Expressionsrate als die Genotypen 23del:12del, 23del:12het und
2 23het:12het auf. Die insgesamt niedrige Expressionsrate des *PRNP* in diesem Organ legt die
3 Vermutung nahe, dass hier während der Erregerverbreitung zum Gehirn eine für die
4 Konversion des PrP^c zu PrP^{Sc} zu überschreitende kritische Schwelle besteht. Die Ergebnisse
5 der qRT-PCR Studie weisen andeutungsweise darauf hin, dass Rinder mit der 23 bp
6 Deletion mehr *PRNP* in ihren Mesenteriallymphknoten exprimieren, wobei eine posttrans-
7 kriptionelle Kontrolle nicht ausgeschlossen ist und mit dieser Methode nicht beurteilt werden
8 kann. Auch wenn die beobachteten Unterschiede in der Expressionsrate zwischen den
9 Genotypen im Vergleich zu den interindividuellen Schwankungen gering sind, stehen die
10 Ergebnisse der *PRNP* mRNA Quantifizierung wiederum in Einklang mit der Tatsache, dass
11 das 23 bp Deletionsallel mit einer höheren Empfänglichkeit für BSE assoziiert ist.

12

13

14 **8. Ausblick**

15

16 Die beschriebenen Untersuchungen haben einige deutliche Hinweise ergeben, dass
17 Promotorvarianten im bovinen *PRNP* Gen für *PRNP* Expressionsunterschiede verantwortlich
18 sein können. Diese Expressionsunterschiede können dann zu Unterschieden in der BSE-
19 Suszeptibilität führen. Somit gibt es im Sinne des Titels dieses Aufsatzes durchaus reale
20 Hinweise auf eine genetische Komponente bei der BSE-Empfänglichkeit. Alle bisher
21 durchgeführten genetischen Untersuchungen legen aber auch den Schluss nahe, dass
22 genetische Unterschiede in der BSE-Suszeptibilität nicht so ausgeprägt sind wie die
23 Unterschiede der Scrapie-Suszeptibilität bei den entsprechenden ovinen *PRNP* Varianten
24 oder die Unterschiede der vCJD-Suszeptibilität bei humanen *PRNP* Varianten. Es ist daher
25 zu befürchten, dass die möglicherweise real existierenden genetischen Unterschiede der
26 BSE-Empfänglichkeit nicht ausreichend sind, um BSE-Infektionen alleine durch züchterische
27 Maßnahmen einzämmen zu können.

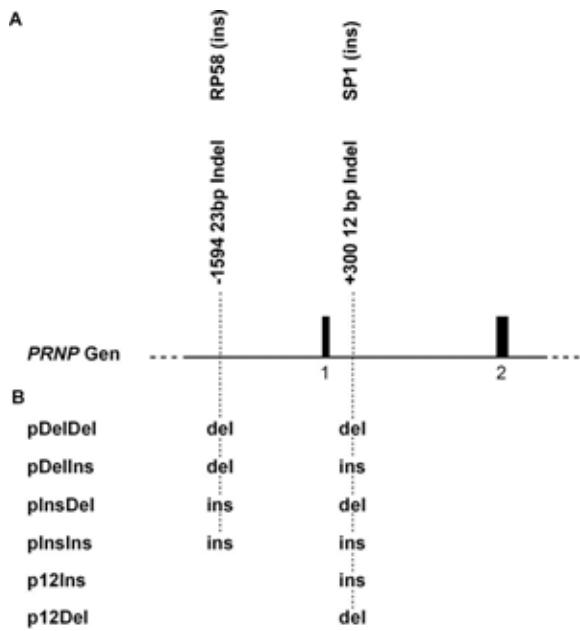
28

29

1 9. Literaturverzeichnis

- 2
- 3 ANDERSON, G. M., AND FREYTAG, S. O.: Synergistic activation of a human promoter in vivo by
4 transcription factor Sp1. *Mol. Cell Biol.* 11, 1935-1943 (1991)
- 5 AOKI, K., MENG, G., SUZUKI, K., TAKASHI, T., KAMEOKA, Y., NAKAHARA, K., ISHIDA, R., KASAI, M.:
6 RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific
7 transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 273, 26698-26704 (1998)
- 8 BECKER, K. G., LEE, I. J., NAGLE, J. W., CANNING, R. D., GADO, A. M., TORRES, R.;
9 POLYMEROPoulos, M. H., MASSA, P. T., BIDDISON, W. E., DREW, P. D.: C2H2-171: a
10 novel human cDNA representing a developmentally regulated POZ domain/zinc
11 finger protein preferentially expressed in brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 891-899
12 (1997)
- 13 BELT, P. B., MUILEMAN, I. H., SCHREUDER, B. E., BOS-DE RUIJTER, J., GIELKENS, A. L., SMITS,
14 M. A.: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association
15 with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 76, 509-517 (1995)
- 16 BLATTNER, T., BRANDNER, S., RAEBER, A. J., KLEIN, M. A., VOIGTLANDER, T., WEISSMANN, C.,
17 AGUZZI, A.: PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from
18 spleen to brain. *Nature* 389, 69-73 (1997)
- 19 BOSSERS, A., DE VRIES, R., SMITS, M. A.: Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in
20 vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J. Virol.* 74, 1407-1414
21 (2000)
- 22 BOSSERS, A., SCHREUDER, B. E., MUILEMAN, I.H., BELT, P.B., SMITS, M. A.: PrP genotype
23 contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*
24 77, 2669-2673 (1996)
- 25 CHANG, C.-C., YE, B. H., CHAGANTI, R. S. K., DALLA-FAVERA, R.: BCL-6, a POZ/zinc-finger
26 protein, is a sequence-specific transcriptional Repressor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*
27 A. 93, 6947-6952 (1996)
- 28 CROSBY SD, VEILE RA, DONIS-KELLER H, BARABAN JM, BHAT RV, SIMBURGER KS, MILBRANDT J:
29 Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the
30 gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*
31 A. 89, 4739-4743 (1992)
- 32 DAUDE, N.: Prion diseases and the spleen. *Viral Immunol.* 17, 334-349 (2004)
- 33 EDDY, R. G.: Origin of BSE. *Vet. Rec.* 137, 648 (1995)
- 34 GOLDMANN, W., HUNTER, N., FOSTER, J. D., SALBAUM, J. M., BEYREUTHER, K., HOPE, J.: Two
35 alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*
36 A. 87, 2476-2480 (1990)
- 37 HUANG, F. P., FARQUHAR, C. F., MABBOTT, N. A., BRUCE, M. E., MACPHERSON, G. G.: Migrating
38 intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J. Gen. Virol.* 83, 267-271
39 (2002)
- 40 HUNTER, N., FOSTER, J. D., HOPE, J.: Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP
41 gene polymorphisms. *Vet. Rec.* 130, 389-392 (1992)

- 1 INOUE, S., TANAKA, M., HORIUCHI, M., ISHIGURO, N., SHINAGAWA, M.: Characterization of the
2 bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter
3 and intron. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 175-183 (1997)
- 4 KASHKEVICH, K., SCHIEBEL, K.: Polymorphismen in den Prionproteingenen *PRNP* und *PRND*
5 und ihre Bedeutung für Prionenerkrankungen. *Nova Acta Leopoldina* (2005).
- 6 LAPLANCHE, J. L., CHATELAIN, J., WESTAWAY, D., THOMAS, S., DUSSAUCY, M., BRUGERE-
7 PICOUX, J., LAUNAY, J. M.: PrP polymorphisms associated with natural scrapie
8 discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15, 30-37 (1993)
- 9 LEE, D. K., SUH, D., EDENBERG, H. J., HUR, M. W.: POZ domain transcription factor, FBI-1,
10 represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and
11 interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* 26, 26761-26768 (2002)
- 12 MABBOTT, N. A., YOUNG, J., MCCONNELL, I., BRUCE, M. E.: Follicular dendritic cell
13 dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway
14 dramatically reduces scrapie susceptibility. *J. Virol.* 77, 6845-6854 (2003)
- 15 MAIGNIEN, T., LASMEZAS, C. I., BERINGUE, V., DORMONT, D., DESLYS, J. P.: Pathogenesis of
16 the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy
17 agents. *J. Gen. Virol.* 80, 3035-3042 (1999)
- 18 MONTRASIO, F., FRIGG, R., GLATZEL, M., KLEIN, M. A., MACKAY, F., AGUZZI, A., WEISSMANN, C.:
19 Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells
20 *Science* 19, 1257-1259 (2000)
- 21 PRUSINER, S. B.: Prions *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13363-13383 (1998)
- 22 QUANDT, K., FRECH, K., KARAS, H., WINGENDER, E., WERNER, T.: MatInd and MatInspector:
23 new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide
24 sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-4884 (1995)
- 25 SANDER, P., HAMANN, H., PFEIFFER, I., WEMHEUER, W., BRENIK, B., GROSCHUP, M., ZIEGLER,
26 U., DISTL, O., LEEB, T.: Analysis of sequence variability of the bovine prion
27 protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. *Neurogenetics* 5, 19-25 (2004)
- 28 SANDER, P., HAMANN, H., DRÖGEMÜLLER, C., KASHKEVICH, K., SCHIEBEL, K., LEEB, T.: Bovine
29 prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and
30 may be responsible for differences in BSE susceptibility. Submitted for publication
31 (2005)
- 32 SUN, Y., NADAL-VICENS, M., MISONO, S., LIN, M. Z., ZUBIAGA, A., HUA, X., FAN, G.,
33 GREENBERG, M. E. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial
34 differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376 (2001)
- 35 WILL, R. G.: Commentary: The risk of variant Creutzfeldt-Jakob Disease: reassurance and
36 uncertainty. *Int. J. Epidemiol.* 34, 52-53 (2005)
- 37 ZHANG, J., HAGOPIAN-DONALDSON, S., SERBEDZIJA, G., ELSEMORE, J., PLEHN-DUJOWICH, D.,
38 McMAHON, A. P., FLAVELL, R. A., WILLIAMS, T.: Neural tube, skeletal and body wall
39 defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381, 238-241 (1996)



1

2

3 **Abbildung 1:** Schematische Übersicht über den bovinen *PRNP* Promotor und die
 4 verwendeten Reportergenkonstrukte (modifiziert nach SANDER et al. 2005). (A) Darstellung
 5 der ersten beiden Exons des bovinen *PRNP* Gens. Der 23 bp Indel und der 12 bp Indel sind
 6 angegeben, wobei die Position +1 dem Transkriptionsstart entspricht. Der Transkriptions-
 7 faktor RP58 kann an das 23 bp Insertionsallel binden, der Transkriptionsfaktor SP1 an das
 8 12 bp Insertionsallel. (B) Es wurden Reportergenkonstrukte mit beiden Indels und solche, die
 9 nur den 12 bp Indel enthalten, hergestellt. Dabei wurden Abschnitte des *PRNP* Promotors in
 10 verschiedenen Allelekombinationen vor die kodierende Sequenz der Luziferase kloniert.

1 **Tabelle 1:** *In vitro* Promotoraktivitäten der verschiedenen Reportergenkonstrukte

2

| Konstrukt | Relative Expression | |
|-----------|---------------------|-----------|
| | KOP-R Zellen | PT Zellen |
| pDelDel | 2.45 | 2.16 |
| pDellns | 2.63 | 2.11 |
| pInsDel | 2.09 | 2.02 |
| pInsIns | 1.59 | 1.78 |
| p12Ins | 1.92 | 1.59 |
| p12Del | 1.00 | 1.00 |

3

VI. Übersicht

Die in der Abbildung 5 dargestellte Übersicht veranschaulicht die Abschnitte dieser Arbeit mit den zugrunde gelegten Hypothesen und den wichtigsten Ergebnissen.

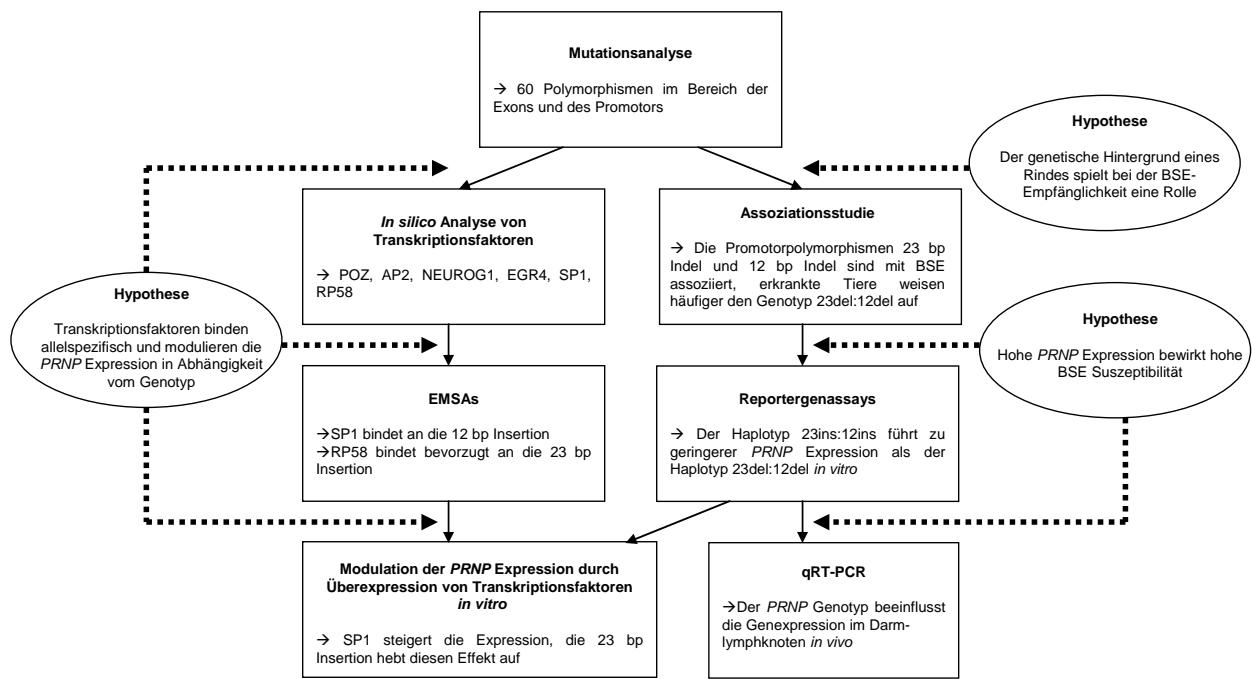


Abbildung 5: Übersicht der Arbeit

VII. Diskussion

1. Mutationsanalyse des bovinen *PRNP* Gens

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde das bovine Prion Protein Gen (*PRNP*) auf Polymorphismen untersucht, um Varianten zu identifizieren, die einen Einfluss auf die BSE Empfänglichkeit haben. Beim Vorliegen entsprechender Mutationen, könnte daraus eine Selektionsstrategie beim Rind in Anlehnung an das TSE-Bekämpfungsprogramm in der europäischen Schafzucht entwickelt werden.

Die Mutationsstudie erstreckte sich auf alle drei Exons des bovinen *PRNP* und auf die für die Expressionshöhe des Gens wichtige Promotorregion (Position 46754 bis 51993, siehe Datenbank-Eintrag AJ298878). Einerseits können Protein beeinflussende Mutationen die individuelle BSE-Empfänglichkeit beeinflussen, und andererseits ist es möglich, dass eine BSE-Empfänglichkeit über die Menge des exprimierten Proteins zustande kommt. Der in dieser Studie gewählte Bereich der Promotorregion erstreckt sich über ca. 2,5 kb in der 5'-flankierenden Region des Gens, da sich in diesem Bereich auffällig wenige repetitive Elemente befinden, so dass eine regulative Funktion in dieser Region anzunehmen ist. Außerdem wurde das dritte Exon auch außerhalb der codierenden Sequenz untersucht, da der 3'-untranslatierte Bereich des *PRNP* Gens Einfluss auf die mRNA- Prozessierung hat (GOLDMANN et al. 1999).

Das im Rahmen der Mutationsanalyse betrachtete Tiermaterial sollte eine größtmögliche Diversität aufweisen, damit möglichst viele Mutationen entdeckt, sowie rassespezifische Variationen von tatsächlichen mit dem Auftreten von BSE assoziierten Polymorphismen unterschieden werden können. Sieben verschiedene in Deutschland vertretene Rinderrassen stellten das Kontroll-Tiermaterial in der gesunden Vergleichsgruppe dar. Aus TSE-Referenzlaboren stammten 43 DNAs bestätigter Fälle von BSE bei deutschen Rindern. Bei diesen älteren deutschen Fällen kann trotz der neulich berichteten atypischen BSE-Fälle in Frankreich und Italien (NOVAKOFSKI et al. 2005) von einem einheitlichen Erreger-Stamm ausgegangen werden. Die Mutationsstudie wurde anhand von 48 gesunden Kontrolltieren und zunächst nur sieben BSE-Tieren mittels vergleichender Sequenzierung der genomischen DNA durchgeführt. Insgesamt wurden dabei 60 Polymorphismen entdeckt, wovon 36 bisher noch nicht in Sequenz-Datenbanken oder anderen Veröffentlichungen beschrieben worden waren. Von den bereits bekannten Mutationen konnten 24 ebenfalls in diesem Tiermaterial bestätigt werden, darunter der Octapeptid-Repeat-Polymorphismus (Octarepeat), sowie ein 12 bp und ein 14 bp umfassender Insertions/Deletions

Polymorphismus (Indel). Beim Octarepeat konnten allerdings bei dem verwendeten Tiermaterial nur die Genotypen 6/6 und 6/5 identifiziert werden. Weder das 7er Allel, welches nur beim Deutschen Braunvieh vorkommt (SCHLAPFER 1999), noch der Genotyp 5/5 wurde in einem unserer Probanden entdeckt. Die 36 neu identifizierten Mutationen enthielten einen 23 bp Indel in der vermutlichen Promotorregion des *PRNP* Gens. Dieser 23 bp Indel befindet sich in einem repetitiven Element retroviralen Ursprungs, welche eine wichtige Rolle in Säuger-Promotoren spielen können (MEDSTRAND et al. 2001).

2. Assoziationsstudie

Da mehr als 10 bp umfassende Insertionen oder Deletionen höchstwahrscheinlich einen größeren Effekt auf die Promotoraktivität besitzen als zum Beispiel Einzelbasen-Polymorphismen (SNPs), wurden die weiteren BSE-Tiere im Hinblick auf diese Polymorphismen genotypisiert. Die Genotypen der 34 Proben wurden in Bezug auf die 23 bp, 12 bp, 24 bp und 14 bp Indels ermittelt und anschließend zusammen mit den Daten aus der Mutationsanalyse in einer Assoziationsstudie im Hinblick auf das Auftreten der BSE im Vergleich zu der Genotypenverteilung der Kontrolltiere verwendet. Beim *PRNP*-Octarepeat konnten weder Unterschiede in der Allel- noch in der Genotypen-Verteilung zwischen gesunden und an BSE erkrankten Tieren festgestellt werden, was frühere Untersuchungen bestätigt (HUNTER et al. 1994). Auch für den 14 bp Indel konnte keine Assoziation zu BSE ermittelt werden, wogegen die Allel- sowie die Genotypfrequenz des 23 bp Indels eine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen den beiden Tiergruppen zeigte. Diese wurde anschließend auf einen Einfluss der Rasse überprüft, welcher aber ausgeschlossen werden konnte. Tiere mit der Insertion von 23 bp innerhalb des Promotors des *PRNP* Gens sind häufiger unter den gesunden Rindern vertreten. Da die beiden Indels 23 bp und 12 bp eng miteinander gekoppelt sind, war es nicht verwunderlich, dass auch der 12 bp Indel Polymorphismus signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen den Tiergruppen aufwies.

Insgesamt konnte aufgrund der geringen Tierzahlen keine Assoziation zwischen den 3 ermittelten Haplotypen und dem Auftreten der BSE nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass in dem begrenzten Material einige Haplotypen in zu geringer Zahl vorkommen und somit eine statistische Assoziation nicht ermittelt werden konnte. Analysen mit höheren Tierzahlen, insbesondere in der Gruppe der an BSE-Erkrankten sollten die Ergebnisse in Folgearbeiten bekräftigen.

3. ***In silico* Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindestellen**

Der 12 bp Indel Polymorphismus und eine Reihe von Einzelbasen-Austausche (SNPs) sind eng gekoppelt mit dem 23 bp Indel Polymorphismus, für den eine Assoziation des Genotyps zu der Ausbildung von BSE gefunden wurde. Um die Hypothese zu bestätigen, dass eine dieser Mutationen durch die modulierende Wirkung der Transkriptionsfaktoren (TF) einen Einfluss auf die Promotoraktivität und somit auf die Empfänglichkeit für BSE hat, wurde zunächst eine *in silico*-Analyse von TF-Bindestellen durchgeführt. Die Polymorphismen -1980T/C, -1594indel23 bp, -85G/T, +300indel12 bp, +571A/G und +709A/G (Positionen in Bezug auf den Transkriptionsstart) wurden hierbei ermittelt und in weiteren Studien untersucht. Die TF-Bindestellen sind nur bei jeweils einem der Allele dieser Polymorphismen vorhanden, und die beteiligten TF werden in für die BSE-Pathogenese relevanten Geweben exprimiert. Diese potentiellen TF sind SP1 (Stimulierendes Protein 1), AP2 (Aktivator-Protein 4), RP58 (Repressor-Protein 58), NEUROG1 (Neurogenin 1), EGR4 (*early growth response 4*) und POZ (POZ Zink Finger Protein B-Zell Lymphom 6). Darunter stellt SP1 ein ubiquitär gebildetes stimulierendes Protein dar, dessen Beteiligung bei der Promotorregulation für zahlreiche Gene beschrieben wurde (ANDERSON & FREYTAG 1991). AP2 spielt eine Rolle in Geweben ektodermalen Ursprungs (ZHANG et al. 1996), und das Repressor-Protein RP58, welches hauptsächlich im Gehirn gebildet wird (BECKER et al. 1997), wurde nach seiner Funktion benannt (AOKI et al. 1998). Letzteres enthält eine Pox Virus und Zink Finger (POZ) Domäne, die als interagierende Einheit mit SP1 beschrieben wurde. LEE et al. (2002) vermuten, dass die reprimierende Aktivität der POZ Domäne durch eine Interaktion mit der DNA-Bindungskapazität des SP1 ausgeübt wird. Der Transkriptionsfaktor EGR4, welcher auch Nerv-Wachstumsfaktor induzierter Klon C genannt wird, und NEUROG1 sind höchstwahrscheinlich an der Gehirnentwicklung beteiligt (CROSBY et al. 1992, SUN et al. 2001). Das Protein POZ Zink Finger Protein BCL6 spielt eine Rolle in der B-Zell-Differenzierung und reprimiert die Expression ähnlich RP58 (CHANG et al. 1996).

4. **Transkriptionsfaktor-Bindungskapazität zu DNA-Abschnitten des PRNP Promotors**

Die Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren zu ausgewählten DNA-Abschnitten des PRNP Promotors wurde mittels *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) analysiert. Hierbei kommt es im Falle einer Protein-DNA-Bindung zu einem Bandensprung (*shift*), der sich mittels einer Autoradiographie abbilden lässt. Bei fast allen ausgewählten DNA-

Abschnitten konnten *shifts* beobachtet werden. Eine Ausnahme machten die Oligonukleotide, welche die Mutation +571A/G umspannten und bei welchem AP2 als bindender TF postuliert wurde. Ein technischer Fehler konnte in diesem Fall durch positive Ergebnisse mit einem Kontroll-AP2-Oligonukleotid ausgeschlossen werden.

Die beiden Indel Varianten ergaben unterschiedliche Bandenshifts bezüglich ihrer *PRNP* Promotor Allele. Die Spezifität dieser *shifts* wurde mittels Konkurrenz-Bindungsreaktion mit unmarkierten DNA-Sonden überprüft. Die Identität des Proteins, welches einen Bandensprung mit dem 12 bp Insertions-Oligonukleotid herbeiführte, konnte durch eine positive Kontrolle bestätigt werden, wobei isoliertes rekombinantes SP1 verwendet wurde.

Da ein Kernextrakt aus Hirngewebe keinen *shift* mit dem 23 bp Insertions-Oligonukleotid produzierte, dies aber mit einem Kernextrakt aus RP58 überexprimierenden Zellen gelang, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei dem Protein, welches zu diesem *shift* führte, um RP58 handelt. Die Ergebnisse des RP58-EMSA lassen den Schluss zu, dass RP58 eine höhere Affinität zu der Insertions-Variante besitzt. Eine schwache Bindung des RP58 mit dem 23 bp Deletions-Oligonukleotid erklärt sich durch eine Duplikation der Konsensus-Sequenz mit einem Basenaustausch außerhalb der 23 bp Insertion, welche sowohl in dem Insertions- als auch dem Deletions-Oligonukleotid beinhaltet ist.

5. Einfluss von Allelvarianten auf die *PRNP* Promotoraktivität *in vitro*

Der *PRNP* Promotor wurde mit den beiden Indel Polymorphismen in allen vier Kombinationsmöglichkeiten in Promotor-Reportergen-Konstrukte kloniert. Außerdem wurden kurze Konstrukte zur alleinigen Betrachtung des 12 bp Indels im ersten Intron entwickelt, da zuvor gezeigt worden ist, dass Elemente des Intron 1 essentiell für die Promotoraktivität des bovinen *PRNP* Promotors sind (INOUE et al. 1997).

Diese Promotor-Reportergen-Studien zeigten einen Einfluss der Indel Polymorphismen auf die *PRNP* Promotoraktivität. Interessanterweise erhöhte die 12 bp Insertion in den kurzen Konstrukten die Expressionsrate, wohingegen bei den langen Konstrukten die 12 bp Insertion in Kombination mit der 23 bp Insertion zu erniedrigten Expressionswerten führte. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit dem Modell der Interaktion zwischen der POZ Domäne des RP58 und SP1 (LEE et al. 2002), wobei RP58 an den 5'-flankierenden Bereich des *PRNP* Gens bindet und die *PRNP* Promotoraktivität durch Interaktion mit dem im ersten Intron gebundenen SP1 reprimiert. Die höhere Expression des Konstruktes mit beiden Deletionsvarianten korreliert mit der Tatsache, dass Tiere mit dem Allel 23 bp Deletion und

12 bp Deletion häufiger unter den BSE erkrankten Tieren anzutreffen und somit empfänglicher für BSE sind als jene mit beiden Insertionen.

6. Modulation der *PRNP* Promotor-Varianten durch Überexpression von Transkriptionsfaktoren

Entsprechend den Ergebnissen der EMSA-Studie binden SP1 und RP58 an die 12 bp bzw. 23 bp Insertion und modulieren somit möglicherweise die *PRNP* Promotoraktivität. Um den funktionellen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren SP1 und RP58 auf den *PRNP* Promotor zu analysieren, wurden Ko-Transfektionen durchgeführt, wobei SP1- bzw. RP58-exprimierende Vektoren zusätzlich zu den Indel-Konstrukten eingesetzt wurden.

Ohne Einfluss der RP58 Bindungsstelle steigerte eine SP1-Überexpression die Transkription der Deletionsvariante (12 bp Deletion), welches den Einfluss von SP1 auf den *PRNP* Promotor auch in Abwesenheit der 12 bp Insertion im ersten Intron zeigt. Dieser Vektor enthält drei potentielle und der 12 bp Insertionsvektor noch eine zusätzliche SP1-Bindungsstelle durch die Insertion der 12 bp. Da der 12 bp Insertionsvektor ohne SP1-Überexpression höhere Expressionsraten erzielt als der 12 bp Deletionsvektor, scheint SP1 zu der Bindungsstelle in der 12 bp Insertion eine größere Affinität zu besitzen als zu den anderen drei Stellen. Unter experimenteller stark erhöhter SP1-Expression werden vermutlich alle Bindungsstellen von SP1 gebunden, was zu einer gesteigerten Reportergen-Expression führt.

Kotransfektionen mit den Konstrukten, die beide Indel Polymorphismen umfassen, deckten einen reprimierenden Einfluss der 23 bp Insertion im 5'-Bereich des Promoters auf, der sich sogar auf die SP1 Ansprechbarkeit bei Überexpression erstreckt. Diese Ergebnisse sind wiederum kompatibel mit einem Modell, in dem ein reprimierender Faktor selektiv an das 23 bp Insertions-Allel bindet und per Interaktion den stimulierenden Effekt des SP1 unterdrückt, so dass die Expressionshöhe vom Allel des 12 bp Indels abgekoppelt wird. Es scheint also ein reprimierender Faktor an die 23 bp Insertion zu binden, der seinen Effekt durch das an die 12 bp Insertion gebundene SP1 vermittelt.

RP58 ist entsprechend den EMSA-Analysen ein Kandidat für diesen reprimierenden Faktor, jedoch sind die Promotor-Reportergen-Studien mit Kotransfektion eines RP58 exprimierenden Vektors nicht schlüssig. Möglicherweise war das hier verwendete humane Protein in der Lage, eine Bindung mit der Promotorsequenz des bovinen *PRNP* einzugehen, aber funktionell konnte sein reprimierender Effekt in dem heterologen bovinen Zellsystem nicht ausgebildet werden.

7. Einfluss der Indel Polymorphismen des *PRNP* Promotors auf die Expression *in vivo*

Der *in vivo* Einfluss der 12 bp und 23 bp Indel Polymorphismen im Promotor des *PRNP* Gens wurde mittels quantitativer *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) parallel zu der Genotypisierung untersucht. Dafür wurden die bovinen Gewebe Mesenteriallymphknoten, Milz und Stammhirn wegen ihrer Bedeutung bei der BSE-Pathogenese ausgewählt. Die Leber, welche vermutlich keine Rolle bei dem Erregertransport spielt, wurde als Kontrollorgan verwendet.

Die fünf ermittelten Genotypen zeigten nur im Mesenteriallymphknoten eine signifikant unterschiedliche *PRNP*-Expression. Die insgesamt niedrige Expressionsrate des *PRNP* in diesem Organ legt die Vermutung nahe, dass hier während der Erregerverbreitung zum Gehirn eine für die Konversion des PrP^c zu PrP^{Sc} zu überschreitende kritische Schwelle besteht. Die Ergebnisse der qRT-PCR Studie weisen andeutungsweise darauf hin, dass Rinder mit der 23 bp Deletion mehr *PRNP* in ihren Mesenteriallymphknoten exprimieren, wobei eine posttranskriptionelle Kontrolle nicht ausgeschlossen ist und mit dieser Methode nicht beurteilt werden kann. Die beobachteten Unterschiede in der Expressionsrate zwischen den Genotypen sind im Vergleich zu den interindividuellen Schwankungen zwar gering, jedoch ist die Prion Protein Expression nicht in allen Zellen des Lymphknotens absolut gleichmäßig über das ganze Organ ausgeprägt (PALTINIERI et al. 2004). Die Organproben enthalten von Probe zu Probe schwankende Zelltypen und nicht nur eine einzelne Zellart.

Nichtsdestotrotz stehen die Ergebnisse der *PRNP* mRNA Quantifizierung wiederum in Einklang mit der Tatsache, dass das 23 bp Deletionsallel mit einer höheren Empfänglichkeit für BSE assoziiert ist.

VIII. Zusammenfassung

Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit des Rindes

Petra Sander

Sowohl beim Menschen als auch beim Schaf sind Polymorphismen im Prion Protein Gen (*PRNP*) bekannt, die zu unterschiedlicher Empfänglichkeit von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien führen. Entsprechende Polymorphismen sind im *PRNP* Gen des Rindes bisher noch nicht entdeckt worden. Diese Studie hatte das Ziel, *PRNP* Mutationen bei Rindern aufzudecken, und deren möglichen Einfluss auf die Empfänglichkeit für BSE zu überprüfen.

Achtundvierzig gesunde Tiere aus sechs deutschen Rinderrassen und 43 an BSE erkrankte deutsche Rinder wurden im Rahmen einer Mutationsanalyse im Bereich der drei Exons und des regulatorisch wichtigen Promotors vergleichend untersucht. Dabei konnten insgesamt 60 Polymorphismen identifiziert werden, von denen 36 neu entdeckt und 24 bereits zuvor beschrieben wurden. Keiner dieser Mutationen führt zu einer Änderung der Aminosäuren-Sequenz. Ein 23 bp Insertions/Deletions-Polymorphismus (Indel) in der putativen Promotorregion und ein 12 bp Indel im Intron 1 des *PRNP* Gens zeigten jedoch eine unterschiedliche Genotyp- und/oder Allelverteilung zwischen den gesunden und den an BSE erkrankten Rindern. Letztere weisen häufiger an den Indels 23 bp und 12 bp Deletionen auf. Eine plausible Hypothese als Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Polymorphismen im bovinen *PRNP* Promotor zu einer Veränderung der *PRNP* Expression führt, was weiterhin die Inkubationszeit und Empfänglichkeit für BSE beeinflusst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden funktionelle Promotor-Studien *in vitro* und quantitative Real-Time-PCR-Experimente *in vivo* zur Ermittlung der *PRNP* Expressionsrate unter Berücksichtigung des *PRNP* Genotyps durchgeführt. Dabei wurden der 23 bp und der eng gekoppelte 12 bp umfassende Indel, die Bindungssequenzen für RP58 bzw. für SP1 enthalten, untersucht. In electrophoretic mobility shift assays konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren unterschiedlich stark an die verschiedenen Allele binden. Weiterhin offenbarten die Promotor-Studien einen interagierenden Einfluss zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren. Der Haplotyp mit beiden Deletionen erzielte höhere *PRNP*-Expressionsraten als der Haplotyp mit beiden Insertionen, was sich in der Tatsache widerspiegelt, dass das 23 bp Deletionsallel mit höherer Empfänglichkeit für BSE assoziiert ist. Die *in vivo* Versuche deckten erhebliche Unterschiede in der *PRNP* mRNA Menge zwischen unterschiedlichen Geweben auf, wobei der Genotyp im Mesenteriallymphknoten einen signifikanten Einfluss auf die Expressionsrate zeigte.

IX. Summary

Genetic influences on the susceptibility to BSE in cattle

Petra Sander

Different alleles of the prion protein gene (*PRNP*) of human and sheep are known to be associated with varying susceptibilities to transmissible spongiform encephalopathies. However, no polymorphisms in the bovine *PRNP* gene with an effect on susceptibility to prion diseases have been identified so far. This study was dedicated to the detection of such polymorphisms in German cattle breeds.

Forty-eight healthy animals from six different German cattle breeds and 43 BSE affected cattle were analyzed by re-sequencing the region of the three exons and the promoter. A total of 60 polymorphisms in the *PRNP* gene of German cattle were detected. 36 of these 60 polymorphisms were newly identified, whereas 24 of these polymorphisms had been described before. No novel polymorphisms affecting the amino acid sequence of the prion protein could be detected. However a 23 bp insertion/deletion polymorphism (indel) in the putative *PRNP* promoter region and a 12 bp indel in the first intron were discovered, which differ between the allele and/or genotype distribution. BSE affected cattle show more frequently deletions at the indels 12 bp and 23 bp.

A plausible hypothesis explaining this observation could be that the bovine *PRNP* promoter polymorphisms cause changes in *PRNP* expression, which might be responsible for differences in BSE incubation time and/or BSE susceptibility. In order to test this hypothesis a functional promoter analysis of the different bovine *PRNP* promoter alleles was performed by reporter gene assays *in vitro* and by measuring *PRNP* mRNA levels in calves with different *PRNP* genotypes *in vivo*. Two variable sites, a 23 bp indel polymorphism containing the binding site for the transcription factor RP58, and a 12 bp indel polymorphism containing an SP1 binding site were investigated. Band shift assays indicated that there were differences in transcription factor binding to the different alleles at the two polymorphisms. Reporter gene assays demonstrated an interaction between the two postulated transcription factors. The ins/ins allele showed lower expression levels than the del/del allele which is consistent with the notion that the 23 bp deletion allele was associated with a higher susceptibility to BSE in German cattle. The *in vivo* data revealed substantial individual variation of *PRNP* expression in different tissues. In intestinal lymph nodes expression levels differed between the different *PRNP* genotypes.

X. Literaturverzeichnis

- ANDERSON GM, FREYTAG SO (1991) Synergistic activation of a human promoter in vivo by transcription factor Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1935-1943
- AOKI K, MENG G, SUZUKI K, TAKASHI T, KAMEOKA Y, NAKAHARA K, ISHIDA R, KASAI M (1998) RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **273**:26698-26704
- ASANTE EA, LINEHAN JM, DESBRUSLAIS M, JOINER S, GOWLAND I, WOOD AL, WELCH J, HILL AF, LLOYD SE, WADSWORTH JD, COLLINGE J (2002) BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.* **21**:6358-6366
- BALDAUF E, BEEKES M, DIRINGER H (1997) Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J. Gen. Virol.* **78**:1187-1197
- BECKER KG, LEE IJ, NAGLE JW, CANNING RD, GADO AM, TORRES R, POLYMEROPoulos MH, MASSA PT, BIDDISON WE, DREW PD (1997) C2H2-171: a novel human cDNA representing a developmentally regulated POZ domain/zinc finger protein preferentially expressed in brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**:891-899
- BEEKES M, MCBRIDE PA, BALDAUF E (1998) Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J. Gen. Virol.* **79**:601-607
- BENESTAD SL, SARRADIN P, THU B, SCHONHEIT J, TRANULIS MA, BRATBERG B (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**:202-208
- BIACABE AG, LAPLANCHE JL, RYDER S, BARON T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* **5**:110-115
- BLATTNER T, BRANDNER S, RAEBER AJ, KLEIN MA, VOIGTLANDER T, WEISSMANN C, AGUZZI A (1997) PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* **389**:69-73
- BONS N, MESTRE-FRANCES N, BELLI P, CATHALA F, GAJDUSEK DC, BROWN P (1999) Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:4046-4051
- BOSERS A, DE VRIES R, SMITS MA (2000) Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J. Virol.* **74**:1407-1414

- BOSSERS A, SCHREUDER BE, MUILEMAN IH, BELT PB, SMITS MA (1996) PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural Scrapie. *J. Gen. Virol.* **77**:2669-2673
- BROWN HR, GOLLER NL, RUDELLI RD, MERZ GS, WOLFE GC, WISNIEWSKI HM, ROBAKIS NK (1990) The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **80**:1-6
- BROWN P (1998) Transmission of spongiform encephalopathy through biological products. *Dev. Biol. Stand.* **93**:73-78
- BROWN P, GAJDUSEK DC (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337**:269-270
- BROWN P, ROHWER RG, GAJDUSEK DC (1986) Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J. Infect. Dis.* **153**:1145-11458
- BRUCE ME (2003) TSE strain variation. *Br. Med. Bull.* **66**:99-108
- BRUCE ME, WILL RG, IRONSIDE JW, MCCONNELL I, DRUMMOND D, SUTTIE A, MCCARDLE L, CHREE A, HOPE J, BIRKETT C, COUSENS S, FRASER H, BOSTOCK CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE Agent. *Nature* **389**:498-501
- BUELER H, AGUZZI A, SAILER A, GREINER RA, AUTENRIED P, AGUET M, WEISSMANN C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347
- BUELER H, FISCHER M, LANG Y, BLUETHMANN H, LIPP HP, DEARMOND SJ, PRUSINER SB, AGUET M, WEISSMANN C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582
- BUSCHMANN A, BIACABE AG, ZIEGLER U, BENCSIK A, MADEC JY, ERHARDT G, LUHKEN G, BARON T, GROSCHUP MH (2004b) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* **117**:27-36
- BUSCHMANN A, LUHKEN G, SCHULTZ J, ERHARDT G, GROSCHUP MH (2004a) Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP ARR/ARR). *J. Gen. Virol.* **85**:2727-2733
- CASALONE C, ZANUSSO G, ACUTIS P, FERRARI S, CAPUCCI L, TAGLIAVINI F, MONACO S, CARAMELLI M (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3065-3070

- CAUGHEY B (1991) In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **172**:93-107
- CHANG CC, YE BH, CHAGANTI RS, DALLA-FAVERA R (1996) BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:6947-6952
- COLLINGE J, SIDLE KC, MEADS J, IRONSIDE J, HILL AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**:685-690
- COLLINGE J, WHITTINGTON MA, SIDLE KC, SMITH CJ, PALMER MS, CLARKE AR, JEFFERYS JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**:295-297
- COMINCINI S, FOTI MG, TRANULIS MA, HILLS D, DI GUARDO G, VACCARI G, WILLIAMS JL, HARBITZ I, FERRETTI L (2001) Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND). *Mamm. Genome* **12**:729-733
- CREUTZFELDT HG (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **57**:1-18
- CROES EA, ALIZADEH BZ, BERTOLI-AVELLA AM, RADEMAKER T, VERGEER-DROP J, DERMAUT B, HOUWING-DUISTERMAAT JJ, WIENTJENS DP, HOFMAN A, VAN BROECKHOVEN C, VAN DUIJN CM (2004) Polymorphisms in the prion protein gene and in the doppel gene increase susceptibility for Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**:389-394
- CROSBY SD, VEILE RA, DONIS-KELLER H, BARABAN JM, BHAT RV, SIMBURGER KS, MILBRANDT J (1992) Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:4739-4743
- DAUDE N (2004) Prion diseases and the spleen. *Viral Immunol.* **17**:334-349
- DE SILVA R, IRONSIDE JW, MCCARDLE L, ESMONDE T, BELL J, WILL R, WINDL O, DEMPSTER M, ESTIBEIRO P, LATHE R (1994) Neuropathological phenotype and 'prion protein' genotype correlation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* **179**:50-52
- DETWILER LA, BAYLIS M (2003) The epidemiology of scrapie. *Rev. Sci. Tech.* **22**:121-143
- DI PIERRO E, CAPPELLINI MD, MAZZUCHELLI R, MORIONDO V, MOLOGNI D, POMA BZ, RIVA A (2005) A point mutation affecting an SP1 binding site in the promoter of the ferrochelatase gene impairs gene transcription and causes erythropoietic protoporphyrria. *Exp. Hematol.* **33**:584-591

- DONNELLY CA (1998) Maternal transmission of BSE: interpretation of the data on the offspring of BSE-affected pedigree suckler cows. *Vet. Rec.* **142**:579-580
- EDDY RG (1990) Is BSE a new disease? *Vet. Rec.* **126**:537
- EDDY RG (1995) Origin of BSE. *Vet. Rec.* **137**:648
- FORD MJ, BURTON LJ, LI H, GRAHAM CH, FROBERT Y, GRASSI J, HALL SM, MORRIS RJ (2002b)
A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* **111**:533-551
- FORD MJ, BURTON LJ, MORRIS RJ, HALL SM (2002a) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113**:177-192
- FOSTER JD, PARNHAM D, CHONG A, GOLDMANN W, HUNTER N (2001) Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.* **148**:165-171
- GAJDUSEK DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**:943-960
- GENOUD N, BEHRENS A, MIELE G, ROBAY D, HEPPNER FL, FREIGANG S, AGUZZI A (2004)
Disruption of Doppel prevents neurodegeneration in mice with extensive Prnp Deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:4198-4203
- GERSTMANN J, STRÄUSSLER E, SCHEINKER I (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* **154**:736-762
- GIESE A, BROWN DR, GROSCHUP MH, FELDMANN C, HAIST I, KRETZSCHMAR HA (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* **8**:449-457
- GLATZEL M, GIGER O, BRAUN N, AGUZZI A (2004) The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. *Curr. Mol. Med.* **4**:355-359
- GOLDFARB LG, BROWN P, GOLDGABER D, ASHER DM, RUBENSTEIN R, BROWN WT, PICCARDO P, KASCSAK RJ, BOELLAARD JW, GAJDUSEK DC (1990) Creutzfeldt-Jakob disease and kuru patients lack a mutation consistently found in the Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Exp. Neurol.* **108**:247-250
- GOLDFARB LG, CERVENAKOVA L, GAJDUSEK DC (2004) Genetic studies in relation to kuru: an overview. *Curr. Mol. Med.* **4**:375-384
- GOLDFARB LG, PETERSEN RB, TABATON M, BROWN P, LEBLANC AC, MONTAGNA P, CORTELLI P, JULIEN J, VITAL C, PENDELBURY WW, ET AL. (1992) Fatal familial insomnia and familial

- Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **258**:806-808
- GOLDMANN W, HUNTER N, FOSTER JD, SALBAUM JM, BEYREUTHER K, HOPE J (1990) Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:2476-2480
- GOLDMANN W, HUNTER N, MARTIN T, DAWSON M, HOPE J (1991) Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J. Gen. Virol.* **72**:201-204
- GOLDMANN W, O'NEILL G, CHEUNG F, CHARLESON F, FORD P, HUNTER N (1999) PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J. Gen. Virol.* **80**:2275-2283
- GRETZSCHEL A, BUSCHMANN A, EIDEN M, ZIEGLER U, LUHKEN G, ERHARDT G, GROSCHUP MH (2005) Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **52**:55-63
- GROSCHUP MH, BEEKES M, McBRIDE PA, HARDT M, HAINFELLNER JA, BUDKA H (1999) Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **98**:453-457
- HEAD MW, BUNN TJ, BISHOP MT, MCLOUGHLIN V, LOWRIE S, MCKIMMIE CS, WILLIAMS MC, MCCARDLE L, MACKENZIE J, KNIGHT R, WILL RG, IRONSIDE JW (2004) Prion protein heterogeneity in sporadic but not variant Creutzfeldt-Jakob disease: UK cases 1991-2002. *Ann. Neurol.* **55**:851-859
- HEATON MP, HARHAY GP, BENNETT GL, STONE RT, GROSSE WM, CASAS E, KEELE JW, SMITH TP, CHITKO-MCKOWN CG, LAEGREID WW (2002) Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm. Genome* **13**:272-281
- HEATON MP, LEYMASTER KA, FREKING BA, HAWK DA, SMITH TP, KEELE JW, SNELLING WM, FOX JM, CHITKO-MCKOWN CG, LAEGREID WW (2003) Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm. Genome* **14**:765-777
- HEGGEBO R, PRESS CM, GUNNES G, LIE KI, TRANULIS MA, ULVUND M, GROSCHUP MH, LANDSVERK T (2000) 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.* **81**:2327-2337

- HERNANDEZ-SANCHEZ J, WADDINGTON D, WIENER P, HALEY CS, WILLIAMS JL (2002) Genome-wide search for markers associated with bovine spongiform encephalopathy. *Mamm. Genome* **13**:164-168
- HERZOG C, SALES N, ETCHEGARAY N, CHARBONNIER A, FREIRE S, DORMONT D, DESLYS JP, LASMEZAS CI (2004) Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* **363**:422-428
- HILL AF, DESBRUSLAIS M, JOINER S, SIDLE KC, GOWLAND I, COLLINGE J, DOEY LJ, LANTOS P (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450, 526
- HILL AF, JOINER S, WADSWORTH JD, SIDLE KC, BELL JE, BUDKA H, IRONSIDE JW, COLLINGE J (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **126**:1333-1346
- HILLS D, COMINCINI S, SCHLAEPPER J, DOLF G, FERRETTI L, WILLIAMS JL (2001) Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Anim. Genet.* **32**:231-232
- HILLS D, SCHLAEPPER J, COMINCINI S, MACLEAN I, DOLF G, FERRETTI L, OLSAKER I, WILLIAMS JL (2003) Sequence variation in the bovine and ovine PRNP genes. *Anim. Genet.* **34**:183-190
- HOINVILLE LJ, WILESMITH JW, RICHARDS MS (1995) An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the 'feed ban'. *Vet. Rec.* **136**:312-318
- HOPE J (1994) The nature of the scrapie agent: the evolution of the virino. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **724**:282-289
- HORIUCHI M, ISHIGURO N, NAGASAWA H, TOYODA Y, SHINAGAWA M (1997) Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**:650-654
- HORIUCHI M, ISHIGURO N, NAGASAWA H, TOYODA Y, SHINAGAWA M (1998) Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Anim. Genet.* **29**:37-40
- HORIUCHI M, YAMAZAKI N, IKEDA T, ISHIGURO N, SHINAGAWA M (1995) A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.* **76**:2583-2587
- HUANG FP, FARQUHAR CF, MABBOTT NA, BRUCE ME, MACPHERSON GG (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J. Gen. Virol.* **83**:267-271

- HUMENY A, SCHIEBEL K, SEEGER S, BECKER CM (2002) Identification of polymorphisms within the bovine prion protein gene (Prnp) by DNA sequencing and genotyping by MALDI-TOF-MS. *Neurogenetics* **4**:59-60
- HUNTER N, GOLDMANN W, SMITH G, HOPE J (1994) Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet. Rec.* **135**:400-403
- HUNTER N, MOORE L, HOSIE BD, DINGWALL WS, GREIG A (1997) Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet. Rec.* **140**:59-63
- INOUE S, TANAKA M, HORIUCHI M, ISHIGURO N, SHINAGAWA M (1997) Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J. Vet. Med. Sci.* **59**:175-183
- KIMBERLIN RH (1993) Bovine spongiform encephalopathy: an appraisal of the current epidemic in the United Kingdom. *Intervirology* **35**:208-218
- KIRKWOOD JK, CUNNINGHAM AA, WELLS GA, WILESMITH JW, BARNETT JE (1993) Spongiform encephalopathy in a herd of greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*): epidemiological observations. *Vet. Rec.* **133**:360-364
- KITAMOTO T, MURAMOTO T, MOHRI S, DOH-URA K, TATEISHI J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* **65**:6292-6295
- KLEIN MA, FRIGG R, RAEBER AJ, FLECHSIG E, HEGYI I, ZINKERNAGEL RM, WEISSMANN C, AGUZZI A (1998) PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat. Med.* **4**:1429-1433
- KRETZSCHMAR HA, GIESE A, BROWN DR, HERMS J, KELLER B, SCHMIDT B, GROSCHUP MH (1997) Cell death in prion disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **50**:191-210
- KUCZIUS T, GROSCHUP MH (1999) Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol. Med.* **5**:406-418
- LEE DK, SUH D, EDENBERG HJ, HUR MW (2002) POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* **277**:26761-26768
- LEE IY, WESTAWAY D, SMITH AF, WANG K, SETO J, CHEN L, ACHARYA C, ANKENER M, BASKIN D, COOPER C, YAO H, PRUSINER SB, HOOD LE (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.* **8**:1022-1037

LEWIN B (Hrsg.) (1998) Molekularbiologie der Gene. Spektrum Verlag Berlin: 649-710

LLEDO PM, TREMBLAY P, DEARMOND SJ, PRUSINER SB, NICOLL RA (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:2403-2407

LOFFNER F, LOHMANN SM, WALCKHOFF B, WALTER U, HAMPRECHT B (1986) Immunocytochemical characterization of neuron-rich primary cultures of embryonic rat brain cells by established neuronal and glial markers and by monospecific antisera against cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the synaptic vesicle protein synapsin I. *Brain Res.* **363**:205-221

LUGARESI E, MEDORI R, MONTAGNA P, BARUZZI A, CORTELLI P, LUGARESI A, TINUPER P, ZUCCONI M, GAMBETTI P (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* **315**:997-1003

MABBOTT NA, YOUNG J, MCCONNELL I, BRUCE ME (2003) Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J. Virol.* **77**:6845-6854

MAHAL SP, ASANTE EA, ANTONIOU M, COLLINGE J (2001) Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* **268**:105-114

MAIGNEN T, LASMEZAS CI, BERINGUE V, DORMONT D, DESLYS JP (1999) Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J. Gen. Virol.* **80**:3035-3042

MARSH RF, BESEN RA (1993) Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Dev. Biol. Stand.* **80**:111-118

MARSH RF, BESEN RA, LEHMANN S, HARTSOUGH GR (1991) Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **72**:589-594

MARSH RF, HADLOW WJ (1992) Transmissible mink encephalopathy. *Rev. Sci. Tech.* **11**:539-550

MASTRANGELO P, WESTAWAY D (2001) Biology of the prion gene complex. *Biochem. Cell. Biol.* **79**:613-628

MEDSTRAND P, LANDRY JR, MAGER DL (2001) Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J. Biol. Chem.* **276**:1896-1903

- MIDDLETON DJ, BARLOW RM (1993) Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneuronal tissues of affected cattle. *Vet. Rec.* **132**:545-547
- MILLER MW, WILLIAMS ES (2002) Detection of PrP (CWD) in mule deer by immunohistochemistry of lymphoid tissues. *Vet. Rec.* **151**:610-612
- MONTRASIO F, FRIGG R, GLATZEL M, KLEIN MA, MACKAY F, AGUZZI A, WEISSMANN C (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**:1257-1259
- MOORE RC, MASTRANGELO P, BOUZAMONDO E, HEINRICH C, LEGNAME G, PRUSINER SB, HOOD L, WESTAWAY D, DEARMOND SJ, TREMBLAY P (2001) Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:15288-15293
- MORGAN KL (1988) Bovine spongiform encephalopathy: time to take scrapie seriously. *Vet. Rec.* **122**:445-446
- NEIBERGS HL, RYAN AM, WOMACK JE, SPOONER RL, WILLIAMS JL (1994) Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle. *Anim. Genet.* **25**:313-317
- NOVAKOFSKI J, BREWER MS, MATEUS-PINILLA N, KILLEFER J, MCCUSKER RH (2005) Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J. Anim. Sci.* **83**:1455-1476
- PALMER MS, DRYDEN AJ, HUGHES JT, COLLINGE J (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**:340-342
- PALTRINIERI S, COMAZZI S, SPAGNOLO V, RONDENA M, PONTI W, CECILIANI F (2004) Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **52**:1639-1645
- PAN KM, BALDWIN M, NGUYEN J, GASSET M, SERBAN A, GROTH D, MEHLHORN I, HUANG Z, FLETTERICK RJ, COHEN FE, PRUSINER SB (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:10962-10966
- PARRY HB (1983) Scrapie disease in sheep. Academic Press Inc., London
- PEARSON GR, WYATT JM, GRUFFYDD-JONES TJ, HOPE J, CHONG A, HIGGINS RJ, SCOTT AC, WELLS GA (1992) Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet. Rec.* **131**:307-310
- PEDEN AH, IRONSIDE JW (2004) Review: pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol.* **42**:85-91

- PREMZL M, BOZIC P, GAMULIN V (2000) PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. *Anim. Genet.* **31**:408-409
- PRUSINER SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144
- PRUSINER SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**:1515-1522
- PRUSINER SB, FUZI M, SCOTT M, SERBAN D, SERBAN H, TARABOULOS A, GABRIEL JM, WELLS GA, WILESMITH JW, BRADLEY R, et al. (1993) Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. *J. Infect. Dis.* **167**:602-613
- PRUSINER SB, GROTH DF, BOLTON DC, KENT SB, HOOD LE (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**:127-134
- PRUSINER SB, SCOTT MR (1997) Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.* **31**:139-175
- RIEK R, HORNEMANN S, WIDER G, BILLETER M, GLOCKSHUBER R, WUTHRICH K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**:180-182
- RYAN AM, WOMACK JE (1993) Somatic cell mapping of the bovine prion protein gene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle and sheep. *Anim. Genet.* **24**:23-26
- SAEGERMAN C, SPEYBROECK N, ROELS S, VANOPDENBOSCH E, THIRY E, BERKVENS D (2004) Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J. Clin. Microbiol.* **42**:172-178
- SAEKI K, MATSUMOTO Y, MATSUMOTO Y, ONODERA T (1996) Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**:47-52
- SCHLAPFER I, SAITBEKOVA N, GAILLARD C, DOLF G (1999) A new allelic variant in the bovine prion protein gene (PRNP) coding region. *Anim. Genet.* **30**:386-387
- SCHRODER B, FRANZ B, HEMPFLING P, SELBERT M, JURGENS T, KRETZSCHMAR HA, BODEMER M, POSER S, ZERR I (2001) Polymorphisms within the prion-like protein gene (Prnd) and their implications in human prion diseases, Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Hum. Genet.* **109**:319-325.
- SCOTT MR, WILL R, IRONSIDE J, NGUYEN HO, TREMBLAY P, DEARMOND SJ, PRUSINER SB (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **96**:15137-15142

- SOMERVILLE RA, BIRKETT CR, FARQUHAR CF, HUNTER N, GOLDMANN W, DORNAN J, GROVER D, HENNION RM, PERCY C, FOSTER J, JEFFREY M (1997) Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J. Gen. Virol.* **78**:2389-2396
- SPARKES RS, SIMON M, COHN VH, FOURNIER RE, LEM J, KLISAK I, HEINZMANN C, BLATT C, LUCERO M, MOHANDAS T, DEARMOND SJ, WESTAWAY D, PRUSINER SB, WEINER LP (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:7358-7362
- SUN Y, NADAL-VICENS M, MISONO S, LIN MZ, ZUBIAGA A, HUA X, FAN G, GREENBERG ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**:365-376
- TAKASUGA A, ABE T, ITO T, WATANABE T, KAMATANI N, SUGIMOTO Y (2003) Novel prion protein polymorphisms in cattle. *Anim. Genet.* **34**:396-397
- TAYLOR DM (1991) Inactivation of BSE agent. *Dev. Biol. Stand.* **75**:97-102
- TERRY LA, MARSH S, RYDER SJ, HAWKINS SA, WELLS GA, SPENCER YI (2003) Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* **152**:387-392
- TOBLER I, GAUS SE, DEBOER T, ACHERMANN P, FISCHER M, RULICKE T, MOSER M, OESCH B, MCBRIDE PA, MANSON JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**:639-642
- TRANULIS MA, ESPENES A, COMINCINI S, SKRETTING G, HARBITZ I (2001) The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mamm. Genome* **12**:376-379
- VAN KEULEN LJ, SCHREUDER BE, VROMANS ME, LANGEVELD JP, SMITS MA (1999) Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J. Comp. Pathol.* **121**:55-63
- WADSWORTH JD, ASANTE EA, DESBRUSLAIS M, LINEHAN JM, JOINER S, GOWLAND I, WELCH J, STONE L, LLOYD SE, HILL AF, BRANDNER S, COLLINGE J (2004) Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science* **306**:1793-1796
- WEISSMANN C (2004) The state of the prion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:861-871
- WELLS GA, HAWKINS SA, GREEN RB, AUSTIN AR, DEXTER I, SPENCER YI, CHAPLIN MJ, STACK MJ, DAWSON M (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* **142**:103-106

- WELLS GA, SPIROPOULOS J, HAWKINS SA, RYDER SJ (2005) Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet. Rec.* **156**:401-407
- WHITE AR, ENEVER P, TAYEBI M, MUSHENS R, LINEHAN J, BRANDNER S, ANSTEE D, COLLINGE J, HAWKE S (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**:80-83
- WILESMITH JW, WELLS GA, CRANWELL MP, RYAN JB (1988) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* **123**:638-644
- WILLIAMS ES, MILLER MW (2002) Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Rev. Sci. Tech.* **21**:305-316
- WOPFNER F, WEIDENHOFER G, SCHNEIDER R, VON BRUNN A, GILCH S, SCHWARZ TF, WERNER T, SCHATZL HM (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* **289**:1163-1178
- WYATT JM, PEARSON GR, SMERDON TN, GRUFFYDD-JONES TJ, WELLS GA, WILESMITH JW (1991) Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* **129**:233-236
- YOSHIMOTO J, IINUMA T, ISHIGURO N, HORIUCHI M, IMAMURA M, SHINAGAWA M (1992) Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells. *Virus Genes* **6**:343-356
- ZHANG C, DE KONING DJ, HERNANDEZ-SANCHEZ J, HALEY CS, WILLIAMS JL, WIENER P (2004) Mapping of multiple quantitative trait loci affecting bovine spongiform encephalopathy. *Genetics* **167**:1863-1872
- ZHANG J, HAGOPIAN-DONALDSON S, SERBEDZIA G, ELSEMORE J, PLEHN-DUJOWICH D, MCMAHON AP, FLAVELL RA, WILLIAMS T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* **381**:238-241

XI. Publikationsliste

1. Veröffentlichungen in Zeitschriften

a) Originalartikel

SANDER P, HAMANN H, PFEIFFER I, WEMHEUER W, BRENIG B, GROSCHUP MH, ZIEGLER U, DISTL O, LEEB T (2004) Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. *Neurogenetics* **5**:19-25

SANDER P, HAMANN H, DRÖGEMÜLLER C, KASHKEVICH K, SCHIEBEL K, LEEB T (2005) Bovine prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in Bovine Spongiform Encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.* **280**:37408-37414

b) Übersichtsartikel

LEEB T, SANDER P (2005) Genetische Einflüsse auf die BSE-Empfänglichkeit beim Rind – Mythos oder Realität? *Nova Acta Leopoldina (zum Druck angenommen)*

2. Poster

SANDER P, HAMANN H, BRENIG B, ZIEGLER U, GROSCHUP MH, DISTL O, LEEB T (2003) Analysis of Sequence Variability of the Bovine *PRNP* Gene in German Cattle Breeds.

„International Prion-Conference“ im Oktober 2003 in München

SANDER P, HAMANN H, DRÖGEMÜLLER C, KASHKEVICH K, SCHIEBEL K, LEEB T (2005) Funktionelle Charakterisierung des bovinen *PRNP* Promotors im Hinblick auf natürliche Polymorphismen.

Leopoldina Symposium am 25./26. Juli 2005 in Wien

3. Vorträge

SANDER P, BRENIG B, GELDERMANN H, GROSCHUP MH, DISTL O, LEEB T (2003) Analyse der Variabilität des bovinen Prionproteingens (*PRNP*) in deutschen Rinderrassen.

Vortragstagung der DGfZ und der GfT am 17./18. September 2003 in Göttingen

SANDER P, HAMANN H, DRÖGEMÜLLER C, DISTL O, KASHKEVICH K, SCHIEBEL K, LEEB T (2005) Funktionelle Charakterisierung des bovinen *PRNP* Promotors im Hinblick auf natürliche Polymorphismen.

Vortragstagung der DGfZ und der GfT am 21./22. September 2005 in Berlin

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Tosso Leeb für die hervorragende Anleitung und Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke der DFG für die finanzielle Unterstützung. Allen Spendern von Proben und Materialien danke ich für die Mitarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Cord Drögemüller, Ute Phillip, Anne Wöhlke und Bianca Haase für die Hilfe bei fachlichen, methodischen, kreativen und sonstigen Fragen.

Besonders möchte ich mich bei Diana Seinige, Heike Klippert-Hasberg, Karina Zimmer und Herrn Neander unter anderem für die Unterstützung im Labor bedanken.

Ich danke auch Jörn Wrede und Henning Hamann für die Hilfe mit den Computern und der Statistik.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen des Institutes für Tierzucht und Vererbungsforschung für das nette Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Meiner Familie und im Besonderen Thoralf danke ich aus ganzem Herzen für die Unterstützung während all der Jahre des Lernens und Schaffens.