

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Pathogenese und Erregerdifferenzierung  
der atypischen L-Typ- und H-Typ-  
BSE-Infektion bei Rindern**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
Grit Priemer  
Berlin

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Martin H. Groschup,  
Friedrich-Loeffler-Institut,  
Institut für neue und neuartige  
Tierseuchenerreger

PD Dr. Anne Balkema-Buschmann  
Friedrich-Loeffler-Institut,  
Institut für neue und neuartige  
Tierseuchenerreger

1. Gutachter:

Prof. Dr. Martin H. Groschup

2. Gutachter:

Prof. Dr. Matthias Greiner

Tag der mündlichen Prüfung:

05. November 2018

*Glücklich, wer noch hoffen kann,  
aus diesem Meer des Irrtums aufzutauchen!  
Was man nicht weiß, das eben braucht man,  
und was man weiß, kann man nicht brauchen.*

J. W. v. Goethe (Faust)

A handwritten signature in black ink, likely of Johann Wolfgang von Goethe, written in a cursive style. The signature is positioned to the right of the text above it.

*Meinen Eltern*



**Im Rahmen dieser Dissertation veröffentlichte Manuskripte, Publikationen, Posterpräsentationen, Vorträge**

**Folgende Manuskripte wurden im Zuge dieser Doktorarbeit zur Publikation bereits veröffentlicht:**

G. Priemer, A. Balkema-Buschmann, B. Hills, M.H. Groschup, 2013: Biochemical Characteristics and PrP<sup>Sc</sup> Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE.

(Priemer *et al.*, 2013) PLoS One. 2013 Jun 21;8(6):e67599. Print 2013.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805320> Free PMC Article

A. Balkema-Buschmann, G. Priemer, M. Keller, M. Mazza, B. Hills, M.H. Groschup 2016: Intra- and Interspecies Transmission of Atypical BSE – What Can We Learn from It?

Review Article ©2016 Food Safety Commission, Cabinet Office, Government of Japan; doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2016023 (Balkema-Buschmann *et al.*, 2016)

**Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Fachtagungen bereits vorgestellt:**

G. Priemer, A. Balkema-Buschmann, C. Fast, B. Hills, M.H. Groschup: Atypical BSE - Biochemical Characteristics and Distribution Pattern of Pathological Prion Protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the Brains of Experimentally Challenged Cattle

Vortrag beim CRL/EURL Meeting London, Juni 2011

A. Balkema-Buschmann, U. Ziegler, G. Priemer, M. Keller, C. Fast, B. Hills, M.H. Groschup: Classical or Atypical BSE in cattle – where does the difference hide?

Vortrag beim 2nd Spanish Prion Meeting Madrid, Dezember 2011

G. Priemer, A. Balkema-Buschmann, R. Rogers, B. Hills, C. Fast, U. Ziegler, M.H. Groschup: Biochemical Characteristics and Distribution Pattern of PrP<sup>Sc</sup> Accumulated in Different Brain Regions of Cattle Experimental Challenged with H-type and L-type Atypical BSE

Posterbeitrag bei der Prion2011 Konferenz, Montreal, Kanada, Mai 2011

C. Fast, A. Balkema-Buschmann, U. Ziegler, G. Priemer, M. Eiden, M. Keller, M.H. Groschup: Klassische und atypische BSE: Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Vortrag bei der 55. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „Pathologie“ Fulda, März 2012

A. Balkema-Buschmann, G. Priemer, C. Fast und M.H. Groschup: BSE infectivity in the peripheral muscle, but not in the lymphoreticular system of cattle experimentally challenged with atypical BSE

Vortrag beim Nationalen Symposium für Zoonosenforschung Berlin, Oktober 2012

A. Balkema-Buschmann, G. Priemer, B. Hills, C. Fast, M. Keller, M.H. Groschup: Infectivity in Peripheral Muscle but not in Lymphoreticular System of Cattle intracranially challenged with L-Type and H-Type BSE

Posterbeitrag bei der Prion2012 Konferenz, Amsterdam, Niederlande, Mai 2012

A. Balkema-Buschmann, G. Priemer, M. Keller, R. Möller und M.H. Groschup: Distribution of PrP<sup>Sc</sup> in brain regions of a natural German H-type BSE case.

Posterbeitrag bei der Prion2014 Konferenz, Triest, Italien, Mai 2014

A. Balkema-Buschmann, G. Priemer, M. Keller, M. Mazza, B. Hills, M.H. Groschup: Intra- and Interspecies Transmission of Atypical BSE - What can we learn from it?

Vortrag beim Animal TSE workshop, Prion2016 Konferenz Tokyo, Japan, Mai 2016

A. Balkema-Buschmann, C. Fast, U. Ziegler, M. Keller, E. Liebler-Tenorio, A. Weber, M. Kaatz, M. Eiden, M. Franz, L. McIntyre, A.M. Oelschlegel, G. Priemer, B. Hammerschmidt, M.H. Groschup: Pathogenese der klassischen und atypischen BSE beim Rind

Vortrag bei der AVID – DVG „Virologie“-Tagung, Bad Staffelstein, September 2016

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	I
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	V
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	VIII
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	IX
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b> .....	3
2.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien .....	3
2.2. Theorien zur Ätiologie des Erregers von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien.....	3
2.2.1. Virus-Hypothese.....	3
2.2.2. Virino-Hypothese.....	3
2.2.3. Protein only-Hypothese .....	4
2.3. Das Prion-Protein (PrP).....	4
2.3.1. Das zelluläre Prion-Protein (PrP <sup>C</sup> ).....	4
2.3.2. Die krankheitsassoziierte Isoform des Prion-Proteins (PrP <sup>Sc</sup> ).....	5
2.3.3. Inaktivierung von Prionen.....	6
2.3.4. Diagnostische Möglichkeiten.....	6
2.4. TSE bei Tier und Mensch .....	8
2.4.1. TSE beim Tier .....	8
2.4.2. TSE beim Menschen.....	10
2.5. Die klassische BSE im Hinblick auf den Verbraucherschutz .....	12
2.5.1. Epidemiologie der BSE .....	12
2.5.2. Zusammenhang zwischen der BSE-Epidemie und der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD).....	13
2.5.3. BSE/TSE-Bekämpfungsmaßnahmen.....	14
2.6. Atypische Bovine Spongiforme Enzephalopathie .....	15
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	19

---

3.1. Material.....	19
3.1.1. Versuchstiere .....	19
3.1.2. Probenmaterial / Organproben.....	20
3.2. Methoden .....	22
3.2.1. Proteinbiochemische Methoden .....	22
3.2.1.1. Herstellung von Hirnhomogenaten.....	22
3.2.1.2. Enzymimmunoassay (EIA).....	23
3.2.1.3. Fällung mit Phosphorwolframsäure (PTA-Fällung) .....	24
3.2.1.4. Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
3.2.1.5. Western Blot (PTA-WB) .....	24
3.2.1.6. PK-Stabilität: Empfindlichkeit des PrP <sup>Sc</sup> gegenüber dem enzymatischen Abbau mit Proteinase K.....	26
3.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungsmethoden	26
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
4.1. Untersuchungen zu BSE-Erregereigenschaften.....	28
4.1.1. Proteinbiochemische Untersuchung zur BSE-Differenzierung .....	28
4.1.1.1. Glykosylierungsmuster (Glykoprofil) .....	28
4.1.1.2. Proteinase K (PK)-Stabilität .....	29
4.1.2. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur BSE-Differenzierung.....	32
4.2. Verteilung von pathologischem Prion-Protein (PrP <sup>Sc</sup> ) in mit BSE-infizierten Rindern.....	35
4.2.1. Verteilung von PrP <sup>Sc</sup> im Gehirn BSE-infizierter Rinder .....	35
4.2.1.1. Proteinbiochemische Untersuchungen .....	35
4.2.1.1.1. Enzymimmunoassay (EIA) .....	35
4.2.1.1.2. Western Blot (PTA-WB).....	37
4.2.1.2. Histologische Untersuchungen .....	39

4.2.2. Verteilung von PrP <sup>Sc</sup> in peripheren Organen von mit atypischer BSE infizierten Rindern .....	39
4.2.2.1. Proteinbiochemische Untersuchungen .....	39
4.2.2.1.1. Enzymimmunoassay (EIA / ELISA) .....	40
4.2.2.1.2. Western Blot (PTA-WB).....	40
4.2.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen .....	40
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>43</b>
5.1. Biochemische Untersuchungen zur Differenzierung der BSE-Typen .....	44
5.2. Histopathologische Untersuchungen zur Differenzierung der drei BSE-Typen .....	46
5.3. Verteilung von pathologischem Prion-Protein (PrP <sup>Sc</sup> ) im Rind .....	48
5.3.1. Verteilung von PrP <sup>Sc</sup> im Gehirn von mit atypischer BSE infizierten Rindern .....	48
5.3.1.1. Proteinbiochemische Untersuchungen .....	48
5.3.2. Verteilung von PrP <sup>Sc</sup> in peripheren Organen atypischer BSE-infizierter Rinder .....	51
5.3.2.1. Proteinbiochemische Untersuchungen .....	51
5.3.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen .....	51
5.3.2.3. Pathogenesestudien mit Hilfe von Tgbov XV-Mäusen (Maus-Bioassay) .....	52
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>55</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>57</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>59</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>70</b>
9.1. Material.....	70
9.1.1. Tiergut klassische BSE .....	70
9.1.2. Antikörper gegen das Prion-Protein (PrP).....	71
9.1.3. Konjugate .....	71
9.1.4. Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	72

---

9.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	74
9.2. Methoden .....	76
9.2.1. Verwendete Puffer und Lösungen, Rezepturen .....	76
9.2.2. Protokolle biochemischer Methoden .....	83
9.2.2.1. Kurzprotokoll des IDEXX HerdChek® BSE-Scrapie Antigen EIA.....	83
9.2.2.2. Kurzprotokoll der modifizierten PTA-Fällung.....	83
9.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gele .....	84
9.2.2.4. Western Blot .....	84
9.2.3. Protokolle histologischer Methoden .....	85
9.2.3.1. Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica, ASP 300S), Standardprotokoll .....	85
9.2.3.2. H.-E.- Färbeprotokoll.....	85
9.2.3.3. Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie .....	86
9.2.3.4. Protokolle der Immunhistochemie.....	87
9.2.3.5. Auswertung von histologisch untersuchten Schnittpräparaten.....	89
9.3. Ergebnistabellen.....	90
9.3.1. Ergebnisse der TSE-Schnelltestuntersuchung von Gehirnproben mittels IDEXX HerdChek® BSE-Scrapie Antigen EIA .....	90
9.3.2. Untersuchungen zu den Erregereigenschaften der drei BSE-Formen L-Typ, H-Typ und C-Typ mittels PTA-WB.....	93
9.3.2.1. Glykopprofil.....	93
9.3.2.2. Proteinase K-Stabilität .....	94
9.3.2.3. Quantifizierung / Signalintensitäten.....	96
9.3.2.4. Immunhistochemie (IHC) .....	96

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser (lat. <i>Aqua destillata</i> )
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
BASE	Bovine Amyloidotische Spongiforme Enzephalopathie, (L-Typ)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
°C	Grad Celcius
C-terminal	den Carboxy-Terminus eines Proteins betreffend
C-(Typ-)BSE	klassische BSE
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. <i>Creutzfeldt-Jakob Disease</i> )
CWD	chronisch auszehrende Krankheit der Hirschartigen (engl. <i>Chronic Wasting Disease</i> )
DAB	Diaminobenzidin
DMNV	dorsaler motorischer Nukleus des <i>Nervus vagus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach der Inokulation
DRG	dorsales Wurzelganglion (engl. <i>dorsal root ganglion</i> )
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )
EIA	Enzymimmunoassay (s. auch ELISA)
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay (s.a. EIA)
ENS	enterisches Nervensystem
FFI	Fatale Familiäre Schlaflosigkeit (Insomnie)
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
GALT	Darm-assoziiertes lymphozytäres Gewebe
GB	Großbritannien
Ggl.	Ganglion
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheincker-Syndrom
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
H.-E.	Hämotoxylin-Eosin
H-(Typ-)BSE	atypische BSE-Form, die nach Proteinase K-Verdau und Gelelektrophorese durch eine höhere molekulare Masse der unglykosylierten Prion-Protein-Fraktion im Vergleich zur klassischen BSE charakterisiert ist
i. c.	intrakranial
IHC	Immunhistochemie
IZ	Inkubationszeit
kDa	Kilodalton

L-(Typ-)BSE	atypische BSE-Form, die nach Proteinase K-Verdau und Gelelektrophorese durch eine geringfügig niedrigere molekulare Masse der unglykosylierten Prion-Protein-Fraktion im Vergleich zur klassischen BSE charakterisiert ist
LRS	lymphoretikuläres System
Ln./Lnn.	Lymphknoten, ~ (Plural), lat. <i>Lymphonodus/Lymphonodi</i>
M	molar
MDT	Magen-Darm-Trakt
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
Musc.	Muskel, lat. <i>Musculus</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MM	Molekulare Masse
µm	Mikrometer
mpi	Monate nach der Inokulation
n	Anzahl
N.	Nerv, lat. <i>Nervus</i>
n. a.	nicht auswertbar
Ncl.	<i>Nucleus</i>
N-terminal	den Amino-Terminus eines Proteins betreffend
OD	optische Dichte
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit ( <i>Office Internationale des Epizooties</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PK	Proteinase K
PMCA	zyklische Vermehrung fehlgefalteter Prion-Proteine (engl. <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i> )
PNS	peripheres Nervensystem
PP	Peyer'sche Platten
PRNP	Prion-Protein-Gen
PrP	Prion-Protein
PrP <sup>C</sup>	zelluläres (physiologisches) Prion-Protein
PrP <sup>Sc</sup>	fehlgefaltete, pathologische Isoform des Prion-Proteins
PTA	Phosphorwolframsäure (engl. <i>phosphotungstic acid</i> )
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>tris-buffered saline</i> )
Tgbov XV	transgene Mauslinie, die das bovine Prion-Protein überexprimiert
TKBA	Tierkörperbeseitigungsanstalt

---

TME	Transmissible Enzephalopathie der Nerze (engl. <i>transmissible mink encephalopathy</i> )
TRG	Trigeminalganglion
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie(n)
V	Volt
vCJD	variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Synonym nvCJD)
VK	Vereinigtes Königreich
w/v	Gewichtsvolumen (engl. <i>weight-volume-ratio</i> )
ZNS	zentrales Nervensystem

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung eines Querschnittes der Obexregion im Hirnstamm mit den drei für die Untersuchung einer TSE wichtigsten Nervenkernegebieten .....	7
<b>Abb. 2:</b> Darstellung der zehn in dieser Studie untersuchten Gehirnregionen.....	22
<b>Abb. 3:</b> Glykopprofile von C-, L- und H-BSE nach Western Blot (PTA-WB).....	29
<b>Abb. 4:</b> Proteinase K-Stabilität der drei BSE-Formen bei unterschiedlichen PK-Konzentrationen.....	31
<b>Abb. 5:</b> Proteinase K-Stabilität der drei BSE-Formen nach Langzeit-PK-Verdau ....	31
<b>Abb. 6:</b> Histopathologische Läsionen in den Kernegebieten der Obexregion .....	33
<b>Abb. 7:</b> Ausschnitt aus einem Rückenmarkssegment (L3) eines mit H-BSE infizierten und erkrankten Rindes.....	34
<b>Abb. 8:</b> Sehnerven von H- und L-BSE-infizierten Rindern immunhistochemisch markiert mit monoklonalem Antikörper-Cocktail aus 6C2 und F99/97.6.1 .....	35
<b>Abb. 9:</b> Abbildung der mittels IDEXX-ELISA ermittelten OD-Werte in den zehn untersuchten Hirnregionen .....	36
<b>Abb. 10:</b> PrP <sup>Sc</sup> -Verteilungsmuster ermittelt per IDEXX HerdChek <sup>®</sup> EIA-Untersuchung von zehn unterschiedlichen Gehirnregionen mit einem zugelassenen BSE-Schnelltestsystem, durchgeführt nach Herstellerangabe (Kurzprotokoll) .....	37
<b>Abb. 11:</b> Western Blot-Untersuchung von zehn Hirnregionen von Rindern mit klinischen Erscheinungen einer C-, L- oder H-BSE-Erkrankung unter Anwendung des monoklonalen Antikörpers L42 als Detektionsantikörper.....	38
<b>Abb. 12:</b> Graphische Darstellung der Intensitäten der PTA-WB-Signale im Vergleich klassische BSE zur atypischen L- bzw. H-BSE .....	39
<b>Abb. 13:</b> Immunhistochemisch dargestellte PrP <sup>Sc</sup> Ablagerung im peripheren Nervensystem (PNS) von mit atypischer L- bzw. H-BSE infizierter Rinder .....	42

**TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tab. 1:</b> Übersicht über bekannte Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tier und Mensch .....	12
<b>Tab. 2:</b> Definition der spezifizierten Risikomaterialien (SRM) gemäß VO (EG) 999/2001 mit Änderungen aus der VO (EU) Nr. 2015/728, zuletzt geändert durch VO (EG) Nr. 2016/1396 .....	15
<b>Tab. 3:</b> Fälle atypischer BSE weltweit (Stand: März 2017).....	18
<b>Tab. 4:</b> Übersicht über die Versuchstiere der tierexperimentellen Studie zur atypischen BSE bei Rindern (in Anlehnung an (Balkema-Buschmann <i>et al.</i> , 2011c) 20	
<b>Tab. 5:</b> Übersicht über die untersuchten Organproben pro Tier aus unterschiedlichen Organsystemen .....	21
<b>Tab. 6:</b> Biochemisch, histopathologisch und immunhistochemisch untersuchtes Nervengewebe .....	43
<b>Tab. 7:</b> Übersicht über die oral mit klassischer BSE infizierten Rinder als Vergleichsgruppe aus der BSE-Pathogenitätsstudie (Hoffmann <i>et al.</i> , 2007).....	70
<b>Tab. 8:</b> Übersicht über die im Western Blot und in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper.....	71
<b>Tab. 9:</b> Übersicht zu Vorbehandlungen von Gewebeschnitten in Abhängigkeit des verwendeten, monoklonalen Prion-Protein-Antikörpers.....	87
<b>Tab. 10:</b> Bewertungsschema zur graduellen Einteilung des Ausprägungsgrades histopathologischer Veränderungen (spongiforme Veränderungen des Neuropils und vakuoläre Degenerationen von Neuronen) an H.-E.-Schnittpräparaten.. .....	90
<b>Tab. 11:</b> Bewertungsschema zur graduellen Einteilung des Anteils PrP <sup>Sc</sup> -positiver Zellen an der Gesamtzellzahl der Gewebestruktur für die immunhistochemischen Untersuchungen .....	90
<b>Tab. 12:</b> OD-Werte der atypische L-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( <i>n</i> =6) .....	91
<b>Tab. 13:</b> OD-Werte der atypische H-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( <i>n</i> =5) .....	91
<b>Tab. 14:</b> OD-Werte der klassischen C-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( <i>n</i> =4), zusätzlich ein nicht infiziertes, negatives Kontrolltier KT29.....	92
<b>Tab. 15:</b> Mittelwerte der optischen Dichte (OD) innerhalb der jeweiligen BSE-Form sowie der jeweiligen Gehirnregion.....	92

---

<b>Tab. 16:</b>	Glykoprofil von L-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit L-BSE infizierten Rindern ( $n=5$ ) .....	93
<b>Tab. 17:</b>	Glykoprofil von H-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit H-BSE infizierten Rindern ( $n=5$ ).....	93
<b>Tab. 18:</b>	Glykoprofil von C-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit C-BSE infizierten Rindern ( $n=4$ ).....	94
<b>Tab. 19:</b>	Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber steigender PK-Konzentration: molekulare Masse der unglykosylierten PrP <sup>Sc</sup> -Bande (Mittelwerte aus drei Testläufen).....	94
<b>Tab. 20:</b>	Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber steigender PK-Konzentration aus drei Testläufen (prozentuale Anteile am Gesamtsignal) .....	94
<b>Tab. 21:</b>	Mittelwerte der prozentualen Anteile am Gesamtsignal je BSE-Form aus drei Testläufen bei steigender PK-Konzentration .....	95
<b>Tab. 22:</b>	Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber Langzeit-PK-Verdau: molekulare Masse der unglykosylierten PrP <sup>Sc</sup> -Bande (Mittelwerte aus drei Testläufen) .....	95
<b>Tab. 23:</b>	Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber Langzeit-PK-Verdau aus drei Testläufen (prozentuale Anteile am Gesamtsignal): .....	95
<b>Tab. 24:</b>	Mittelwerte der prozentualen Anteile am Gesamtsignal je BSE-Form aus drei Testläufen im Langzeit-PK-Verdau .....	95
<b>Tab. 25:</b>	Intensitäten der PTA-WB-Signale in unterschiedlichen Gehirnregionen im Vergleich klassische zu atypischer L- bzw. H-BSE.....	96
<b>Tab. 26:</b>	Seminquantitative Bewertung der immunhistochemischen Untersuchung nervaler Gewebe von mit atypischer L- bzw. H-BSE infizierten Rindern .....	96

## 1. EINLEITUNG

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) zählt zur Gruppe der sogenannten Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE), bei denen es sich um neurodegenerative, progressive und stets letal verlaufende Erkrankungen vorwiegend des Nervensystems handelt. Die erste bekannt gewordene Erkrankung aus dieser Gruppe war Scrapie beim Schaf, die bereits im Jahre 1732 (McGowan, 1922) beschrieben wurde. Erst viel später, im Jahre 1986, wurde BSE bei Rindern entdeckt (Wells *et al.*, 1987) und als Ursache die Verfütterung von ungenügend hitzeinaktivierten Tierkörpermehlen oder Milchaustauschern vermutet (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991; Wilesmith & Wells, 1991; Paisley & Hostrup-Pedersen, 2004). Weitere zehn Jahre darauf (1996) trat in England erstmals eine neuartige TSE-Erkrankung beim Menschen auf, die in örtlichem und zeitlichem Zusammenhang mit der BSE-Epidemie gebracht werden konnte und deren zoonotischer Charakter anhand von Infektionsversuchen an Mäusen und Primaten dargestellt (Collinge *et al.*, 1996b; Will *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997) und als Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) benannt wurde. Im Gegensatz dazu ließ sich bis heute für Scrapie keine Übertragung auf den Menschen nachweisen. Als verursachendes Agens wird ein fehlgefaltetes Protein postuliert (Prusiner, 1982).

Lange Zeit ging man von nur einem BSE-Erregerstamm aus, jedoch konnten im Jahre 2004 in Frankreich und Italien unabhängig voneinander BSE-Erkrankungen bei Rindern nachgewiesen werden, deren Erreger bei biochemischen Untersuchungen einige Unterschiede zu dem bisher bekannten BSE-Stamm aufwiesen (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004). Seither spricht man von klassischer BSE (C-Typ-BSE oder C-BSE) im Gegensatz zur atypischen BSE mit ihren beiden bisher beschriebenen Subtypen H- (*high*) und L- (*low*) Typ atypische BSE (H- bzw. L-BSE). Da über diese neuartigen Erregertypen zunächst keine Informationen in Bezug auf ihr zoonotisches Potential, die genaueren biochemischen Eigenschaften und ihre Pathogenese bekannt waren, wurden sie Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Diese Dissertationsschrift, die sich mit den Stammeigenschaften und der Pathogenese der beiden 2004 erstmals beschriebenen atypischen BSE-Stämme beim Rind auseinandersetzt, wurde durch Rinder-Infektionsstudien am FLI und den daraus gewonnenen Probenmaterialien möglich. Ein Ziel war es im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes das Risiko einer möglichen Übertragbarkeit von atypischer BSE auf den Menschen durch potenziell in die Lebensmittelkette gelangendes infiziertes Rindermaterial

abzuschätzen und die Definition der sog. spezifizierten Risikomaterialien (SRM) für atypische BSE zu diskutieren.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bzw. Prionkrankheiten sind eine Gruppe von neurodegenerativen, progressiven und stets tödlich verlaufenden Proteinopathien. Sie kommen sowohl beim Menschen als auch bei diversen Tierarten vor und sind durch schwammartige (spongiforme) Veränderungen im Nervensystem, v.a. in Gehirn und Rückenmark, bei fehlender Immunantwort, charakterisiert. Außerdem lassen sich Neuronenuntergänge und Gliosen beobachten, seltener auch amyloide Plaques. Durch die degenerativen Veränderungen im Nervengewebe kommt es klinisch zu Verhaltensstörungen (Überempfindlichkeit, Ängstlichkeit), Konditionsverlust und Ataxien. Diese sind jedoch nicht pathognomonisch, da auch ZNS-Erkrankungen anderer Genese eine ähnliche Symptomatik hervorrufen können. Als mögliche Differentialdiagnose bei ZNS-Störungen sollte eine TSE-Erkrankung immer mit bedacht werden. Sie sind weiterhin geprägt durch ihre langen Inkubationszeiten, die mehrere Jahre, beim Menschen bis zu mehrere Jahrzehnte, dauern können. Die Übertragung kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen und wird durch den Erregerstamm beeinflusst. Als Ursachen kommen genetische, spontane sowie infektiöse (einschließlich iatrogene) Formen vor. Bis heute lassen sich Prionkrankheiten weder therapieren noch heilen.

### 2.2. Theorien zur Ätiologie des Erregers von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

#### 2.2.1. Virus-Hypothese

Die Virus-Hypothese vermutet als krankheitserregendes Agens ein „*slow virus*“, ein nicht identifiziertes, virusähnliches Partikel mit einer sehr langen Inkubationszeit analog zu Retroviren (Diringer *et al.*, 1994). Diese Hypothese setzt eine Erbinformation zugrunde und somit auch das Vorhandensein einer Nukleinsäure, die jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden konnte.

#### 2.2.2. Virino-Hypothese

Als Sonderform der Virus-Hypothese geht diese von einer, aufgrund ihrer geringen Größe schwer nachweisbaren, sehr kleinen Nukleinsäure aus, umgeben von einer virusähnlichen Hülle (Dickinson & Outram, 1988).

### 2.2.3. Protein only-Hypothese

Die Protein only-Hypothese postuliert als infektiöses Agens ein proteinartiges Partikel, wobei der Begriff „Prion“ durch PRUSINER (Prusiner, 1982) aus *proteinaceous infectious particle* geprägt wurde. Aufgrund mangelnder Inaktivierung des Erregers durch stringente physikalische und chemische Verfahren wurde das Vorhandensein von Nukleinsäuren ausgeschlossen. Jedoch gelang eine teilweise Inaktivierung mittels biochemischer, proteinabbauender bzw. Protein-denaturierender Methoden. Als infektiöses Agens fungierte dabei das körpereigene (Oesch *et al.*, 1985), aber fehlgefaltete Prion-Protein (PrP), welches sich autokatalytisch repliziert.

## 2.3. Das Prion-Protein (PrP)

### 2.3.1. Das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>)

Das physiologisch vorkommende, membranassoziierte Zelloberflächenprotein PrP<sup>C</sup> (*c=cellular, dt.: zellulär*) ist, wie für Glykoproteine charakteristisch, am C-terminalen Ende über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an die Zelloberfläche gebunden. Es wird durch das wirtseigene Prion-Protein-Gen (PRNP-Gen) kodiert (Oesch *et al.*, 1985), welches bei vielen Säugetierarten hochkonserviert vorliegt und sogar mit recht hoher Sequenzübereinstimmung auch bei Fischen und Vögeln vorkommt. Die Größe des Prion-Proteins ist speziesabhängig und umfasst ca. 250 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 33-35 Kilodalton (kDa) (je nach Glykosylierung). Die Sekundärstruktur des PrP<sup>C</sup> besteht überwiegend aus  $\alpha$ -Helices (42%) und nur zu einem geringen Grad (3%) aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993), wodurch es in milden Detergenzien löslich und gegenüber enzymatischen Abbau sensibel ist (Prusiner, 1998). Das Prion-Protein verfügt über zwei Kohlenhydratbindungsstellen, wodurch das typische Dreibandenmuster im Western Blot entsteht, entsprechend der zweifach, der einfach und der unglykosylierten Form des Proteins. PrP<sup>C</sup> ist in vielen Organen exprimiert, dabei mit den höchsten Konzentration im ZNS, v.a. auf Neuronen (Kretzschmar *et al.*, 1986) und Astrozyten (Brown *et al.*, 1998a; Brown, 1999b) sowie im Darmtrakt (Morel *et al.*, 2004), im Lymphgewebe (Brown *et al.*, 1999) und in der Skelettmuskulatur (Brown *et al.*, 1998b). Die Bedeutung des Prion-Proteins ist bis heute nicht vollständig geklärt, obwohl sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit diesem Thema beschäftigen. So wiesen einige Studien auf eine Anreicherung an Synapsen der neuromuskulärer Endplatte (Harris *et al.*, 1991) mit Auswirkung auf die Langzeitpotenzierung unter Beteiligung des

Kupfermetabolismus (Brown *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998c) hin, während andere Arbeitsgruppen einen Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *et al.*, 1996) nachweisen konnten. Weiterhin beschrieben sind Wirkungen auf Zellwanderung und -differenzierung, Überlebensdauer von Zellen durch Schutz vor oxidativem Stress sowie Beteiligung bei transmembranen Signalübertragungen (Hegde *et al.*, 1998; Westergard *et al.*, 2007; Martin-Lannere *et al.*, 2016; Faris *et al.*, 2017; Ramljak *et al.*, 2017; Urrea *et al.*, 2017). Allerdings sind genetisch veränderte Tiere auch ohne Prion-Protein lebensfähig (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994; Richt *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Die krankheitsassoziierte Isoform des Prion-Proteins (PrP<sup>Sc</sup>)**

PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> (Sc=Scrapie) sind in Primär- und Sekundärstruktur identisch, d.h. sie weisen gleiche Aminosäuresequenzen auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Tertiärstruktur. Die pathologische Isoform des Prion-Proteins PrP<sup>Sc</sup> besteht in seiner Kernregion im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> zu einem entscheidenden Anteil aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen (ca. 43%) bei einem vermindertem Anteil der  $\alpha$ -Helix-Struktur (30%), welche in einer erhöhten Resistenz gegenüber dem enzymatischen Abbau mit Proteasen, z.B. Proteinase K, sowie einer erhöhten Aggregatbildungstendenz (Pan *et al.*, 1993) resultiert. Beides macht man sich in der Diagnostik zu Nutze: Die nach unvollständigem Enzymabbau verbleibende Kernregion (engl. *core*) des Prion-Proteins besitzt nur noch eine molekulare Masse von 27-30 kDa (Bolton *et al.*, 1982; McKinley *et al.*, 1983). Die Aggregate lassen sich als sog. Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) (Merz *et al.*, 1981) nach entsprechender Aufarbeitung mittels Elektronenmikroskopie oder Western Blot darstellen (McKinley *et al.*, 1986; Stack *et al.*, 1995). Diese Eigenschaften (partielle Protease-Resistenz, Aggregatbildung) werden ebenfalls für die Ausbildung der TSE-Erkrankung (v.a. Neurodegeneration) durch zunehmende Ablagerung fehlgefalteter Proteine insbesondere in Nervengewebe verantwortlich gemacht, welche nach progressiver Konversion der physiologischen in die pathologische Isoform des Prion-Proteins auftritt und zum Absterben von Nervenzellen führt. Die Mechanismen dieser Konversion (Umfaltung) sind noch nicht vollständig geklärt. Diverse Theorien wurden hierzu untersucht, die wichtigsten sind zum einen das *Heterodimermodell* (Prusiner, 1991; Cohen *et al.*, 1994) und zum anderen das *Keimbildungsmodell* (Jarrett & Lansbury, 1993; Orgel, 1996). Beim Heterodimermodell lagert sich PrP<sup>Sc</sup> an PrP<sup>C</sup> an, um danach in einer enzymatischen Autokatalyse das physiologische, zelluläre PrP<sup>C</sup> in seine pathologische Isoform PrP<sup>Sc</sup> umzuwandeln. Das nun entstandene PrP<sup>Sc</sup>-Homodimer zerfällt in

Monomere, welche weitere Konversionen katalysieren. Erweitert wurde dieses Modell noch um ein mögliches Protein X als die Replikation beeinflussenden (behindernden bzw. fördernden), bisher nicht identifizierten Co-Faktor (Telling *et al.*, 1995). Das Keimbildungsmodell geht von einer „linearen Kristallisation“ aus. Im Grundzustand herrscht zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> ein thermodynamisches Gleichgewicht. Kommt es jedoch zu einem Anstieg bzw. einer Anhäufung von PrP<sup>Sc</sup>-Monomeren (z.B. durch exogene Zufuhr oder spontaner Konversion), führt dies zu einer Keim- und Aggregatbildung. Die so gebildeten Aggregate zerfallen in etliche kleine Fragmente, die wiederum als Kristallisationskeime dienen, wodurch es zu einem exponentiellen Anstieg von PrP<sup>Sc</sup> kommt (Jarrett & Lansbury, 1993; Orgel, 1996).

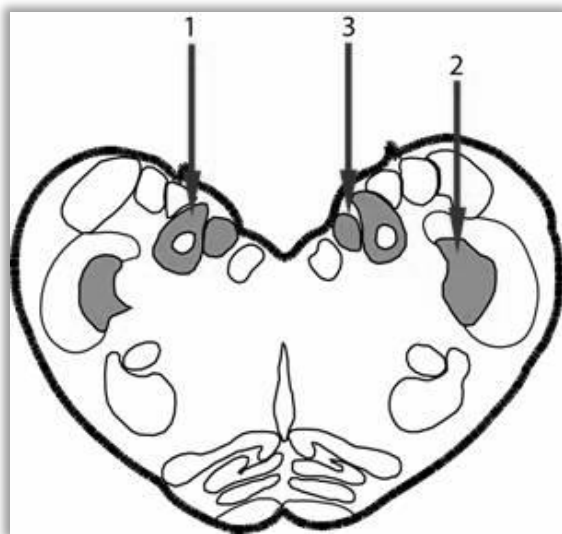
### 2.3.3. Inaktivierung von Prionen

Aufgrund der fehlenden Nukleinsäure sind die üblicherweise zur Inaktivierung von Viren, Bakterien und Pilzen eingesetzten Desinfektionsmittel gegen Prionen wirkungslos. TSE-assoziierte Agenzien sind außerordentlich tolerant gegenüber herkömmlichen chemischen und physikalischen Inaktivierungsverfahren (Anonym, 2011). Die außergewöhnliche Stabilität des Scrapie-Erregers gegenüber Hitze-Einwirkung sowie auch gegen ultraviolette Strahlung (Alper *et al.*, 1967; Alper, 1985) war bereits frühzeitig bekannt (Hunter & Millson, 1964; Zlotnik & Rennie, 1967). Demgegenüber konnten denaturierende Verfahren zum Abbau von Proteinen die Infektiosität senken (Prusiner, 1982). Routinemäßig werden TSE-kontaminierte Materialien und Gegenstände einem kombinierten Hitze-Druck-Verfahren durch Dampfdruck-Sterilisation mittels Autoklaven unterworfen (134°C bei 3 bar für mind. 1 h) (Anonym, 2011). Alternativ zu diesem thermischen Verfahren ist das chemische Verfahren durch Anwendung einer Endkonzentration von 1 molarer Natronlauge (1 M NaOH) oder 2,5% Natriumhypochlorit für mind. 1 h anzuwenden, wobei die Dauer der Einwirkzeit bei hoher Erregerlast und je nach Beschaffenheit des zu behandelnden Materials (Materialstärke, Hohlräume etc.) auf bis zu 24h erhöht werden sollte. Beim kombinierten thermisch-chemischen Verfahren erfolgt die Autoklavierung bei >121°C für mind. 30 min und einer Endkonzentration von 1 M NaOH.

### 2.3.4. Diagnostische Möglichkeiten

Die zuverlässige Diagnose einer TSE-Erkrankung ist bisher nur postmortal möglich. Die hierfür vorgeschriebene Zielregion für die diagnostische Untersuchung auf das Vorliegen einer TSE-Erkrankung ist die Obexregion im Hirnstamm, für kleine

Wiederkäuer entsprechend den Vorgaben des Internationalen Tierseuchenamtes (*OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccination for Terrestrial Animals 2008*) zusätzlich Kleinhirn zum Ausschluss einer atypischen Scrapie. Wells *et al.* fanden heraus, dass in der Obexregion mit ihren Nervenkernegebieten (Abb. 1) der frühestmögliche Nachweis einer Vakuolisierung und PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen erfolgen kann (Wells *et al.*, 1987; Wells *et al.*, 1989). Die Obexregion sowie das Kleinhirn sind über das Hinterhauptsloch (*Foramen occipitale magnum*) mittels scharfem Löffel erreichbar ohne die Schädelhöhle eröffnen zu müssen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines Querschnittes der Obexregion im Hirnstamm mit den drei für die Untersuchung einer TSE wichtigsten Nervenkernegebieten (Anonym, 2016b): 1. *Nucleus tractus solitarii*, 2. *Nc. tractus spinalis nervi trigemini*, 3. *Nc. dorsalis motorius nervi vagi* (DMNV)

Die bereits erwähnte partielle Resistenz gegenüber dem enzymatischen Proteinase K-Abbau bildet die Basis für die TSE-Diagnostik. Die partielle enzymatische Resistenz ist stammspezifisch und kann somit zur Differenzierung der TSE-Stämme herangezogen werden (Hope *et al.*, 1999; 2000). Die für die Routinediagnostik zugelassenen TSE-Schnelltestverfahren sind in VO (EG) 999/2001 Anhang X, Kapitel C festgelegt (ELISA, Immunoassay oder Western Blot). Nach wiederholt reaktivem Befund muss eine Bestätigung sowie weitergehende Diagnostik am Nationalen Referenzlabor für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems gemäß Vorgaben des Internationalen Tierseuchenamtes (*OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccination for Terrestrial Animals*) erfolgen. Die Bestätigungsuntersuchung wird mittels aufwändiger Aufreinigung der Scrapie-assoziierten Fibrillen (SAF) durchgeführt, der die elektrophoretische Auftrennung des pathologischen Prion-Proteins im Western Blot-Verfahren folgt. Eine weitere Untersuchungsmethode stellt die immunhistochemische (IHC) Färbung am histologischen Schnittpräparat dar, bei der

die intra- und extrazellulären Prion-Protein-Ablagerungen mittels spezifischer PrP-Antikörper auf Zellebene sichtbar gemacht werden (Miller *et al.*, 1993; Hardt *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist bei Nachweis einer TSE-Erkrankung bei kleinen Wiederkäuern seit 2005 eine weiterführende Diagnostik zur Differenzierung einer BSE- oder Scrapie-Infektion gemäß VO (EG) Nr. 214/2005 vorgeschrieben. Hierfür findet der sogenannte „Diskriminatorische FLI-Test“ seine Anwendung, der auf dem Einsatz unterschiedlicher PrP-spezifischer Antikörper (Gretzschel *et al.*, 2005), basierend auf unterschiedlichen Schnittstellen im TSE-erregerspezifischen Prion-Protein, beruht (Hope *et al.*, 1999).

## **2.4. TSE bei Tier und Mensch**

### **2.4.1. TSE beim Tier**

#### *Scrapie*

Die am längsten bekannte und als Archetyp bezeichnete TSE ist Scrapie beim Schaf, welche sich bereits bis ins Jahr 1732 als sog. Traberkrankheit zurückverfolgen lässt (McGowan, 1922). Als Archetyp der TSE bestimmt sie einen Großteil der Terminologie. Außer bei Schafen kommt Scrapie auch bei Ziegen und Mufflons natürlich vor (Wood & Done, 1992; Wood *et al.*, 1992a; Wood *et al.*, 1992b). Klinisch ist Scrapie durch vermehrten Juckreiz (engl. *to scrape* = kratzen) sowie einem trabartigen Gang (Traberkrankheit) bis hin zu Ataxien und Zittern (franz. *la Tremblante*) geprägt. Scrapie ist eine epidemisch verlaufende Herdentierkrankung, die direkt oder indirekt von Tier zu Tier übertragbar ist, wobei der vertikalen bzw. peripartalen Übertragung von Muttertier auf die Nachkommen eine wichtige Rolle im Verbreitungsgeschehen zukommt.

Eine Variante der Scrapie stellt die atypische Scrapie oder Nor98 dar (Benestad *et al.*, 2003), die sich von klassischer Scrapie durch ein abweichendes PrP-Bandenmuster unterscheidet. Sie ist als Einzeltierkrankung unabhängig vom Vorkommen klassischer Scrapie im betroffenen Gebiet oder Bestand beschrieben, weshalb eine spontane Pathogenese postuliert wird. Des Weiteren ist bei atypischer Scrapie eine ausgeprägte Beteiligung des Kleinhirns mit PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen anstelle des Hirnstammes auffällig, was unter Umständen zu falsch negativen Ergebnissen bei der Routinediagnostik führen kann.

### TME

1947 wurde erstmals bei nordamerikanischen Zucht-Nerzen (*Mustela vison*) eine neurodegenerative, tödlich verlaufende Erkrankung festgestellt und als Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME) bezeichnet (Burger & Hartsough, 1965; Hartsough & Burger, 1965). Zurückzuführen ist diese Prionkrankheit höchstwahrscheinlich auf die Verfütterung TSE-kontaminierter Fleischabfälle, da das Futter als einzig gemeinsame Infektionsquelle bei allen Tieren identifiziert werden konnte. Kurze Zeit darauf wurde die histopathologische Ähnlichkeit zu Scrapie festgestellt (Marsh, 1974). Neben Nordamerika wurden TME-Ausbrüche später auch in Kanada, Finnland, Russland und der DDR festgestellt.

### CWD

Die chronisch auszehrende Krankheit der Hirschartigen (*Chronic Wasting Disease*, CWD) wurde Ende der 1960er Jahre erstmals bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren beobachtet und mittels histopathologischer Befunde als TSE eingestuft (Williams & Young, 1980), wobei CWD 1981 dann auch bei wildlebenden Hirschen festgestellt wurde (Spraker *et al.*, 1997). Bis zum Jahre 2016 galt Nordamerika als einziges Endemiegebiet für CWD, was sich jedoch mit dem erstmaligen Auftreten der CWD vereinzelt bei wildlebenden Rentieren und Elchen in Norwegen sowie 2018 in Finnland änderte (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1149/pdf>).

In Südkorea traten CWD-Fälle in aus Kanada importierten, in Gefangenschaft gehaltenen Elchen auf (Sohn *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2013).

### BSE

Durch das Auftreten der im Vereinigten Königreich in den 1980er Jahren epidemisch auftretenden Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) bei Rindern erregten diese unkonventionellen Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier zunehmende Aufmerksamkeit (Wells *et al.*, 1987). Als Ursache wurde im Vereinigten Königreich die Verfütterung von unzureichend hitzeinaktiviertem Tiermehl an Rinder festgestellt (Wilesmith & Wells, 1991). In Folge des Verbringens von infektiösen Tiermehlen und infizierten Rindern traten dann auch BSE-Fälle in weiteren EU-Staaten und später auch weltweit auf. Bis zur Entdeckung zweier neuer, atypischer BSE-Stämme 2004 ging man allgemein von nur einem BSE-Stamm aus (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004). Auf die Bovine Spongiforme Enzephalopathie wird in den Kapiteln 2.5 sowie 2.6 näher eingegangen.

### *FSE*

Bei in Zoos lebenden Feliden wurde die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) nachgewiesen (Aldhous, 1990; Leggett *et al.*, 1990), die sich (ähnlich wie bei der TME) durch die Verfütterung BSE-Agens-haltiger Futtermittel (Tierkörper und Tierkörperanteile inklusive des Nervensystems von BSE-infizierten Rindern) infiziert hatten (Pearson *et al.*, 1991; Wyatt *et al.*, 1991; Kirkwood & Cunningham, 1994).

### *EUE*

Ein TSE-ähnliches klinisches Bild sowie eine Bestätigung der Verdachtsdiagnose konnte ebenfalls bei in britischen Zoos lebenden exotischen Wiederkäuern (*Bovidae*) nachgewiesen werden (Exotische Huftier Enzephalopathie, EUE), die ebenfalls auf die Verfütterung von aus TSE-infizierten Viehkadavern gewonnenen Tiermehlen zurückzuführen war (Kirkwood & Cunningham, 1994).

## **2.4.2. TSE beim Menschen**

Die häufigste Transmissible Spongiforme Enzephalopathie des Menschen ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (*Creutzfeldt-Jakob Disease*, CJD), welche in vier Formen existiert: sporadisch, familiär, infektiös (auch iatrogen) sowie die Variante der CJD. Creutzfeldt und Jakob beschrieben bereits 1920 bzw. 1921 unabhängig voneinander eine „eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems“, die sie als *Spastische Pseudosklerose* bezeichneten (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Der Nachweis der Übertragbarkeit der CJD und deren Zuordnung zu den TSE gelang jedoch erst in den 1960er Jahren (Gibbs *et al.*, 1968). Am häufigsten tritt die sporadische Form der CJD (sCJD) auf, bei der es vermutlich zu einer spontanen Fehlfaltung des Prion-Proteins kommt (Prusiner, 1998). Seltener, jedoch familiär gehäuft, treten hereditäre TSE beim Menschen auf, wie die familiäre Form der CJD (fCJD) sowie deren Spezialformen Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI, Tödliche Familiäre Schlaflosigkeit). Zu den infektiös bedingten Prionkrankheiten des Menschen zählt die iatrogene Form der CJD (iCJD), verursacht durch Transplantationen (Cornea, Dura mater) oder verabreichte kontaminierte Hormone (Cooke, 1998; Brown *et al.*, 2006). Weiterhin zählt Kuru zu den TSE infektiöser Genese beim Menschen. Diese Erkrankung trat beim Fore-Stamm in Papua Neuguinea auf, welche dort endemisch durch rituellen Endokannibalismus verursacht wurde und damit noch zwei Jahre vor CJD als erste TSE-Erkrankung des Menschen erkannt wurde (Gajdusek & Zigas, 1957; Gajdusek *et al.*, 1966). Die letzte beschriebene TSE des Menschen ist die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), die erstmals 1996

im Vereinigten Königreich bei auffallend jüngeren Menschen im Alter von 19 bis 41 Jahren beschrieben (Will *et al.*, 1996) und in zeitlichen und räumlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der BSE-Epidemie (s. Kap. 2.5.2.) bei britischen Rindern in den 1980er Jahren gebracht wurde (Collinge *et al.*, 1996a; Will *et al.*, 1996). Bis Ende 2016 wurde bei insgesamt 178 britischen Bürgern sowie bei 51 Patienten in 11 anderen Ländern vCJD festgestellt (Diack *et al.*, 2014; Anonym, October 2016). Untersuchungen zur Erregerstamm-Typisierung anhand biochemischer Methoden sowie tierexperimenteller Studien u.a. an Primaten und mittels Maus-Bioassay ergaben für vCJD ähnliche Ergebnisse wie für BSE, FSE und EUE und konnten die Übereinstimmung des PrP<sup>Sc</sup> von vCJD mit dem des BSE-Erregers nachweisen. Bei mit BSE infizierten Rhesusaffen konnten ähnliche Plaques wie in den Gehirnen von vCJD-Patienten festgestellt werden (Lasmézas *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden analoge molekulare Charakteristika des PrP<sup>Sc</sup> beschrieben, so dass für BSE und vCJD das gleiche Glykopprofil (Collinge *et al.*, 1996b) und identische Molekulargewicht der Kernregion (Hill *et al.*, 1997b) nachgewiesen werden konnten, wodurch vCJD klar abgrenzbar von sCJD ist. Diese Befunde waren durch Infektionsversuche in diversen Mauslinien (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a) sowie nach Passage in Mäusen (Ritchie *et al.*, 2009) reproduzierbar.

Des Weiteren traten vCJD-Fälle durch Infektionen mittels Bluttransfusionen von vCJD-Spendern auf, die zum Zeitpunkt der Blutspende noch nicht klinisch erkrankt waren (Will & Kimberlin, 1998).

<b>Prionkrankheiten der Tiere</b>				
<b>Name der TSE</b>		<b>Abkürzung</b>	<b>Betroffene Tierart(en)</b> <i>(natürlich vorkommende Infektion)</i>	<b>Ätiologie</b>
Scrapie (Traberkrankheit)	klassisch		Schaf, Ziege, Mufflon	hereditär, infektiös
	atypisch		Schaf, Ziege	spontan
Transmissible Mink Enzephalopathie		TME	Nerz	infektiös (oral)
Bovine Spongiforme Enzephalopathie („Rinderwahn“)	klassisch	C-BSE	Rind, (Ziege)	infektiös (oral)
	atypisch	L-BSE, H-BSE	Rind	spontan
Chronisch Auszehrende Krankheit der Hirsche <i>(Chronic Wasting Disease)</i>		CWD	Hirschartige (Cervidae)	infektiös (oral)
Feline Spongiforme Enzephalopathie		FSE	Katzenartige (Felidae)	infektiös (oral)
Exotische Huftier Enzephalopathie <i>(Exotic Ungulate Encephalopathy)</i>		EUE	Hornträger (Bovidae)	infektiös (oral)
<b>Prionkrankheiten des Menschen</b>				
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit		CJD	sCJD fCJD iCJD vCJD	spontan familiär, hereditär infektiös (iatrogen) infektiös (oral)
Kuru				infektiös (oral, Endokannibalismus)
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom		GSS		hereditär
Fatale Familiäre Insomnie		FFI		hereditär

**Tab. 1:** Übersicht über bekannte Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tier und Mensch

## 2.5. Die klassische BSE im Hinblick auf den Verbraucherschutz

### 2.5.1. Epidemiologie der BSE

Epidemiologische Studien zum Auftreten der BSE-Krise in den 1980ern führten zu der Erkenntnis, dass die Ursache in massiven Änderungen des Aufbereitungsprozesses von Tierkadavern in britischen Tierkörperbeseitigungsanstalten (TKBA) aus ökonomischen Gründen zu suchen war, welche zur unzureichenden Erhitzung von Wiederkäuerfetten/-proteinen und damit mangelnden Inaktivierung des BSE-Erregers führte. Die Verfütterung so hergestellten Tiermehls (Fleisch-Knochenmehl) und von Milchaustauschern (Wilesmith & Wells, 1991) führte schließlich zur massenhaften Verbreitung der BSE. Dabei ist bis heute ungeklärt, ob der Indexfall ein Scrapie-infizierter kleiner Wiederkäuer (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith & Wells, 1991) oder ein an spontaner BSE erkranktes Rind (Eddy, 1995) war. Gegen die Hypothese

Scrapie-positiver Schafe als potenzielle Infektionsquelle spricht der bislang fehlende Nachweis eines natürlich an Scrapie erkrankten Rindes. Außerdem konnten in tierexperimentellen Studien in Mäusen und Rindern Unterschiede im PrP<sup>Sc</sup> Glykopprofil zwischen BSE und Scrapie dargestellt werden (Fraser *et al.*, 1992; Kuczius *et al.*, 1998). Ferner konnten Rinder mit Scrapie experimentell nicht oral infiziert werden (Cutlip *et al.*, 2001; Konold *et al.*, 2013).

Auffällig dabei war, dass Milchkühe deutlich häufiger betroffen waren als Fleischrinder, was durch die Futtermittelkonzentration aufgrund höherem Energie-/Proteinbedarf als mögliche Infektionsquelle bedingt war. Seit Entdeckung der BSE 1985 waren allein im Vereinigten Königreich bis 2003 über 180.000 Rinder mit klinisch manifester BSE betroffen und 1-3 Millionen Rinder wurden vermutlich mit BSE infiziert, jedoch vor Ausprägung klinischer Symptome für den menschlichen Verzehr geschlachtet (Smith & Bradley, 2003). Somit wird davon ausgegangen, dass über 3 Millionen dieser präklinischen BSE-Rinder in den 1980er und 1990er Jahren in die Lebensmittelkette gerieten (Anderson *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 2002). Anfang der 1990er Jahre wurden die ersten BSE-Fälle außerhalb des Vereinigten Königreichs festgestellt (Schweiz, Portugal). In den Folgejahren traten BSE-Fälle zunehmend, jedoch immer mit deutlich geringerer Inzidenz als im Vereinigten Königreich, in anderen, vorwiegend europäischen Staaten auf, die höchstwahrscheinlich auf den Import lebender Rinder (Schreuder *et al.*, 1997) sowie tiermehlhaltiger Futtermittel und Rinderprodukte aus dem Vereinigten Königreich zurückzuführen waren (Hornlimann *et al.*, 1994). Keiner der damals in Europa gebräuchlichen Tierkörperverwertungsprozesse war vollkommen effektiv zur Inaktivierung des TSE-Agens (Taylor *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1997).

### **2.5.2. Zusammenhang zwischen der BSE-Epidemie und der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD)**

Aufgrund der BSE-Epidemie wurden im Vereinigten Königreich ab 1990 aufgetretene Fälle von CJD von einer eigens dafür eingerichteten *CJD Surveillance Unit* erfasst und näher untersucht, um Veränderungen im bekannten Muster der CJD gezielt erkennen und einen möglichen Zusammenhang mit BSE herstellen zu können. Dadurch wurden erstmals 1996 zehn Fälle einer bis dato unbekannt Form der CJD bei auffallend jungen Menschen entdeckt (Will *et al.*, 1996). Anhand klinischer und genetischer Daten sowie histopathologischer Untersuchungen an Gehirnschnitten konnten bei diesen

zehn Patienten im Alter von 19 bis 41 Jahren deutliche Unterschiede zu bisher aufgetretenen CJD-Fällen aufgezeigt werden. Der früheste dieser sog. vCJD-Fälle trat im Februar 1994 klinisch in Erscheinung. Somit war ein zeitlicher Zusammenhang mit der BSE-Epidemie zu erkennen. Epidemiologische Studien in anderen Ländern (Frankreich, Deutschland, Italien, Niederlande) folgten analog und führten zu derselben Erkenntnis (Delasnerie-Laupretre *et al.*, 1995).

### **2.5.3. BSE/TSE-Bekämpfungsmaßnahmen**

Nachdem zunehmend auch in anderen EU-Ländern als dem Vereinigten Königreich einheimische BSE-Fälle auftraten, wie u.a. im November 2000 in Deutschland, wurden BSE-Bekämpfungsmaßnahmen in einer EU-weiten Verordnung zusammengeführt: Mit Inkrafttreten der EU (VO) Nr. 999/2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter TSE-Erkrankungen wurden das EU-weite Verfütterungsverbot tierischer Eiweiße in Form von Tiermehlen an alle Säugetiere, die generelle Entfernung und unschädliche Beseitigung spezifizierten Risikomaterials bei Wiederkäuern in Schlachtbetrieben und die verbindliche BSE-Schnelltestuntersuchung bei ab 30 Monate (in Deutschland sogar ab 24 Monate) alten gesundgeschlachteten sowie not- bzw. krankgeschlachteten Rindern in allen Mitgliedstaaten einheitlich vorgeschrieben. Die BSE-Überwachung hatte somit zwei Ziele: zum einen den vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutz durch die Entfernung der Risikomaterialien (Tab. 2) und die BSE-Testung von Schlachttieren sowie zum anderen die epidemiologische Risikoabschätzung per Monitoringprogramm verendeter und getöteter Rinder. 2002 folgte dann die Ausweitung des TSE-Monitoringprogramms stichprobenartig auch auf über 18 Monate alte Schafe und Ziegen.

Mit den Rückgängen von BSE-Nachweisen in den Mitgliedstaaten in den folgenden Jahren erfolgte eine schrittweise Altersanhebung bei der verpflichtenden BSE-Testung gesundgeschlachteter Rinder: 2009 von 30 auf 48 Monate, 2011 von 48 auf 72 Monate, 2013 von 72 auf 96 Monate. Ab 2013 wurde den EU-Mitgliedstaaten bereits freigestellt, auf eine systematische BSE-Testung zu verzichten. Seit Mitte 2015 ist die BSE-Untersuchungspflicht gesundgeschlachteter Rinder nun auch in Deutschland aufgehoben, bestehen bleibt die BSE-Untersuchungspflicht jedoch bei Schlachtung aus besonderem Anlass sowie zwecks Monitoring getöteter und verendeter Rinder über 48 Monate. Weiterhin erfolgt eine stichprobenartige Testung bei über 18 Monate alten Schafen und Ziegen sowie sonstigen TSE-empfindlichen Tierarten.

Der letzte klassische BSE-Fall wurde in Deutschland 2009 diagnostiziert. Am 25. März 2016 wurde in Frankreich ein Fall mit klassischer BSE bei einem 2011 in Frankreich geborenen Rind festgestellt (Anonym, 2016a). Gleichzeitig traten überwiegend sporadisch Fälle atypischer BSE auf. Insgesamt addieren sich diese atypischen Fälle weltweit verbreitet inzwischen auf über 100 Fälle (Tab. 3).

Tierart		Gewebe
RIND	bei allen Rindern	Tonsillen letzten vier Meter des Dünndarms, der Blinddarm und das Gekröse
	zusätzlich bei Rindern über 12 Monaten	Schädel ohne Unterkiefer, jedoch einschließlich Gehirn und Augen Rückenmark
	zusätzlich bei Rindern über 30 Monaten	Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, die Dorn- und Querfortsätze der Hals-, Brust- und Lendenwirbel und <i>Crista sacralis mediana</i> sowie Kreuzbeinflügel, aber einschließlich der Spinalganglien
SCHAFE und ZIEGEN	bei allen Schafen und Ziegen	Milz
		Ileum
	Schafe und Ziegen, älter als 12 Monate bzw. bei denen ein bleibender Schneidezahn das Zahnfleisch durchbrochen hat	Schädel einschließlich Gehirn und Augen
		Tonsillen Rückenmark

**Tab. 2:** Definition der spezifizierten Risikomaterialien (SRM) gemäß VO (EG) 999/2001 mit Änderungen aus der VO (EU) Nr. 2015/728, zuletzt geändert durch VO (EG) Nr. 2016/1396

Bei Rindern aus Mitgliedstaaten mit vernachlässigbarem BSE-Risiko gelten nur der Schädel ohne Unterkiefer, einschließlich Gehirn und Augen, und das Rückenmark von über zwölf Monate alten Rindern als spezifizierte Risikomaterialien. Deutschland hat am 6. Juli 2016 den Status "vernachlässigbares Risiko" erhalten.

## 2.6. Atypische Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Fast 15 Jahre wurde weltweit von der Existenz nur eines BSE-Stammes bei erkrankten Rindern ausgegangen. Diese Annahme wurde jedoch 2004 von Biacabe *et al.* und Casalone *et al.* 2004 widerlegt. Sie beschrieben unabhängig voneinander insgesamt zwei weitere BSE-Formen, die bei Rindern in einem Alter von über acht Jahren auftreten können (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004). Weltweit wurden seither über 100 Fälle von atypischer BSE nachgewiesen, wobei die Mehrzahl der Funde Europa betraf, obschon auch Rinder in Japan, den USA und Kanada betroffen waren (Tab. 3). Der erste in Frankreich festgestellte Fall atypischer BSE zeichnete sich im Glykosylierungsmuster durch eine geringgradig (1-2 kDa) höhere molekulare Masse

der unglykosylierten PrP-Bande im Vergleich zur klassischen BSE aus und wurde daher als H-Typ (*high*) bezeichnet (Biacabe *et al.*, 2004). Der erste Fall atypischer BSE in Italien war durch eine geringfügig niedrigere molekulare Masse (ca. 1 kDa) der unglykosylierten PrP-Fraktion gekennzeichnet, weshalb er als L-Typ (*low*) angesprochen wurde (Casalone *et al.*, 2004). Des Weiteren fanden sich beim L-Typ in der immunhistochemischen Untersuchung vermehrt plaque-artige PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen, weshalb diese auch als *Bovine Amyloidotic Spongiforme Encephalopathy* (BASE) bezeichnet wurde. Auch unterschied sich beim L-Typ das anatomische Verteilungsmuster der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen innerhalb des Gehirns: Hier gab es eine stärkere Beteiligung des Thalamus sowie des Riechhirns, während bei der klassischen BSE die Obexregion am stärksten betroffen ist. Infektionsversuche an human-PrP-transgenen Mäusen sowie Makaken gaben für den L-Typ zudem Hinweise auf ein höheres zoonotisches Potenzial im Vergleich zur klassischen BSE (Comoy *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2008). Retrospektive Untersuchungen der in Deutschland bei über acht Jahre alten Rindern nachgewiesenen BSE-Fälle ergaben je einen Fall von H-Typ-BSE und einen Fall von L-Typ-BSE (Buschmann *et al.*, 2006), bei weiteren laufenden Untersuchungen sowie einer späteren retrospektiven Untersuchung aller über sechs Jahre alten Rinder wurde ein weiterer H-BSE-Fall und zwei weitere L-BSE-Fälle gefunden, so dass für Deutschland insgesamt zwei Fälle von H-BSE und drei Fälle von L-BSE beschrieben wurden (Balkema-Buschmann *et al.*, 2016). Aufgrund der vergleichsweise geringen Fallzahl bei überwiegend älteren Rindern sowie der weltweiten Verbreitung wird bei atypischer BSE von einer spontanen Genese ausgegangen. Die klinischen Erscheinungen ähneln denen der klassischen BSE (Lombardi *et al.*, 2008; Balkema-Buschmann *et al.*, 2011b; Konold *et al.*, 2012), weshalb die Klinik nicht zur Differenzierung zwischen atypischer und klassischer BSE herangezogen werden kann. Zur Erforschung der Herkunft der atypischen BSE wurden Infektionsversuche an PrP-transgenen Mäusen durchgeführt. Nach Übertragung des H-Typs auf bovinen- und ovines-PrP-transgene Mäuse wurde nach biochemischer Untersuchung der infizierten Mausgehirne im Western Blot wieder das atypische H-Typ-Bandenmuster nachgewiesen (Beringue *et al.*, 2006). In anderen Studien zeigte sich jedoch nach mehrfacher Passage in Wildtyp-Mäusen (Baron *et al.*, 2011; Bencsik *et al.*, 2013) und bovinisierten, transgenen Mäusen (Torres *et al.*, 2011) ein dem der klassischen BSE ähnelndes Bandenprofil. Auch zeigte sich nach mehrfacher Subpassage eines H-Typ-Inokulates in bovinisierten, PrP-transgenen

Mäusen ein bisher unbekanntes, sich vom C-, L- sowie H-Typ-BSE differenzierendes Bandenprofil, das auch nach anschließender Inokulation in Rinder unterschiedlich zu den drei bisher bekannten BSE-Phänotypen blieb (Masujin *et al.*, 2016). Nach Übertragung des L-Typs konnte bei der biochemischen Untersuchung der infizierten Mausgehirne im Western Blot in den bovines-PrP-transgenen Mäusen wieder das atypische L-Typ-Bandenprofil nachgewiesen werden, jedoch wiesen die ovinisierten, transgenen Mäuse das für klassische BSE typische Bandenmuster auf (Beringue *et al.*, 2007). Übertragungsversuche dieses Isolates in nicht-transgene, konventionelle Mäuse zeigten nach Erstpassage noch keine nachweisbare Infektion, jedoch lag nach Subpassage in diesen Mauslinien ebenfalls das Bandenprofil der klassischen BSE vor (Capobianco *et al.*, 2007). Daraus lässt sich die Vermutung aufstellen, dass sich die klassische BSE nach Passage in verschiedenen Spezies aus der atypischen BSE entwickelt haben könnte. Infektionsversuche an Rindern dienten der Ermittlung der anatomischen Verteilung in Gehirn und Peripherie atypischer BSE im Vergleich zur klassischen BSE. So konnten nach intrakranialer Inokulation von Rindern mit dem L-Typ PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in peripheren Nerven (Iwamaru *et al.*, 2010) sowie in der Skelettmuskulatur (Suardi *et al.*, 2012) klinisch erkrankter Rinder nachgewiesen werden. Der Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in anderen Organsystemen von mit atypischer L-Typ- oder H-Typ-infizierter Rinder gelang hingegen nicht (Balkema-Buschmann *et al.*, 2011a). Somit scheint die Ausbreitung des pathologischen Prion-Proteins bei der atypischen BSE analog zur klassischen BSE auf dem neuronalen Weg stattzufinden. Die Untersuchungen in dieser Dissertationsschrift bauen auf diesen Untersuchungen auf und sollen einen systematischen Überblick über die anatomische Verteilung in einzelnen Gehirnregionen sowie peripheren Organsystemen liefern.

Land	H-Typ-BSE	L-Typ-BSE
<b>EU-Mitgliedstaaten</b>		
Dänemark	0	1
Deutschland	2	3
Frankreich	16	16
Irland	5	1
Italien	0	5
Niederlande	1	3
Österreich	1	2
Polen	2	12
Portugal	2	0
Rumänien	0	1
Schweden	1	0
Slowenien	1	0
Spanien	7	7
Tschechien	1	0
Vereinigtes Königreich	6	9
<b>Nicht-EU</b>		
Brasilien	2	0
Japan	0	1
Kanada	1	1
Norwegen	1	0
Schweiz	2	0
USA	2	1
<b>gesamt</b>	<b>53</b>	<b>63</b>
<b>alle atypischen Fälle</b>	<b>116</b>	

Tab. 3: Fälle atypischer BSE weltweit (Stand: März 2017)

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Versuchstiere

Elf weibliche Holstein-Friesian Kälber (Tab. 4) wurden im Alter von sechs Monaten intrakranial mit 1 ml eines 10% (w/v) Hirnhomogenates inokuliert, welches von den zwei derzeit in Deutschland identifizierten atypischen BSE-Rindern stammte (Buschmann *et al.*, 2006). Davon wurden sechs Kälber mit L-Typ-BSE und fünf Kälber mit H-Typ-BSE infiziert. Die Tiere wurden 5-16 Monate nach der Inokulation euthanasiert. Nur ein L-Typ-BSE infiziertes Kalb, das mit fünf Monaten *post inoculationem* euthanasiert wurde, befand sich noch in der präklinischen Phase einer BSE-Erkrankung, während die anderen infizierten Kälber bereits milde bis schwere BSE-assoziierte klinische Symptome aufwiesen. Während der Sektion wurde eine Vielzahl von Organen unter TSE-sterilen Konditionen entnommen, wobei für jedes Gewebe ein neues Einweginstrumentarium verwendet wurde sowie eine spezifische Reihenfolge bei der Probenahme beachtet wurde. Die Details der intrakranialen atypischen BSE-Pathogenesestudie wurden bereits publiziert (Balkema-Buschmann *et al.*, 2011b).

Tier-ID	Sektionszeitpunkt (mpi)	auffällige klinische Symptome	Klinischer Status
<b>L-BSE</b>			
RA01	5	Keine	0
RA05	12	Keine	0
RA06	14	Geringgradige Erregbarkeit, beginnender Konditionsverlust	2
RA03	15	Konditionsverlust, Erregbarkeit	2
RA02	16	Konditionsverlust, Erregbarkeit	2
RA04	16	Konditionsverlust, Erregbarkeit	2
<b>H-BSE</b>			
RA10	12	Keine	0
RA13	14	Konditionsverlust, Überempfindlichkeit	2
RA14	15	Konditionsverlust, Überempfindlichkeit	2
RA15	16	Überempfindlichkeit, Konditionsverlust, Ataxie	2-3
RA16	16	Ängstlichkeit, Überempfindlichkeit, Konditionsverlust	2-3

**Tab. 4:** Übersicht über die Versuchstiere der tierexperimentellen Studie zur atypischen BSE bei Rindern (in Anlehnung an (Balkema-Buschmann *et al.*, 2011b))

### 3.1.2. Probenmaterial / Organproben

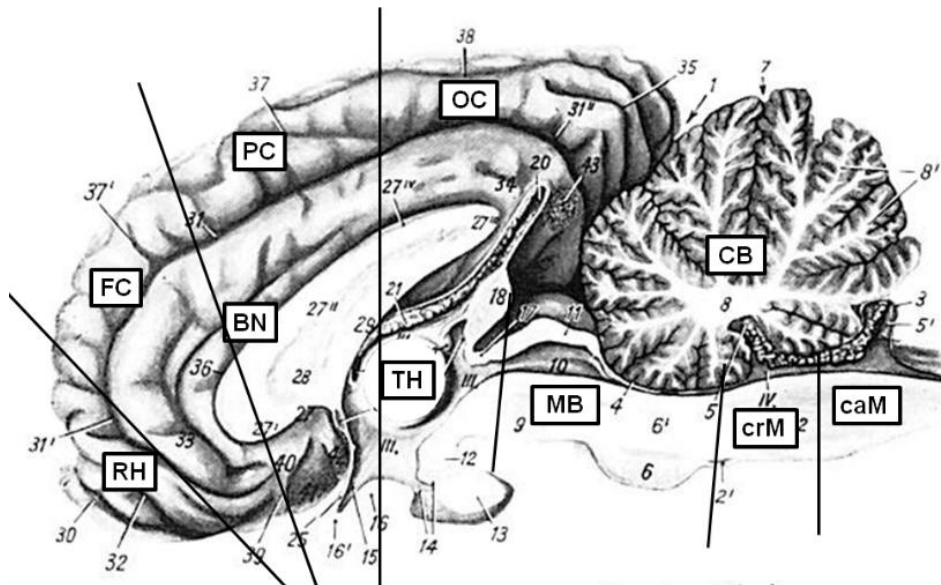
Eine Hälfte der entnommenen Organproben wurde für histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen in 4% Formalin fixiert, während die andere Hälfte für biochemische Untersuchungen bei -20°C bzw. -70°C eingefroren wurde. In dieser Studie wird die detaillierte Analyse von 50 ausgewählten Organproben pro Tier beschrieben, wobei die Auswahl der Proben die Organsysteme zentrales sowie peripheres Nervensystem, lymphoretikuläres System, Verdauungs-, Atmungs- und Reproduktionssystem sowie den Bewegungsapparat umfasst (Tab. 5).

Die entsprechenden Gewebeproben wurden analog zu der am Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger am Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems) bereits durchgeführten oralen Pathogenesestudie zur klassischen BSE (Hoffmann *et al.*, 2007; Balkema-Buschmann *et al.*, 2011a; Hoffmann *et al.*, 2011) ausgewählt, gelagert, partiell entnommen und analysiert.

Zentrales Nervensystem (ZNS) (n=5)	Peripheres Nervensystem (PNS) (n=13)	Lymphoretikularsystem (LRS) (n=9)	Verdauungs-, Atmungs-, & Reproduktionssystem (n=16)	Muskuloskelettsystem (n=7)
Obex	Gesichtsnerv ( <i>N. facialis</i> )	Milz	Rektum (+GALT)	Knochenmark
Thorakales Rückenmarksegment T7	Sehnerv ( <i>N. opticus</i> )	Ileale Peyersche Platten	Euter	Oberarmmuskel ( <i>Musc. biceps brachii</i> )
Lumbales Rückenmarksegment L3	Ganglion coeliacum	Jejunale Peyersche Platten	Nebenniere	<i>Musc. semitendinosus</i>
Dorsales Wurzelganglion (DRG)	kaudales mesenteriales Ganglion	Retropharyngeal-lymphknoten	Unterkiefer-speicheldrüse	<i>Musc. psoas major</i>
Trigeminalganglion (TRG)	Tibialnerv ( <i>N. tibialis</i> )	Euterlymphknoten	Bauchspeicheldrüse (Pankreas)	Lange Rückenmuskulatur ( <i>Musc. longissimus dorsi</i> )
	Saphenanerv ( <i>N. saphenus</i> )	Mediastinal-Lymphknoten	Speiseröhre (Oesophagus)	Zungenmuskulatur
	Radialnerv ( <i>N. radialis</i> )	Jejunale Mesenterial-Lymphknoten	Pansen (Rumen)	Herz

**Tab. 5:** Übersicht über die untersuchten Organproben pro Tier aus unterschiedlichen Organsystemen

Für die Untersuchung der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im Gehirn BSE-infizierter Rinder wurden folgende zehn Gehirnregionen separiert: kraniale Medulla, kaudale Medulla, Mittelhirn inklusive Pons, Kleinhirn, Thalamus, Basalkerne, Rhinencephalon, Frontalcortex, Parietalcortex sowie Okzipitalcortex (Abb. 2).



**Abb. 2:** Zehn untersuchte Gehirnregionen modifiziert nach Nickel, Schummer, Seiferle; 4. Auflage, Band IV, S. 68 (2004): Rhinencephalon (RH), Frontalcortex (FC), Parietalcortex (PC), Okzipitalcortex (OC), Basalkerne (BN), Thalamus (TH), Mittelhirn inklusive Pons (MB), kraniale Medulla (crM), kaudale Medulla (caM) sowie Kleinhirn (CB); doi:10.1371/journal.pone.0067599.g001 (Priemer *et al.*, 2013)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.1.1. Herstellung von Hirnhomogenaten

Die abgewogene Probenmenge zur Herstellung von Hirnhomogenaten richtete sich nach der darauffolgenden Untersuchungsmethode. Für die Western Blot-Untersuchungen wurden 10%ige Hirnhomogenate benötigt. Hierfür wurde 100 mg Gehirnprobenmaterial aus der jeweiligen Gehirnregion entnommen, in ein mit Keramikkügelchen bestücktes Ribolyser-Röhrchen abgewogen und mit dem neunfachen Volumen (w/v) an Sucrose-DOC-NP40-Lysispuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mit einem Ribolyser (TeSeE Precess48, Bio-Rad, München) in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen für je 45 sec bei 6.500 Umdrehungen

pro Minute (U/min) mit 5 sec Verzögerung zwischen beiden Zyklen. Das Homogenat wurde abschließend für 5 min bei 13.500 U/min zentrifugiert und der Überstand entweder direkt für die Phosphorwolframfällung (PTA-Fällung) verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Für den Enzymimmunoassay wurde 300 mg ( $\pm$  50 mg) Gehirnmateriale in ein kommerzielles, mit Lysispuffer und Keramikkügelchen bestücktes Ribolyser-Röhrchen der Fa. IDEXX eingewogen. Die Homogenisierung im Ribolyser erfolgte ebenfalls in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen für je 45 sec bei 6.500 U/min mit 5 sec Verzögerung zwischen beiden Zyklen.

### **3.2.1.2. Enzymimmunoassay (EIA)**

Zur Untersuchung auf das Vorhandensein von pathologischem Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>) im zu untersuchenden Probenmaterial wurde der kommerzielle Enzymimmunoassay IDEXX HerdChek® BSE EIA verwendet, welcher eines der zugelassenen diagnostischen BSE-Schnelltestsyste me darstellt. Dieses Testsystem basiert auf einem spezifischen, auf einer Mikrotiterplatte immobilisierten Seprion-Liganden (chemisches Polymer), um spezifisch PrP<sup>Sc</sup> zu binden. Die Durchführung des ELISA erfolgte gemäß Herstellerangaben nach dem Kurzprotokoll im Doppelansatz für jede Probe. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei einer Raumtemperatur zwischen 18-26°C. 120 µl des jeweiligen Hirnhomogenates einer Gehirnregion wurden auf einer 96er Mikrotiterplatte mit 30 µl Probenverdünner versetzt. Von der verdünnten Probe wurden 100 µl in die Vertiefung der beschichteten Antigenbindungsplatte pipettiert und die Mikrotiterplatte abgedeckt 45-60 min langsam schüttelnd bei 200 U/min inkubiert. Es folgten sechs Waschgänge mit 350 µl von Waschlösung 1. Nach Zugabe von 100 µl Konditionierungspuffer in jede Vertiefung wurde die abgedeckte Mikrotiterplatte für 10 min inkubiert und danach dreimal mit 350 µl von Waschlösung 2 gewaschen. Als nächstes wurden jeder Vertiefung 100 µl CC-Konjugat zur Untersuchung von bovinem Gehirngewebe zugesetzt und für 45-50 min inkubiert, gefolgt von fünfmaligem Waschen mit 350 µl von Waschlösung 2. Nach Zugabe von 100 µl Substrat wurde die abgedeckte Mikrotiterplatte für 15 min abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 100 µl 0,5 M Salzsäurelösung je Vertiefung abgestoppt. Die optische Dichte (OD-Werte) wurde photometrisch mithilfe eines TECAN Sunrise™ ELISA-Readers gemessen (Wellenlänge  $\lambda=450$  nm) und mit der Software Magellan™ ausgewertet.

### 3.2.1.3. Fällung mit Phosphorwolframsäure (PTA-Fällung)

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure (PTA) dient der spezifischen Anreicherung von pathologischem Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>) (Wadsworth *et al.*, 2001). PTA bildet mit PrP<sup>Sc</sup> bei neutralem pH-Wert spezifische Aggregate, jedoch nicht mit dem physiologischen PrP<sup>C</sup>. Nach Zentrifugation eines mit PTA versetzten Hirnhomogenates entsteht somit ein mit PrP<sup>Sc</sup> angereichertes Pellet. Für das Kurzprotokoll der modifizierten PTA-Fällung wurden 100 µl eines 10%igen Hirnhomogenates mit 5 µl Proteinase K (PK-Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt und eine Stunde bei 55°C in einem Thermoblockschüttler inkubiert. Der PK-Verdau wurde durch Zugabe von 2 µl Pefabloc® (Endkonzentration 2 mM) abgestoppt und die Proben für 5 min bei 95°C schüttelnd denaturiert. Diesem Gemisch wurden 100 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) versetzt mit 4% Sarkosyl und 16 µl PTA der Stammlösung zugegeben (Endkonzentration 0,3% PTA) und danach eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13.300 Umdrehungen pro Minute und vorsichtiges Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette verbleibt das mit PrP<sup>Sc</sup>-angereicherte Pellet. Das Pellet wurde schlussendlich in 20 µl Probenpuffer aufgenommen.

### 3.2.1.4. Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte in einem Mini-Protean II System der Firma Bio-Rad. Es wurden 12,5%ige Polyacrylamid-Minigele mit einer Dicke von 0,75 mm verwendet. Die Proben wurden kurz vor dem Auftragen auf das Gel bei 95°C für 5 min denaturiert. Je Probe wurden 15 µl aufgetragen. Als Marker diente der Precision Plus Protein™ Standards Dual Colour der Fa. Bio-Rad, welcher zur Bestimmung der Molekularmasse der Proteinbanden einmal auf jedes Gel aufgetragen wurde. Auf jedes zweite Gel wurde zusätzlich eine bekannte Positivkontrolle eines BSE-infizierten Rindes mitgeführt. Die Proteine wurden bei 100 Volt im Taschengel und bei 200 Volt im Trenngel aufgetrennt.

### 3.2.1.5. Western Blot (PTA-WB)

Nach erfolgter PTA-Fällung und SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit einem Western Blot (WB) in einer SemiDry-Blotting-Apparatur auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zuerst für 5 min in Methanol gelegt und anschließend für weitere 5 min mit 6 Lagen Whatman-

Chromatographiepapier und dem Minigel in Blottingpuffer verbracht. Zum Transfer der Proteinbanden vom Minigel auf die PVDF-Membran erfolgte die Bestückung der SemiDry-Kammer geschichtet: 3 Lagen Whatmanpapier, darauf die PVDF-Membran sowie das Minigel und gefolgt von weiteren 3 Lagen Whatmanpapier. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 0,3 Ampère und einer Spannung von 15 Volt je Minigel auf die PVDF-Membran über 45 min übertragen. Die PVDF-Membran wurde hiernach zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde in 10 ml 5%ige Magermilch bei Raumtemperatur verbracht. Zur Detektion des pathologischen Prion-Proteins wurde als Primärantikörper 4 µg/ml des monoklonalen Antikörpers L42 (r-biopharm, Darmstadt, Deutschland) (Harmeyer *et al.*, 1998; Kaatz *et al.*, 2012) in 5%iger Magermilch verdünnt (1:2.000) und die Membran 90 min darin inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 10 min mit PBS-Tween. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper, Ziege-anti-Maus-Alkalische Phosphatase in einer Verdünnung von 1:2.000 inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS-Tween wurde die Membran für zweimal 2 min in Assaypuffer inkubiert. Nach Entwicklung der Membranen für 5 min mit 1,5 ml CDP-Star erfolgte das zweiminütige Einscannen der Membran am VersaDoc™ Imaging System (Bio-Rad, München) zur Analyse und Quantifizierung der Ergebnisse. Somit konnten Molekularmasse, Signalstärke und Glykosylierungsmuster (Glykopprofil) der pathologischen Prion-Proteine ermittelt werden. Für die Quantifizierung der WB-Signale nach PTA-Fällung und SDS-PAGE wurde das Protokoll von GRETZSCHEL (2007) zur Quantifizierung von WB-Signalen im Gehirn Scrapie-infizierter Schafe für die Untersuchung von BSE-infizierten Rindergehirnen modifiziert und angepasst, da die Signalintensität im linearen Bereich des VersaDoc™ Imaging System entsprechend Herstellerangaben liegen muss. Hierzu wurden vorab für jede Probe eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Signalstärken zu ermitteln, gefolgt von vier weiteren Gelläufen mit angepassten Probenmengen, die dann für die Quantifizierungsanalyse verwendet werden konnten. Molekularmasse, relative Quantität und Volumen (Signalstärke) von jeder der drei typischen PrP-Banden wurden mittels QuantityOne® Software (Bio-Rad, München) bestimmt. Für die Untersuchung des Glykoprofils wurden die Signalstärken jeder der drei PrP-Banden berechnet und als Prozentsatz der gesamten Signalintensität für jede Gehirnregion und BSE-Form individuell ermittelt. Für die Quantifizierung der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in

unterschiedlichen Gehirnregionen wurde die kraniale *Medulla oblongata* (annähernd entsprechend der Obexregion) als Referenzwert mit 100% und die anderen Gehirnregionen in Relation hierzu gesetzt. Es folgte die Bestimmung der Mittelwerte für jede Probe.

Die statistische Analyse (t-Test, Wilcoxon-Test) wurde für die ermittelten Western Blot-Daten des Glykoprofils und der Molekularmasse durchgeführt.

### **3.2.1.6. PK-Stabilität: Empfindlichkeit des PrP<sup>Sc</sup> gegenüber dem enzymatischen Abbau mit Proteinase K**

In einem ersten Schritt wurden Homogenate unterschiedlicher Gehirnregionen auf ihre PK-Empfindlichkeit untersucht und kein Unterschied hinsichtlich der PK-Empfindlichkeit innerhalb eines BSE-Typs festgestellt. Für die systematische Analyse der PK-Stabilität wurden verschiedene Gehirnregionen mit der stärksten PrP<sup>Sc</sup>-Intensität der jeweiligen BSE-Form (C-, H- bzw. L-BSE) gepoolt. Die PK-Stabilität wurde dann in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen untersucht: 1. Einsatz verschiedener PK-Konzentrationen von 0, 25, 50, 250 und 1000 µg/ml bei einer Inkubationszeit von 60 min bei 55°C. Das nach dem PK-Verdau verbleibende Restsignal, gemessen nach der Inkubation mit einer End-PK-Konzentration von 50 µg/ml, wie sie auch im Standardprotokoll Anwendung findet, wurde als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt. 2. Änderung der Inkubationszeiten von 1, 3, 6, 10 und 26 Stunden des PK-Verdau mit der Standard-Endkonzentration von 50 µg/ml PK. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde das Restsignal nach einstündigem PK-Verdau entsprechend des Standardprotokolls als Referenzwert mit 100% definiert. Für jede BSE-Form wurden die Testreihen jeweils im Doppelansatz durchgeführt und die Gelelektrophorese anschließend dreimal wiederholt. Aus den Werten wurden jeweils die Mittelwerte ermittelt und die erhaltenen Signalintensitäten berechnet.

### **3.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungsmethoden**

Schwammartige Veränderungen wurden durch histopathologische Untersuchungen an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten (Romeis, 1989) dargestellt. Gewebeschnitte wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht (Methodik analog zu (Hardt *et al.*, 2000) bzw. (Kaatz *et al.*, 2012)). Verwendet wurde eine serielle Schnitttechnik mit zwei bis fünf Ebenen je Paraffinblock und einer Schnittentfernung von ungefähr 24 µm zwischen jeder Ebene, um eine Gewebstiefe von zirka 150 bis 200 µm zu erreichen. Zwei Prion-Protein-spezifische monoklonale Antikörper (mAk)

wurden in einen Antikörper-Cocktail gemischt zur immunohistochemischen Markierung: mAk 6C2 (*Wageningen Bioveterinary Research (WBVR)*, NL) und mAk F99/97.6.1 (*VMRD, Inc.*; Pullman, WA, USA). Die Vorbehandlung für diesen Ak-Cocktail umfasst eine 30 minütige Inkubation in 98-100% Ameisensäure, Inhibition der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fa. Merck) in Methanol für 30 min, gefolgt von einem 20 minütigen Autoklaviervorgang bei 121°C in Zitratpuffer. Die primären, monoklonalen Antikörper wurden in einer Verdünnung von 0,72 µg/ml für mAk 6C2 bzw. 0,2 µg/ml für mAk F99/97.6.1 in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) mit 10% Ziegen Serum und 0,03% Natriumazid eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Negative Kontrollschnitte wurden mit einer Lösung aus 10% Ziegen Serum in TBS mit 0,03% Natriumazid inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde EnVision™ Reagenz (Meerrettichperoxidase-markiertes Polymer, konjugiert mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper, Fa. Dako) verwendet, welches für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zuletzt wurden die Schnitte mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB; Fa. Fluka) für 10 min entwickelt. Die Gegenfärbung erfolgte für 15 min mit Mayers Hämatoxylin. Alle Schnitte wurden mittels Lichtmikroskopie beurteilt.

## 4. ERGEBNISSE

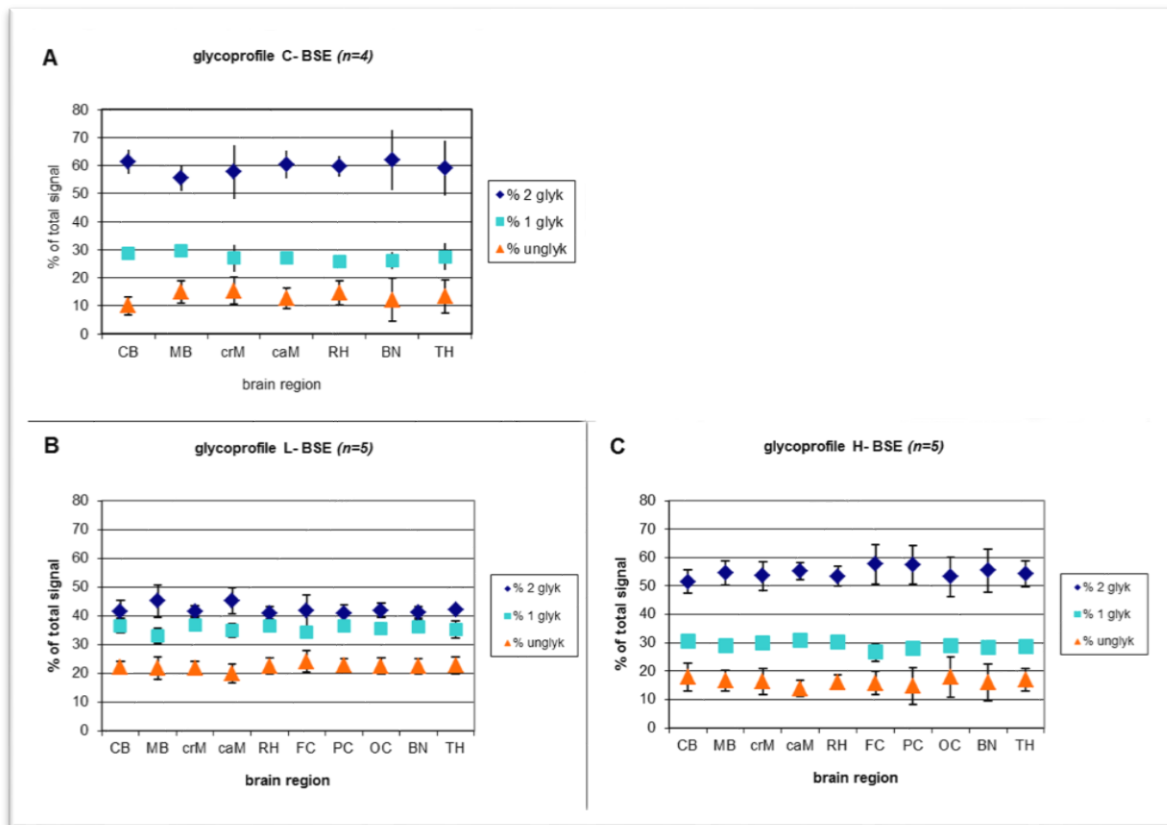
### 4.1. Untersuchungen zu BSE-Erregereigenschaften

#### 4.1.1. Proteinbiochemische Untersuchung zur BSE-Differenzierung

##### 4.1.1.1. Glykosylierungsmuster (Glykopprofil)

Die Untersuchungen des Glykoprofils (Abb. 3), d.h. der durchschnittlichen prozentualen Anteile der di-, mono- und unglykosylierten Banden am Gesamtsignal im PTA-WB-Verfahren, ergaben für klassische BSE (C-BSE) ein Verhältnis von 60:27:13, für L-BSE 42:36:22 und für H-BSE 55:29:16. Die mittleren Werte der molekularen Masse der unglykosylierten Fraktion des PrP<sup>Sc</sup> aller untersuchten Proben betragen für C-BSE  $17,61 \pm 0,25$  kDa, für L-BSE  $17,59 \pm 0,10$  kDa und für H-BSE  $18,69 \pm 0,16$  kDa. Die Untersuchung des Glykoprofils und der molekularen Masse der Prion-Protein-Fractionen von C-, L- und H-BSE ergaben keine Differenzen zwischen den ermittelten Werten für die unterschiedlichen Gehirnregionen innerhalb einer BSE-Form. Diese Entdeckung wurde durch statistische Analyse mittels t-Test und Wilcoxon-Test bestätigt.

Außerdem wiesen die Gehirnproben jedes inokulierten Rindes das Bandenmuster entsprechend der ihm jeweils inokulierten BSE-Form auf, das bedeutet, dass keine *in vivo* Umwandlung der BSE-Form während der Subpassage im Rind stattfand.



**Abb. 3:** Glykoproteine von C-, L- und H-BSE

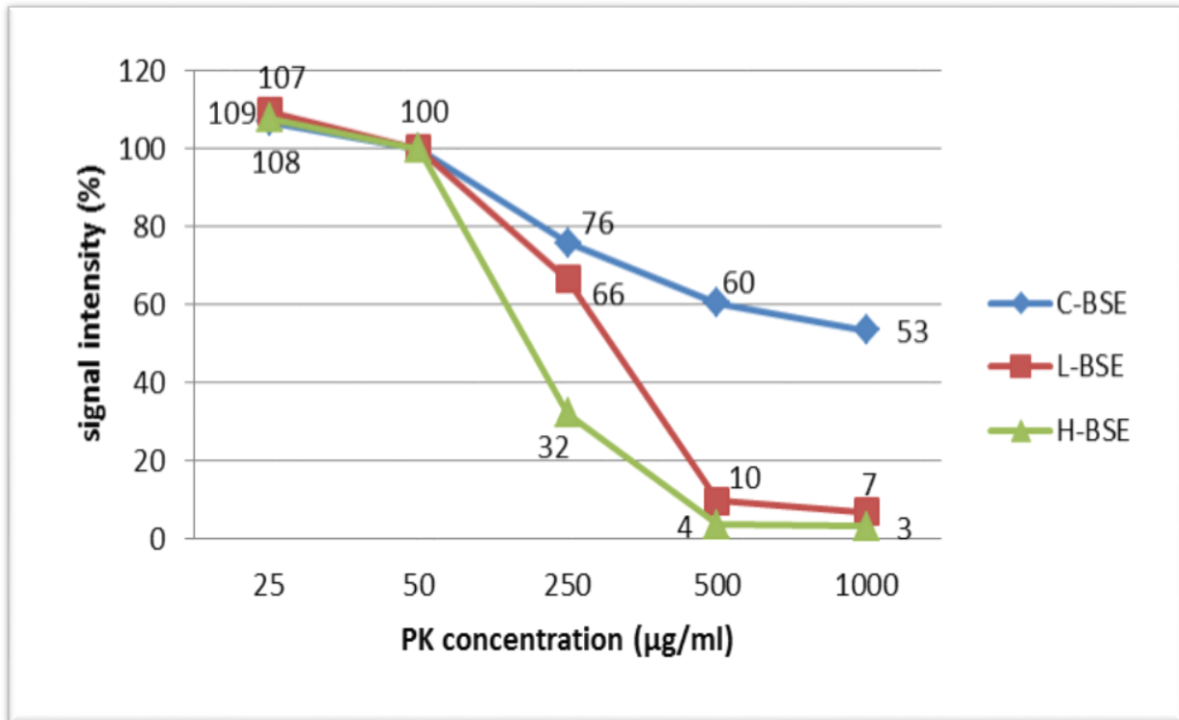
Die relative Quantität der drei PrP<sup>Sc</sup>-Banden zur Ermittlung der Glykosylierungsmuster (prozentuale Anteile der di-, mono- und unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Fraktionen) wurde nach Hintergrundkorrektur mittels QuantityOne® Software (Bio-Rad, München) ermittelt. Alle Werte wurden als Mittelwerte plus Standardabweichung von vier SDS-PAGE-Läufen berechnet. Aufgrund des bei C-BSE in den drei Cortexregionen fehlenden Nachweises des typischen TSE-assoziierten PrP<sup>Sc</sup>-Triplet-Bandenmuster nach PK-Verdau konnten diese Hirnregionen nicht bewertet werden. (A) Glykoprotein von C-BSE, (B) Glykoprotein von L-BSE und (C) Glykoprotein von H-BSE; CB = Kleinhirn, MB = Mittelhirn inkl. Pons, crM = kraniale Medulla oblongata, caM = kaudale Medulla oblongata, RH = Rhinencephalon (Riechhirn), FC = Frontalcortex, PC = Parietalcortex, OC = Okzipitalcortex, BN = Basalkerne, TH = Thalamus; doi:10.1371/journal.pone.0067599.g005 (Priemer *et al.*, 2013)

#### 4.1.1.2. Proteinase K (PK)-Stabilität

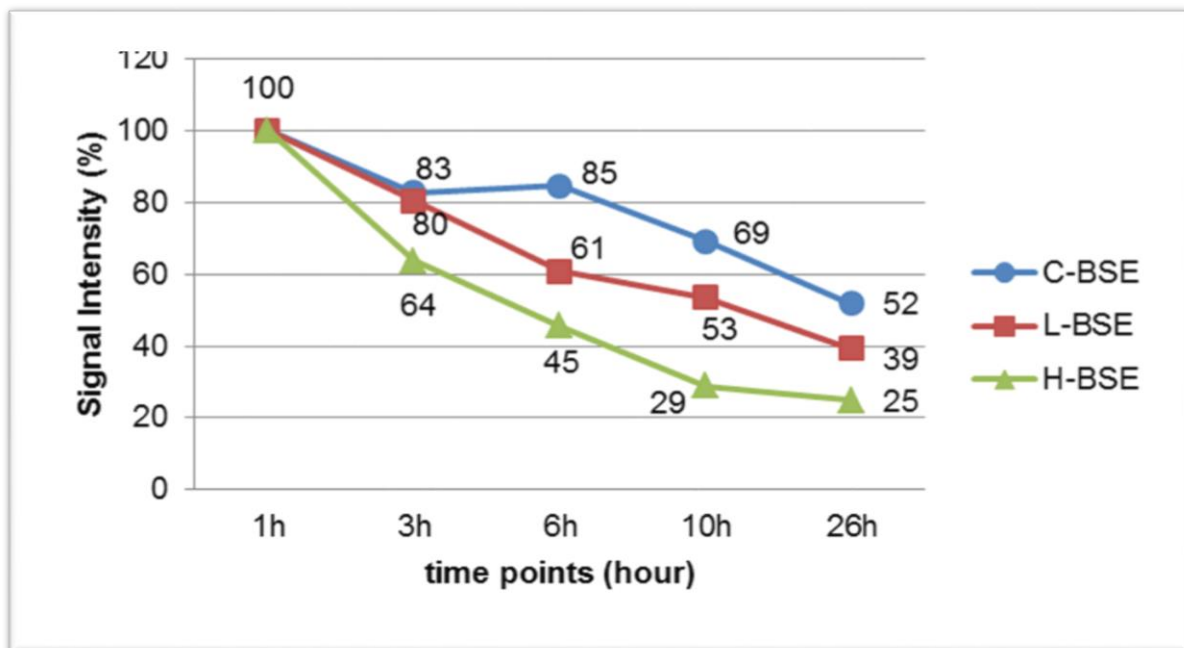
Mit der Untersuchung der PK-Stabilität der drei bekannten BSE-Formen mithilfe von unterschiedlichen PK-Konzentrationen (Abb. 4) sowie PK-Langzeitverdau (Abb. 5) konnten deutliche Unterschiede im Grad der PrP-Hydrolyse zwischen den BSE-Formen dargestellt werden. Alle drei BSE-Formen zeigten nur minimale Unterschiede in der Quantität des Restsignals zwischen den PK-Konzentrationen von 25 µg/ml und 50 µg/ml PK-Endkonzentration. Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei einer PK-Endkonzentration von 250 µg/ml und darüber. Mit einer fünffach höheren PK-Konzentration als im Standardprotokoll (d.h. 250 µg/ml) wurde eine

Reduktion der Signalstärke von bis zu 25% für C-BSE und bis zu 30% für L-BSE, und mehr als 66% für H-BSE festgestellt. Die 20fach höhere PK-Endkonzentration als im Standardprotokoll (d.h. 1000 µg/ml) ergab für C-BSE eine Signalreduktion von ungefähr 50%, während die Signale beider atypischer BSE-Formen um 93-97% vermindert waren. Dies entsprach lediglich 3-7% der mit einer PK-Endkonzentration von 50 µg/ml (Standard) erhaltenen Signalstärken. Somit zeigte sich für klassische BSE nur ein langsamer enzymatischer Abbau des pathologischen Prion-Proteins bei allen fünf angewendeten PK-Endkonzentrationen, wobei nie mehr als 50% der Signalstärke selbst bei sehr hohen PK-Endkonzentrationen von bis zu 1000 µg/ml reduziert wurde. Dahingegen wurde das pathologische Prion-Protein beider atypischer BSE-Formen nahezu vollständig unter extremen PK-Konzentrationen abgebaut.

Nach Langzeit-PK-Verdau (Abb. 5) mit gleichbleibender PK-Endkonzentration von 50 mg/ml gemäß Standardprotokoll konnte der Unterschied in der PrP-Hydrolyse zwischen beiden atypischen BSE-Formen L- und H-BSE verdeutlicht werden. Nach dreistündigem PK-Verdau wurden die Signalstärken von C-BSE und L-BSE um ungefähr 20% vermindert, wohingegen H-BSE bereits zu bis zu 35% abgebaut wurde. Nach sechsstündigem PK-Verdau war das Signal für C-BSE immer noch nur um gut 20% reduziert, während das mit beiden atypischen BSE-Formen assoziierte PrP<sup>Sc</sup> weiterhin einem deutlichen Proteinabbau unterlag: L-BSE bei um ca. 40%, H-BSE sogar bis zu 55% der Standard-Signalstärken. Inkubationszeiten von 26 Stunden PK-Verdau führten zu einer Signalreduktion von bis nahezu 50% bei C-BSE und 60% für L-BSE. Die Signalstärken von H-BSE reduzierten sich sogar um über 70%.



**Abb. 4:** PK Stabilität der drei BSE-Formen bei unterschiedlichen PK-Konzentrationen

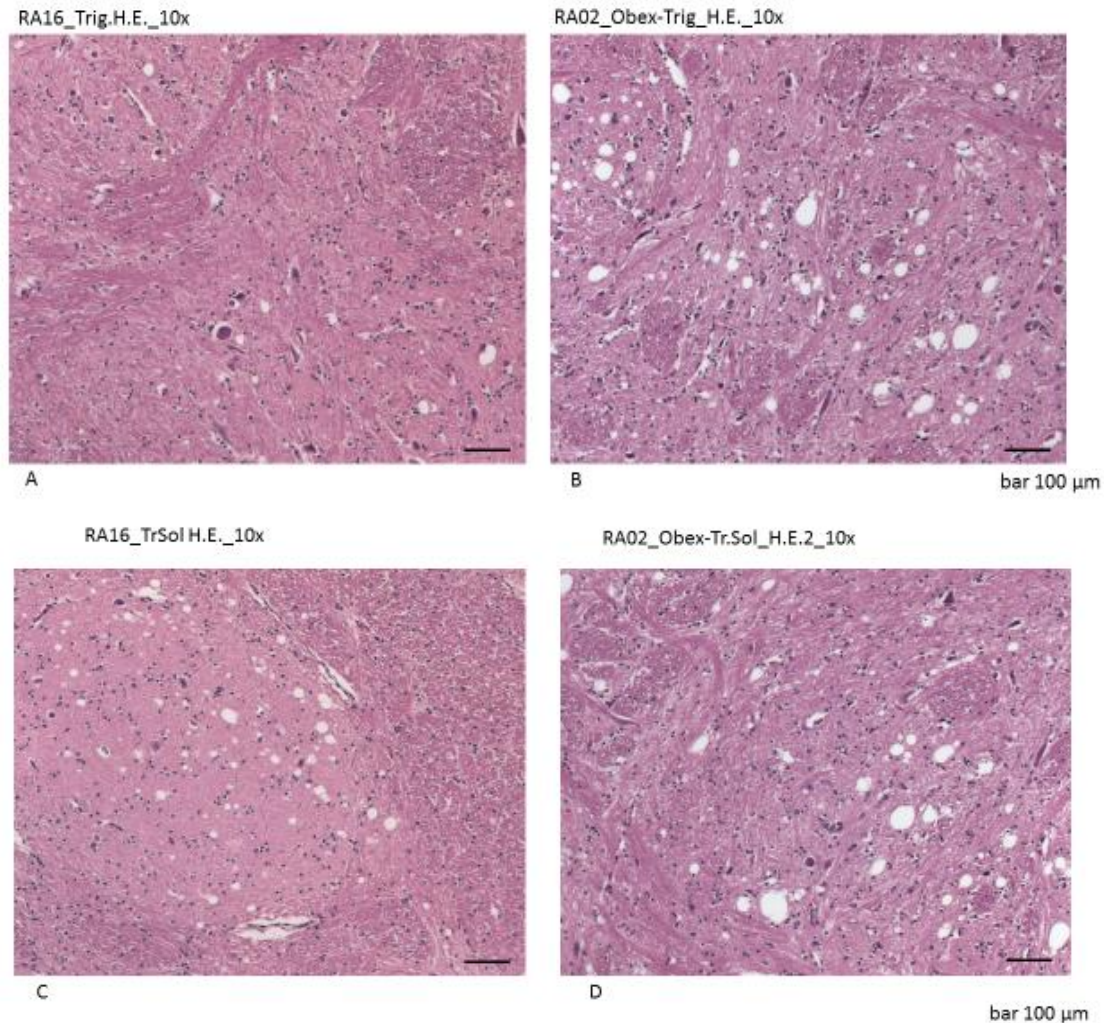


**Abb. 5:** PK-Stabilität: Empfindlichkeit gegenüber Langzeit-PK-Verdau

Die PK-Stabilität wurde mithilfe des PTA-WB bestimmt. (A) Einfluss verschiedener PK-Endkonzentrationen: 0, 25, 50, 250, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Die Intensität der Western Blot-Signale wurde ermittelt, wobei 50  $\mu\text{g/ml}$  als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt wurde. Der PK-Verdau wurde gemäß Standardprotokoll für 60 min bei 55°C durchgeführt. (B) Langzeit-PK-Verdau: Abbau des PrP<sup>Sc</sup> in Abhängigkeit der Länge des PK-Verdaus zwischen 1 und 26 Stunden bei gleichbleibender PK-Endkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Die Signalstärken wurden gemessen und die nach 60 min (1 h) gemessene Signalintensität (Standardprotokoll) als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt. doi:10.1371/journal.pone.0067599.g006 (Priemer *et al.*, 2013)

#### **4.1.2. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur BSE-Differenzierung**

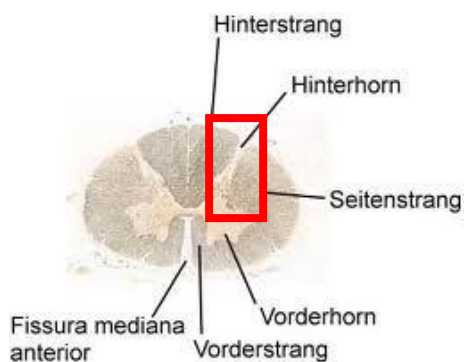
Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Obexregionen sowie die Proben des peripheren Nervensystems herangezogen. Dadurch konnten insbesondere in der Obexregion spezifische Unterschiede in der Qualität sowie der Quantität von schwammartigen Veränderungen zwischen beiden atypischen BSE-Formen im Verlauf der BSE-Erkrankung festgestellt werden, mit stärkster Ausprägung im Endstadium. An L-BSE erkrankte Rinder wiesen dabei meistens in der Anzahl vermehrt und auch größere, teils konfluierende spongiforme Veränderungen auf, vor allem im Solitär- sowie im Trigeminotrakt und nur zu einem geringeren Ausmaß im DMNV der Obexregion (Abb. 6). Im Gegensatz dazu wiesen H-BSE-erkrankte Rinder generell weniger und auch kleinere Vakuolisierungen auf. Gelegentlich traten in Neuronen in Ganglien mehrere, teilweise sogar gekammerte Vakuolen auf (dorsales Wurzelganglion, Trigemininalganglion), obwohl sich alle Tiere in einem fortgeschrittenen Stadium einer BSE-Erkrankung befanden.



**Abb. 6:** Histopathologische Läsionen in den Kerngebieten der Obexregion, insbesondere in den Kernen des Trigeminaltraktes (A, B) sowie des Solitärtraktes (C, D); stärkere schwammartige Veränderungen wurden bei L-BSE festgestellt (B, D), nur wenige vakuoläre Degenerationen bei H-BSE (A, C), H.-E.-Färbung (Balkenlänge 100 µm).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Proben des ZNS und PNS wurden ebenfalls Unterschiede im PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster zwischen den beiden atypischen BSE-Formen offensichtlich. Während bei den an H-BSE erkrankten Rindern meistens ein gliales, grobgranuläres PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster in der Obexregion, insbesondere in den Kerngebieten des Solitärtraktes, Trigeminaltraktes und dem DMNV sowie im Rückenmark auffiel, zeigten L-BSE-erkrankte Rinder überwiegend ein intraneuronales PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster, mit wenigen individuellen Abweichungen. Entsprechende Befunde ließen sich auch für die thorakalen (T7) und lumbalen Rückenmarksproben (L3) erheben. Großflächige, weitgestreute immunhistochemische PrP<sup>Sc</sup>-Markierung zeigte sich durchweg im Dorsal- und Ventralhorn der grauen Substanz des Rückenmarks an beiden untersuchten Rückenmarkssegmenten T7 und L3, so wie es bereits für C-BSE beschrieben wurde. Ein interessantes Phänomen wurde bei an

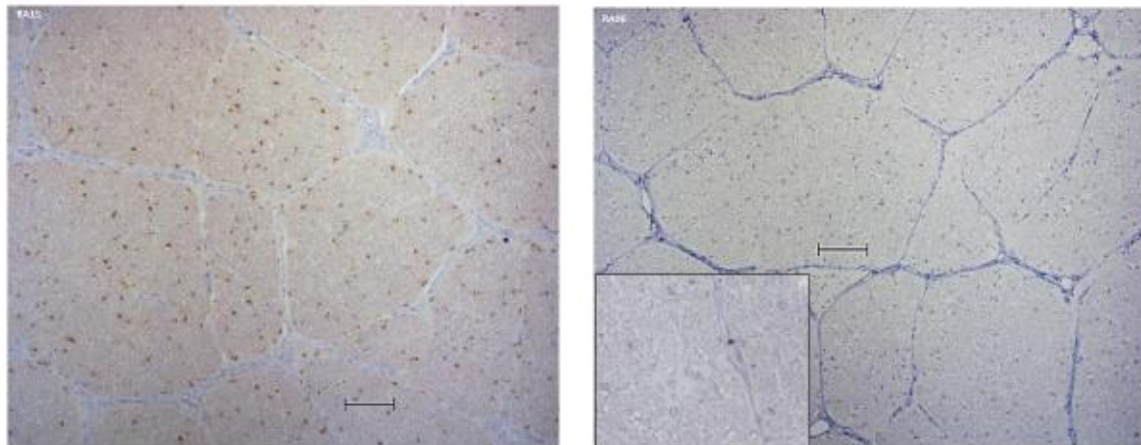
H-Typ-BSE erkrankten Rindern beobachtet: Dort wies die dorsale Region der weißen Substanz des Rückenmarks, welche überwiegend aus afferenten Nervenfasern besteht, die die Information aus der Peripherie zum Gehirn leiten, auffällig weniger PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen auf als die ventralen und in geringerem Maße die lateralen Regionen, welche mittels efferenter Fasern die Informationen aus dem ZNS in die Peripherie leiten (Abb. 7). Im Sehnerv zeigte sich wiederum ein deutliches gliales PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster, mit ausgeprägten PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen bei H-BSE- und nur schwachen PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen bei L-BSE-erkrankten Rindern (Abb. 8).



**Abb. 7:** Ausschnitt aus einem Rückenmarkssegment (L3) eines mit H-BSE-infizierten und erkrankten Rindes mit ausgeprägten glialen PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in der weißen Substanz lateroventral und geringgradigen bis fehlenden PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in der dorsalen Region der weißen Substanz (DH = Dorsalhorn der grauen Substanz) (Balkenlänge 200 µm); Abbildung oben links Rückenmarksegment modifiziert nach Tobias Schwarz

(<http://www.tobias-schwarz.net/medizin/spezielle/zns.htm>)





A

B

**Abb. 8:** Sehnerven von (A) H- und (B) L-BSE-infizierten Rindern immunhistochemisch markiert mit mAk-Cocktail aus 6C2 und F99/97.6.1 zeigt für H-BSE ein ausgeprägtes gliales PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster im Gegensatz zu nur geringgradigen bis fehlenden PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im Sehnerv bei L-BSE (Balkenlänge 50 µm).

## 4.2. Verteilung von pathologischem Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>) in mit BSE-infizierten Rindern

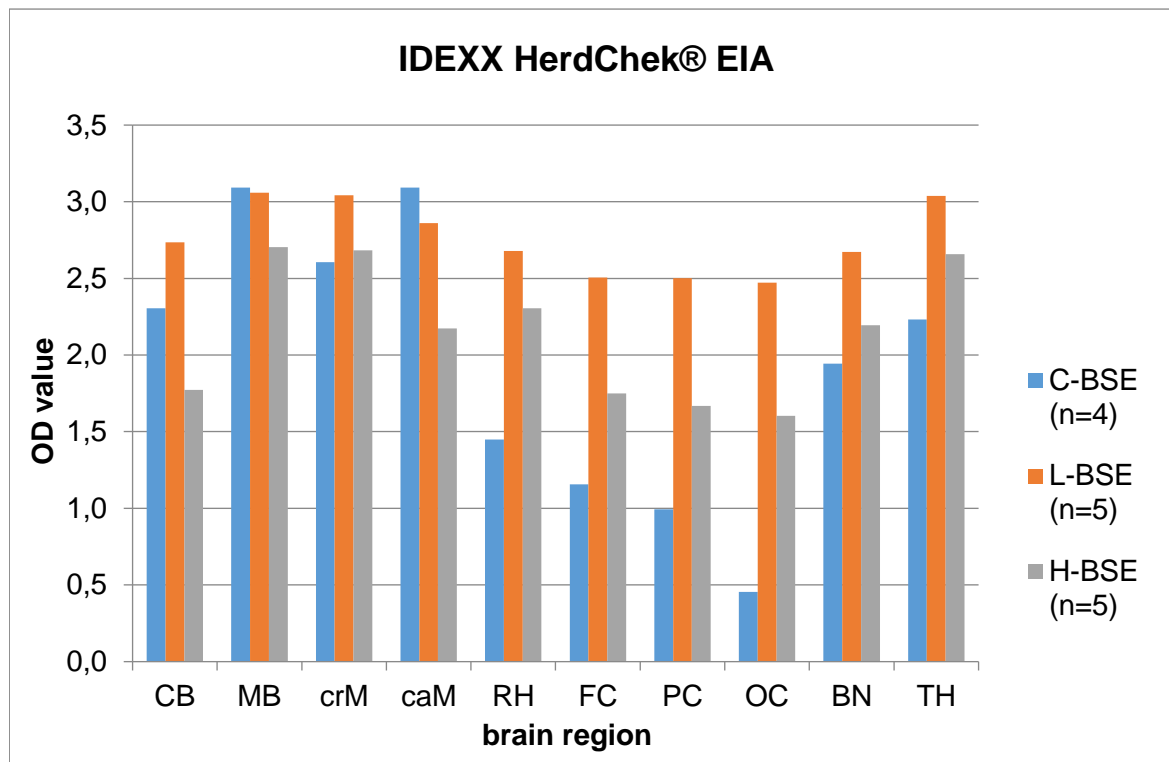
### 4.2.1. Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn BSE-infizierter Rinder

#### 4.2.1.1. Proteinbiochemische Untersuchungen

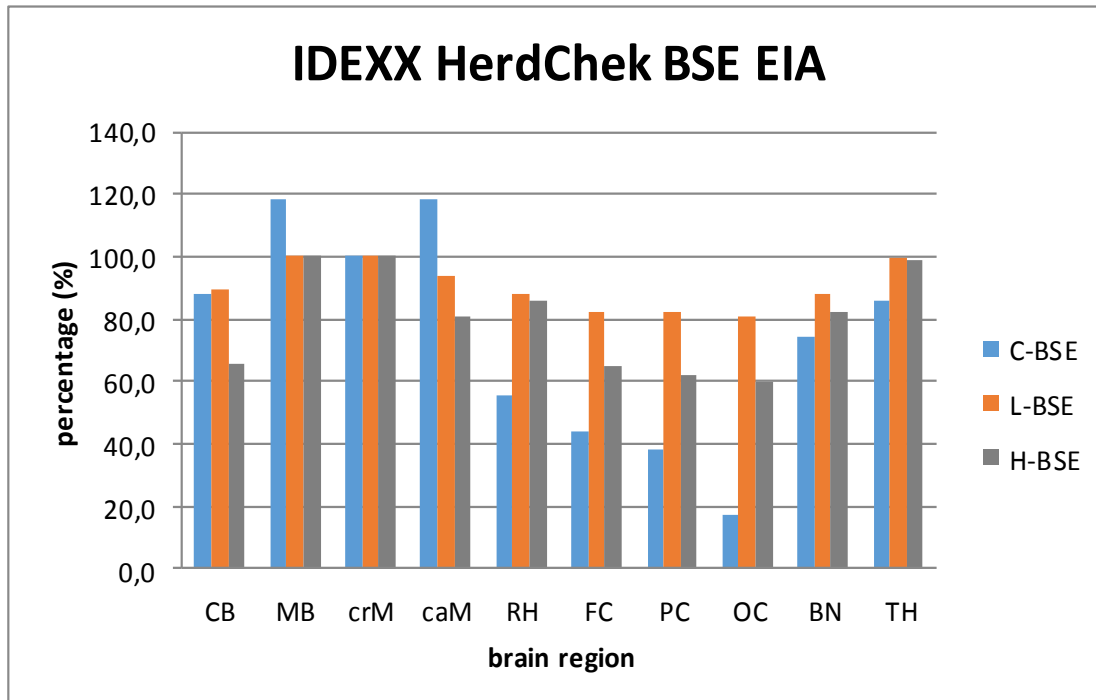
##### 4.2.1.1.1. Enzymimmunoassay (EIA)

Zur detaillierten Analyse der anatomischen Verteilung von pathologischem Prion-Protein beider atypischer BSE-Formen im Vergleich zu C-BSE wurden zehn Gehirnregionen mithilfe des diagnostischen Schnelltestsystems IDEXX HerdChek® BSE EIA untersucht (Abb. 9). Mit L-BSE inokulierte Rinder ( $n=5$ ) wiesen die höchsten OD-Werte in Mittelhirn, kranialer Medulla und Thalamus auf. Die für diese Gehirnregionen ermittelten OD-Werte lagen zwischen 2,47 und 3,05, was annähernd an der oberen Nachweisgrenze dieses Testsystems rangierte und damit außerhalb des linearen Bereichs lag. In den Hirnproben von mit H-BSE inokulierten Rindern ( $n=5$ ) konnten ebenfalls für Mittelhirn, kraniale Medulla und Thalamus die höchsten OD-Werte festgestellt werden. Wie in L-BSE-infizierten Rindern waren die OD-Werte relativ ausgeglichen, jedoch insgesamt mit OD-Werten zwischen 1,60 und 2,68 niedriger als die für L-BSE ermittelten OD-Werte. Im Gegensatz zu den atypischen BSE-Formen stellte sich für mit C-BSE infizierte Rinder ein deutlich abweichendes PrP<sup>Sc</sup>-Verteilungsmuster in den zehn untersuchten Gehirnregionen dar. Für beide

Medullaregionen und im Mittelhirn konnten OD-Werte zwischen 2,61 und 3,09 ermittelt werden, im Gegensatz zu den drei Cortexregionen mit OD-Werten zwischen 0,46 und 1,16. Die Signalstärken der einzelnen Gehirnregionen aller drei BSE-Formen in Verhältnis gesetzt zur kranialen Medulla (als Referenzregion mit 100% gleichgesetzt) finden sich in Abb. 10.



**Abb. 9:** Untersuchung der verschiedenen Hirnregionen mittels BSE-Schnelltest (IDEXX), Mittelwerte der OD-Werte aus zehn Gehirnregion der drei BSE-Formen, C-BSE  $n=4$ , L-BSE  $n=5$ , H-BSE  $n=5$ ; CB = Kleinhirn, MB = Mittelhirn inkl. Pons, crM = kraniale Medulla oblongata, caM = kaudale Medulla oblongata, RH = Rhinencephalon (Riechhirn), FC = Frontalcortex, PC = Parietalcortex, OC = Okzipitalcortex, BN = Basalkerne, TH = Thalamus

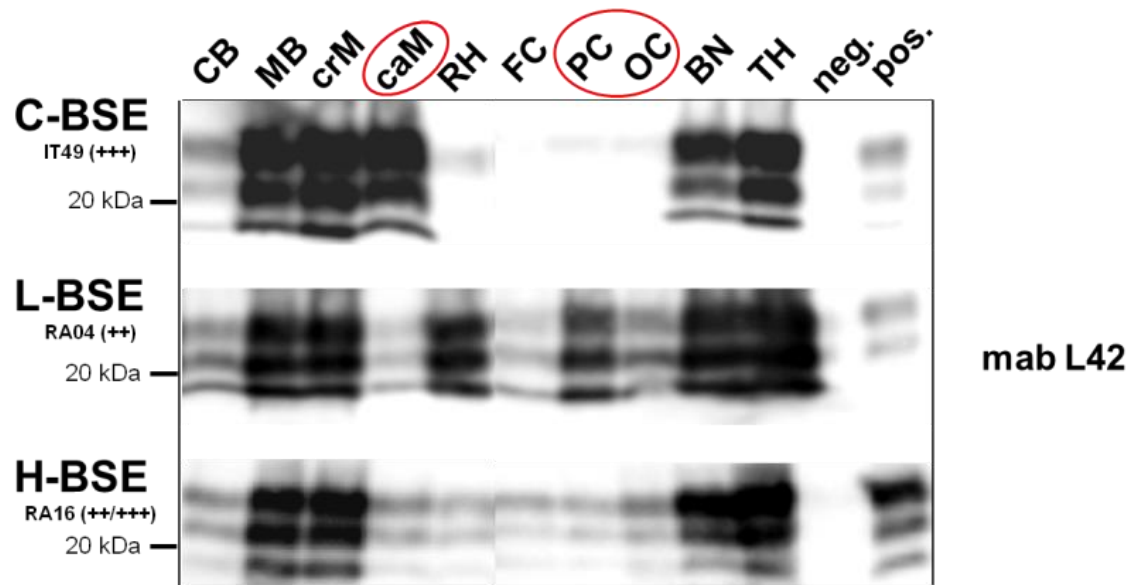


**Abb. 10:** PrP<sup>Sc</sup>-Verteilungsmuster ermittelt per IDEXX HerdChek® EIA-Untersuchung von zehn unterschiedlichen Gehirnregionen mit einem zugelassenen BSE-Schnelltestsystem, durchgeführt nach Herstellerangabe (Kurzprotokoll). Die Testdurchführung erfolgte im Doppelansatz und das arithmetische Mittel für die jeweilige BSE-Form wurde berechnet. Die kraniale Medulla wurde als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt und die restlichen Hirnregionen in deren Verhältnis gesetzt.

CB = Kleinhirn, MB = Mittelhirn inkl. Pons, crM = kraniale Medulla oblongata, caM = kaudale Medulla oblongata, RH = Rhinencephalon (Riechhirn), FC = Frontalcortex, PC = Parietalcortex, OC = Okzipitalcortex, BN = Basalkerne, TH = Thalamus; (C-BSE  $n=4$ , L-BSE  $n=5$ , H-BSE  $n=5$ ); doi:10.1371/journal.pone.0067599.g002 (Priemer *et al.*, 2013)

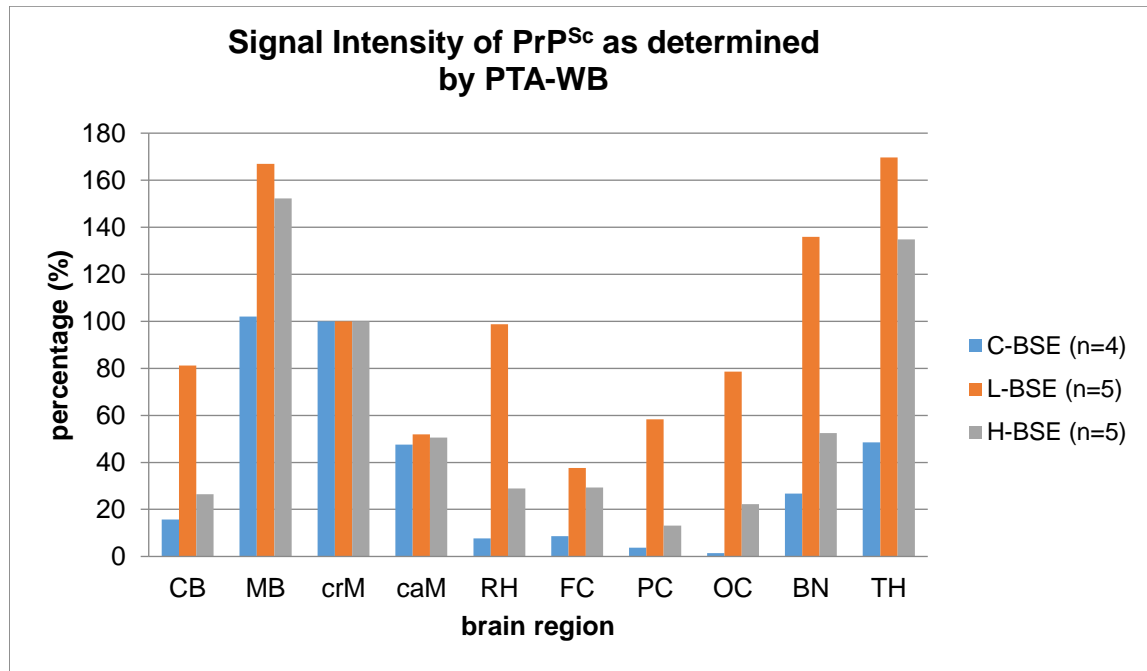
#### 4.2.1.1.2. Western Blot (PTA-WB)

Die mittels ELISA ermittelten PrP<sup>Sc</sup>-Verteilungsmuster der einzelnen BSE-Formen ließen sich mit dem Western Blot annähernd bestätigen (Abb. 11). Jedoch ermöglicht diese Methode eine exaktere Quantifizierung der Signalstärken, da vorab die Western Blot-Signale an den linearen Bereich des VersaDoc™ Imaging System angepasst wurden. In mit atypischer L- sowie H-BSE-infizierten Rindern stellte sich ein gleichmäßigeres Verteilungsmuster über die zehn Gehirnregionen dar als bei mit C-BSE infizierten Rindern. Die Ablagerungsmuster der beiden atypischen BSE-Formen ähnelten sich dabei, jedoch wies L-BSE insgesamt eine höhere Signalintensität auf.



**Abb. 11:** PrP<sup>Sc</sup>-Verteilungsmuster in zehn Hirnregionen ermittelt per PTA-WB: Western Blot-Untersuchung von zehn Hirnregionen von Rindern mit klinischen Erscheinungen einer C-, L- oder H-BSE-Erkrankung unter Anwendung des monoklonalen Antikörpers L42 als Detektionsantikörper. Die Abbildung zeigt drei repräsentative Versuchstiere (eins von jeder BSE-Form), allesamt im klinischen Endstadium einer BSE-Erkrankung (++ moderate bis +++ schwere Symptome). CB = Kleinhirn, MB = Mittelhirn inkl. Pons, crM = kraniale Medulla oblongata, caM = kaudale Medulla oblongata, RH = Rhinencephalon (Riechhirn), FC = Frontalcortex, PC = Parietalcortex, OC = Okzipitalcortex, BN = Basalkerne, TH = Thalamus doi:10.1371/journal.pone.0067599.g003 (Priemer *et al.*, 2013)

Um die Signalstärken der drei BSE-Formen besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Signalstärke der kranialen *Medulla oblongata*, die der Obexregion direkt anliegt, mit 100% gleichgesetzt und somit als Referenzwert verwendet. Dadurch wurden für L-BSE im Gegensatz zu den anderen beiden BSE-Formen C- und H-BSE in allen Gehirnregionen deutlich höhere Signalstärken ermittelt (Abb. 12). Dabei konnte für L-BSE die höchsten PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen in Hirnstamm, Basalkernen, Thalamus und Rhinencephalon ermittelt werden, während mit H-BSE infizierte Rinder die höchsten PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen in Hirnstamm und Thalamus zeigten. An C-BSE erkrankte Rinder wiesen niedrigere Signale in allen zehn Gehirnregionen im Vergleich zur atypischen BSE auf, mit den nachweisbar höchsten PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen im Hirnstamm. Somit ließen sich die drei Cortexregionen als die Gehirnbereiche mit den deutlichsten Unterschieden zwischen klassischer und atypischer BSE identifizieren. Im Gegensatz zu C-BSE zeigten beide atypische BSE-Formen beachtliche Mengen des pathologischen Prion-Proteins in allen drei Cortexregionen.



**Abb. 12:** Intensitäten der PTA-WB-Signale im Vergleich klassische zu atypischer L- bzw. H-BSE: Western Blot-Signale wurden mittels digitaler Bildgebungstechnik (VersaDoc™) gemessen und mithilfe der Software QuantityOne® (Bio-Rad, München) berechnet. Die arithmetischen Mittel wurden für die jeweilige BSE-Form errechnet. Die kraniale Medulla wurde als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt und die restlichen Hirnregionen in deren Verhältnis gesetzt; CB = Kleinhirn, MB = Mittelhirn inkl. Pons, crM = kraniale Medulla oblongata, caM = kaudale Medulla oblongata, RH = Rhinencephalon (Riechhirn), FC = Frontalcortex, PC = Parietalcortex, OC = Okzipitalcortex, BN = Basalkerne, TH = Thalamus; (C-BSE  $n=4$ , L-BSE  $n=5$ , H-BSE  $n=5$ ); doi:10.1371/journal.pone.0067599.g004 (Priemer *et al.*, 2013)

#### 4.2.1.2. Histologische Untersuchungen<sup>1</sup>

### 4.2.2. Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> in peripheren Organen von mit atypischer BSE infizierten Rindern

#### 4.2.2.1. Proteinbiochemische Untersuchungen

Alle Gewebeproben des mit L-BSE infizierten und nach 5 mpi, im präklinischen Stadium einer BSE-Erkrankung befindlichen Rindes (RA01) waren negativ in beiden durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungsmethoden (ELISA, PTA-WB).

<sup>1</sup> Die histologischen, histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen unterschiedlicher Gehirnregionen von mit klassischer bzw. atypischer BSE infizierten Rindern sind nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

Keines der mit H-BSE infizierten Rinder wurde in der präklinischen Phase einer BSE-Erkrankung euthanasiert und untersucht.

#### **4.2.2.1.1. Enzymimmunoassay (EIA / ELISA)**

Alle in der klinischen Phase einer BSE-Erkrankung befindlichen Rinder, d.h. ab einem Euthanasiezeitpunkt von 12 mpi bis zu 16 mpi waren mittels IDEXX HerdChek® BSE EIA in Obex und Rückenmark positiv (OD-Werte > 2,0). Die Sehnervproben aller zwischen 14 mpi und 16 mpi euthanasierten Rinder beider atypischer BSE-Formen waren ebenfalls positiv im ELISA mit geringgradig höheren OD-Werten bei H-BSE-infizierten Rindern (im Mittel 1,266) im Vergleich zu den mit L-BSE infizierten Rindern mit einem Mittelwert von 0,896. Periphere Gewebeprobe inklusive PNS und LRS beider atypischer BSE-Formen ergaben mit durchschnittlich 0,089 (SD=0,01) OD-Werte unterhalb des *cutoff* und waren somit negativ im ELISA.

#### **4.2.2.1.2. Western Blot (PTA-WB)**

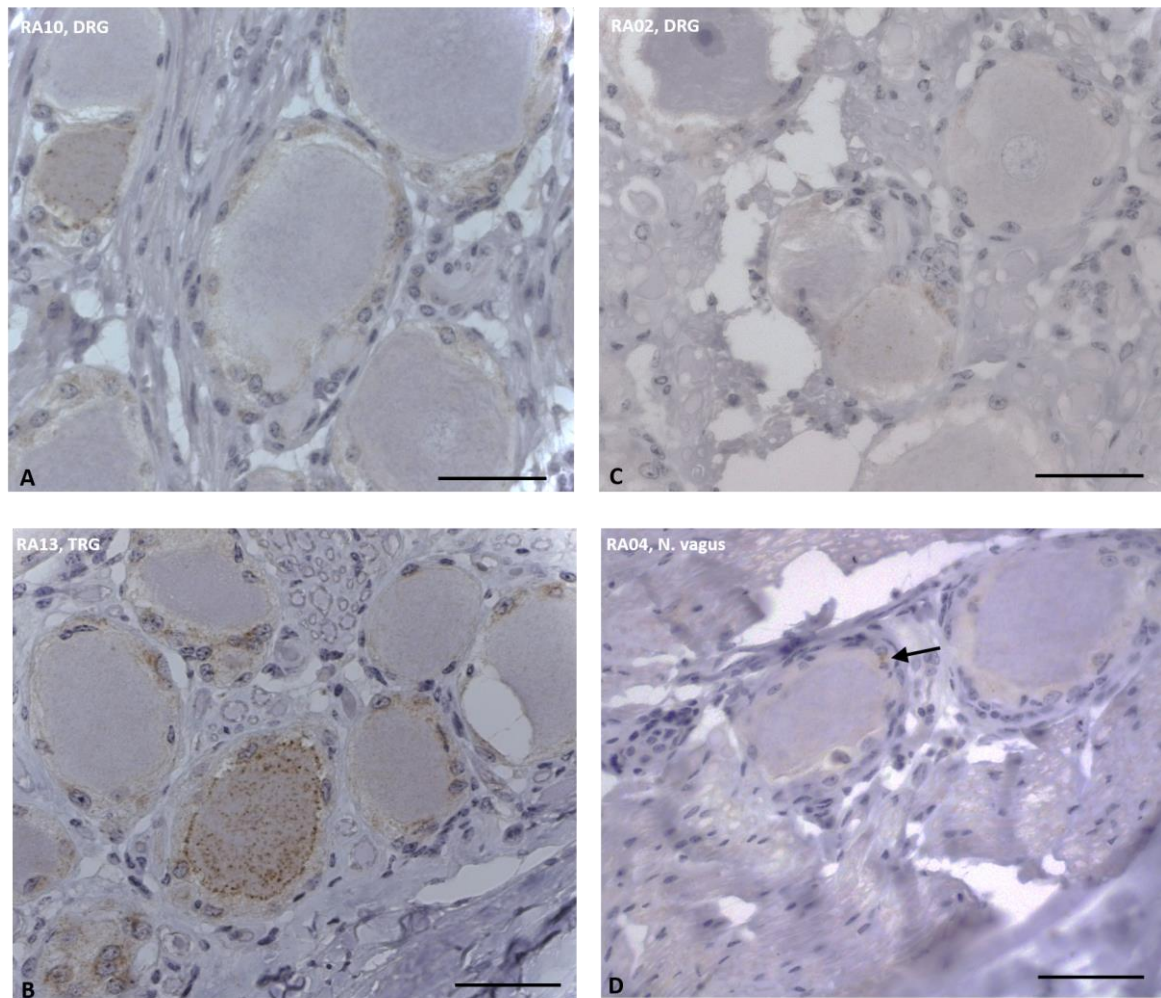
PTA-Western Blots der ZNS-Proben aller zehn, klinisch an atypischer L- bzw. H-BSE erkrankter, d.h. ab einem Zeitpunkt von 12 mpi euthanasierter Rinder waren bis zu einer Verdünnung von 1:512 positiv. Die Sehnervproben der beiden nach 12 mpi euthanasierten atypischen BSE-Rinder waren im PTA-WB negativ, wohingegen diese ab einem Infektionszeitpunkt von 14 mpi in einer Verdünnung von bis zu 1:64 positiv waren. Alle anderen Organproben des PNS, LRS, Verdauungs-, Atmungs-, Reproduktions- sowie Muskuloskelettsystems beider atypischer BSE-Formen waren negativ in den routinemäßigen proteinbiochemischen Tests.

#### **4.2.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen**

Die histopathologisch darstellbaren, schwammartigen Veränderungen wurden bereits im Kap. 4.1.2. beschrieben, da sich dabei deutliche Unterschiede zwischen beiden atypischen BSE-Formen offenbarten.

Alle Obex- und Rückenmarksproben sowie auch die Sehnerven aller aufgrund einer klinischen BSE-Erkrankung ab 12 mpi euthanasierten atypischen BSE-Rinder ergaben in der IHC-Untersuchung positive Ergebnisse (L-BSE  $n=5$ , H-BSE  $n=5$ ). H-BSE-infizierte Rinder wiesen nach 12, 15 und 16 mpi PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im dorsalen Wurzelganglion (DRG) auf, jedoch nicht in den Proben des nach 14 mpi euthanasierten H-BSE-Rindes. Die Proben des DRG L-BSE-infizierter Rinder wurden zwischen 14-16 mpi stets positiv auf PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen getestet. Während alle

H-BSE-infizierten Rinder eine milde PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation im Trigeminalganglion aufwiesen, konnten hier nur bei einem L-BSE-infizierten Rind (RA06, 14 mpi) minimale Spuren von PrP<sup>Sc</sup> nachgewiesen werden. Die Untersuchungen des Halsteils des *Nervus vagus* ergaben schwach positive Ergebnisse für das H-BSE-infizierte und nach 12 mpi euthanasierte Rind sowie für die nach 15 und 16 mpi euthanasierten Rinder bei beiden atypischen BSE-Formen H- und L-BSE. Das *Ganglion stellatum* wies bei allen drei H-BSE-infizierten und nach 15 bzw. 16 mpi euthanasierten Rindern PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen auf, während nur ein L-BSE-erkranktes Rind, welches mit 15 mpi euthanasiert wurde, PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in dieser Probe aufwies (Tab. 6). Das DRG zeigte bei H-BSE-erkrankten Rindern ein gliales PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster (5-10% der untersuchten Zellen) mit nur geringer Anzahl positiver Neuronen (<1%), während L-BSE-erkrankte Rinder nur einzelne positive Neuronen oder Gliazellen mit PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen aufwiesen (beide unter 5% der untersuchten Zellen). Bei der Untersuchung des Trigeminalganglions wurde eine Beteiligung der Neuronen (1-5% der Neuronen) für H-BSE festgestellt, während bei L-BSE hier keine Neuronen betroffen waren und nur geringe gliale PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen bei nur einem Rind (14 mpi) nachgewiesen werden konnten (Abb. 13).



**Abb. 13:** PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im peripheren Nervensystem (PNS) von mit atypischer H- bzw. L-BSE infizierter Rinder: Bestimmte periphere Ganglien wiesen bei H-BSE-infizierten Rindern bereits frühzeitig deutliche PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen auf (A: DRG, RA10, 12 mpi; B: TRG, RA13, 14 mpi). Hingegen zeigten mit L-BSE infizierte Rinder (C, D) erst zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion (16 mpi) Spuren von PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in Neuronen und Satellitenzellen (Schwannsche Zellen, Pfeil); DRG = dorsales Wurzelganglion (engl. *dorsal root ganglion*), TRG = Trigeminalganglion, N. vagus = *Nervus vagus* (hier: Halsteil) (Balkenlänge 50 µm)

Alle anderen peripheren Gewebeproben aus den lymphoretikulären, Verdauungs-, Atmungs-, Reproduktions- sowie Muskuloskelett-Systemen wurden in dieser Untersuchung negativ getestet.

Tab. 6: Biochemisch, histopathologisch und immunhistochemisch untersuchtes Nervengewebe

Zeitpunkt (Monate) nach der Inokulation	12 mpi				14 mpi				15 mpi				16 mpi				16 mpi			
	RA05				RA06				RA03				RA02				RA04			
L-Typ-BSE / Tier ID / Probenmaterial Untersuchungs- methode	IDEXX	WB	H.E.	IHC	IDEXX	WB	H.E.	IHC	IDEXX	WB	H.E.	IHC	IDEXX	WB	H.E.	IHC	IDEXX	WB	H.E.	IHC
Obex / kraniale Medulla	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Rückenmark- segment T7	+++	-	-	+	+	+	-	+	+++	++	-	++	+++	+++	+	++	+++	++	+	++
Rückenmark- segment L3	+++	+++	-	+	+	-	+	+	+++	++	(+)	++	+++	+++	+	++	++++	++	+	++
Dorsales Wurzel- ganglion (DRG)	-	-	-	-	-	+	-	(+)	-	+	-	(+)	-	+	-	+	-	-	-	-
Trigeminal- ganglion	-	-	(+)	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sehnerv	-	-	-	(+)	+	+	-	(+)	+	+	-	+	+	+	-	++	++	++	-	+
Nervus opticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	++	++	-	n.u.	n.u.
Halsteil des Nervus vagus	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Ganglion stellatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>H-Typ-BSE / Tier ID</b>	<b>RA10</b>				<b>RA14</b>				<b>RA13</b>				<b>RA15</b>				<b>RA16</b>			
Obex / kraniale Medulla	++	++	+	++	+++	+++	+	++	+++	++	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+
Rückenmark- segment T7	++	+	-	+	++	++	-	++	++	+	-	++	+++	+	+	++	+++	++	+	+
Rückenmark- segment L3	++	++	-	+	++	++	(+)	++	+++	-	(+)	++	++	++	(+)	+	+++	+	+	++
Dorsales Wurzel- ganglion (DRG)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	n.u.	+	-	+	(+)	+	-	+	-	+
Trigeminal- ganglion	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	-	(+)	-	-	(+)	-	-	+	-	+
Sehnerv	-	-	-	+	++	++	-	+	+	+	-	+	++	+	-	++	++	-	n.u.	n.u.
Nervus opticus	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	++	-	-	n.u.	n.u.
Halsteil des Nervus vagus	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Ganglion stellatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

- negativ; (+) schwach positiv; ++ moderat positiv; +++ hochgradig positiv; n.u. nicht untersucht

## 5. DISKUSSION

Der Nachweis der Existenz nicht nur eines einzelnen, sondern von zwei weiteren BSE-Erregerstämmen bei Rindern im Jahre 2004 (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004) erforderte eine detaillierte Charakterisierung dieser neuen Stämme. Hierzu wurden am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems Untersuchungen zur Erregerdifferenzierung und Pathogenese bei mit BSE infizierten Rindern (klassische und atypische BSE) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Pathogenesestudie zur atypischen BSE mit elf Rindern in Anlehnung an die ebenfalls bereits am Friedrich-Loeffler-Institut stattgefundene BSE-Pathogenesestudie zur klassischen BSE durchgeführt. Die im Zuge der zeitlich gestaffelten Sektionszeitpunkte entnommenen Gewebeproben aus allen Organsystemen (Nervensystem, lymphoretikuläres System, Atmungstrakt, Reproduktionssystem, Verdauungssystem sowie Skelettmuskulatur) wurden mit proteinbiochemischen, histologischen und immunhistochemischen Methoden sowie im transgenen Maus-Bioassay untersucht. Die Durchführung und Auswertung des Maus-Bioassays war zwar nicht Gegenstand dieser Dissertation, jedoch werden einzelne Ergebnisse des Maus-Bioassays gemeinsam mit den hier erarbeiteten Ergebnissen diskutiert.

### 5.1. Biochemische Untersuchungen zur Differenzierung der BSE-Typen

In diesem Teil der Arbeit wurden zunächst das PrP<sup>Sc</sup>-Glykosylierungsmuster sowie die molekulare Masse der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Fraktion in zehn verschiedenen Gehirnregionen von mit H-Typ- oder L-Typ-BSE infizierten Rindern verglichen. Während für C-BSE (im Mittel 60:27:13%) und H-BSE (im Mittel 55:29:16%) eine deutliche Dominanz der diglykosylierten PrP-Fraktion vorherrscht, weisen bei L-BSE die di- und monoglykosylierten Banden annähernd gleiche Werte auf (im Mittel 42:36:22%), in Einzelfällen dominierte sogar die monoglykosylierte Bande. Das für den jeweiligen BSE-Typ charakteristische Glykopprofil blieb dabei auch innerhalb der Gehirnregion und zwischen den verschiedenen Gehirnarealen stabil.

Generell konnte bestätigt werden, dass die unglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Fraktion bei L-Typ-BSE eine geringfügig niedrigere molekulare Masse als die des C-Typs aufwies; wohingegen die molekulare Masse der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Fraktion bei H-Typ-BSE ungefähr ein Kilodalton höher lag. Diese Eigenschaften waren innerhalb der untersuchten Proben eines BSE-Typs stabil, denn bei keinem der drei BSE-Typen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied der biochemischen Charakteristika zwischen den einzelnen Gehirnregionen nachgewiesen. Diese Beobachtungen

bestätigen die Aussagen für Maus-passagierte BSE- und Scrapie-Stämme (Kuczius *et al.*, 1998) sowie für Scrapie beim Schaf (Sweeney *et al.*, 2000), wohingegen regionale Unterschiede für sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) berichtet wurden (Parchi *et al.*, 1996; Levavasseur *et al.*, 2008). Weiterhin wurde die Ko-Existenz mehrerer PrP<sup>Sc</sup>-Subtypen bei an sCJD erkrankten Menschen in verschiedenen Gehirnregionen beobachtet (Parchi *et al.*, 2009). Dies konnte für keinen der drei untersuchten BSE-Typen bestätigt werden.

Zudem konnte bei meinen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass C-BSE-assoziiertes PrP<sup>Sc</sup> eine höhere Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau mit Proteasen wie der Proteinase K (PK) aufweist als das der beiden atypischen H-Typ- bzw. L-Typ-BSE-Formen. Mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen während des PK-Verdau, entweder mit einer einstündigen Inkubation mit PK-Konzentrationen bis zu 1000 µg/ml oder mittels Langzeit-PK-Verdau bei einer PK-Konzentration von 50 µg/ml über bis zu 26 Stunden, konnten dabei deutliche Unterschiede nachgewiesen werden: Bei der Inkubation mit höheren PK-Konzentrationen trat die höhere PK-Sensitivität beider atypischer BSE-Formen im Vergleich zur klassischen Form erheblich deutlicher hervor als beim Langzeit-PK-Verdau. Diese Ergebnisse stehen mit den Daten anderer Arbeitsgruppen (Jacobs *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2011; Konold *et al.*, 2012) in Einklang. Diese Eigenschaften können eine Bedeutung auf die Persistenz der BSE-Infektiosität in der Umwelt haben, da auch ubiquitär vorkommende Proteasen effektiver im Abbau von atypischer BSE-abgeleitetem PrP<sup>Sc</sup> sein werden als im Fall von klassischer BSE. Nach der sog. *Clearance*-Theorie (Parchi *et al.*, 1996) wäre durch die höhere PK-Sensitivität von atypischer BSE ein schnellerer endogener Abbau des assoziierten PrP<sup>Sc</sup> denkbar und dadurch eine verlängerte Akkumulationsdauer mit dementsprechend längerer Inkubationszeit (> 8 Jahre) bei atypischer BSE im Gegensatz zur klassischen BSE (ca. 4 Jahre). Diese Hypothese geht allerdings davon aus, dass der Zeitpunkt der Infektion bzw. der Beginn der Umfaltung zu PrP<sup>Sc</sup> zum gleichen Zeitpunkt, also bereits in den ersten Lebensmonaten, stattfindet. Denkbar ist auch eine im höheren Alter stattfindende Mutation im PRNP-Gen mit spontaner Genese. Allerdings konnte lediglich eine Arbeitsgruppe bei einem in den USA diagnostizierten atypischen H-Typ-BSE-Fall eines Rindes eine Mutation feststellen (Clawson *et al.*, 2008; Nicholson *et al.*, 2008; Richt & Hall, 2008).

## 5.2. Histopathologische Untersuchungen zur Differenzierung der drei BSE-Typen

Bei den histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der Gewebeproben von mit H- und L-Typ-BSE infizierten Rinder fielen Unterschiede in Vakuolisierung und PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster zwischen beiden atypischen BSE-Formen auf. So wurden in Kerngebieten der Obexregion, insbesondere in denen des Solitärtraktes und des Trigeminaltraktes, für L-Typ-BSE vermehrt und größere Vakuolen als beim H-Typ festgestellt, obwohl sich alle Rinder im klinischen Endstadium der BSE-Erkrankung befanden. Des Weiteren bestanden bei beiden atypischen BSE-Formen Unterschiede im PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster bei der immunhistochemischen Untersuchung mittels PrP-spezifischer Antikörper. Der H-Typ wies dabei ein überwiegend grobgranuläres, gliales Ablagerungsmuster auf, wohingegen der L-Typ ein vorwiegend neuronales Ablagerungsmuster zeigte, wobei jedoch alle nervalen Zelltypen betroffen sein können. Demgegenüber steht das intraneuronale und extrazelluläre PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungsmuster der C-BSE bei Rindern mit nur geringer Beteiligung der Satellitenzellen (Kaatz *et al.*, 2012), in Abhängigkeit des betroffenen Nervensystemabschnittes: Während bei klassischer BSE im PNS das perineuronale Reaktionsmuster überwiegt, herrscht im ZNS das intraneuronale Reaktionsmuster mit nur geringer perineuronaler Beteiligung einzelner Neuronen vor. Eine Vermischung der Reaktionsmuster findet sich jedoch im sympathischen Anteil des PNS, was im Hinblick auf die Ausbreitung im Körper eine Rolle spielt. Das Trigeminalganglion als Beispiel für die zentrifugale Ausbreitung nach einer Replikation im ZNS wies auch bei C-BSE ein progredientes Reaktionsmuster der Satellitenzellen auf, was mit den Befunden für den H-Typ übereinstimmt. Allerdings wurden in unserer Studie zur atypischen BSE die Untersuchungen der Akkumulationsmuster vorerst nur in der Obexregion und im Rückenmark durchgeführt. Obwohl KONOLD *et al.* die Eignung der Obexregion für die vergleichende Untersuchung nach intrakranialer Inokulation aufgrund der Menge der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen und dessen Verteilung kritisch betrachten (Konold *et al.*, 2012), zeigten die hier untersuchten Rinder Ähnlichkeiten im Akkumulationsmuster zu publizierten Ergebnissen (Brown, 1999a; Buschmann *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2011; Greenlee *et al.*, 2012; Konold *et al.*, 2012), bei denen ebenfalls das intragliale Reaktionsmuster für den H-Typ dominierte. Des Weiteren wurde eine Antikörperabhängigkeit für das darstellbare Akkumulationsmuster beschrieben (Okada *et al.*, 2011), da bei der Verwendung von

PrP-core-spezifischen Antikörpern beim H-Typ kein intragliales Ablagerungsmuster nachweisbar war. Die Kombination von core-spezifisch- und C-terminal-bindenden monoklonalen Antikörpern (mAk) in einer Antikörpermischung kann demnach möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die detektierten Akkumulationsmuster bei beiden atypischen BSE-Formen nehmen. Im Widerspruch dazu steht jedoch die Beobachtung von O'ROURKE *et al.*, die keinen Unterschied zwischen der Verwendung eines einzelnen monoklonalen PrP-Antikörpers (F89/160.1.5, VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; Epitop AS 148-155) gegenüber einer Antikörpermischung (F89/99) fand (O'Rourke *et al.*, 2000), wobei F99 weiter C-terminal am Epitop AS 217-231 bindet. Auffällig für H-Typ-BSE-assoziiertes PrP<sup>Sc</sup> ist die hohe Affinität zu C-terminal-bindenden monoklonalen Antikörpern (Buschmann *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2011; Konold *et al.*, 2012) ähnlich wie bei F99, was ebenfalls zu der hohen Sensitivität der Antikörpermischung 6C2/F99 beigetragen haben kann.

Die Unterschiede im Akkumulationsmuster zwischen beiden atypischen BSE-Formen können ebenfalls auf einen möglichen Zelltropismus, wie er bereits für PrP<sup>Sc</sup> bei Scrapie-infizierten Schafen beschrieben wurde (Tobler *et al.*, 1996), hinweisen, mit konsekutivem Abbau des entsprechenden PrP<sup>Sc</sup> durch unterschiedliche Zelltypen. Dabei bleibt zu klären, ob der Zelltropismus durch die Länge und Konformation des PrP<sup>Sc</sup> bestimmt ist oder umgekehrt. Die Länge des residualen PrP<sup>Sc</sup>-Fragmentes nach PK-Verdau (PrP 27-30) scheint dabei entscheidend, wobei die PK-Schnittstellen als ein Resultat der Konformation und dabei insbesondere dem Gehalt an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen angesehen werden (Caughey *et al.*, 1991; Caughey *et al.*, 1998). Inwiefern Unterschiede in der Konformation des residualen PrP<sup>Sc</sup> mit dem Grad der PK-Empfindlichkeit in Zusammenhang stehen, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Auch bei der immunhistochemischen Untersuchung der peripheren Gewebe wurden Unterschiede zwischen beiden atypischen BSE-Formen deutlich. So fiel der H-Typ durch frühere und stärkere PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im PNS gegenüber dem L-Typ auf. Inwieweit dies für die Pathogenese relevant sein kann, wird an anderer Stelle diskutiert (s. Kap. 5.3.2)

### 5.3. Verteilung von pathologischem Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>) im Rind

#### 5.3.1. Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn von mit atypischer BSE infizierten Rindern

##### 5.3.1.1. Proteinbiochemische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die anatomische Verteilung des akkumulierten PrP<sup>Sc</sup> in zehn verschiedenen Gehirnregionen von mit den beiden H-Typ- und L-Typ-BSE-Stämmen intrakranial infizierten Rindern im Vergleich zur klassischen BSE (C-Typ-BSE) beurteilt.

Bis auf das präklinisch mit 5 mpi euthanasierte Rind (L-Typ-BSE) zeigten alle untersuchten Rinder zum Zeitpunkt der Euthanasie milde bis hochgradige klinische Symptome einer BSE-Erkrankung. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Proben von vier Tieren aus einer oralen klassischen BSE-Pathogenesestudie untersucht (Hoffmann *et al.*, 2007). Eine Vergleichbarkeit von Gehirnproben von Rindern nach oraler und intrakranialer Infektion ist insofern gegeben, da gezeigt werden konnte, dass nach intrakranialer Infektion von Rindern mit klassischer BSE dieselben Hirnregionen betroffen sind wie nach oraler Infektion (Fukuda *et al.*, 2012). Allerdings zeigte sich, dass die Cortexregionen, und dabei insbesondere die okzipitale Großhirnrinde, nach oraler Infektion von Rindern mit C-BSE weniger betroffen waren als nach intrakranialer Infektion (Fukuda *et al.*, 2012). Weiterhin deutet auch die Untersuchung der anatomischen Verteilung von PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen in Gehirnregionen eines natürlichen H-Typ-BSE-Falls darauf hin, dass die Verteilungsmuster bei natürlichen Fällen und experimentell intrakranial infizierten Tieren weitgehend übereinstimmen (Balkema-Buschmann *et al.*, 2016). Interessanterweise wiesen L-Typ-Feldisolate italienischer Rinder, von denen verschiedene Gehirnregionen zur Untersuchung verfügbar waren, ebenfalls hohe PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen in der Großhirnrinde auf (Casalone *et al.*, 2004). Dies lässt vermuten, dass dies tatsächlich ein Merkmal der L-Typ-BSE-Form darstellt und nicht der intrakranialen Inokulation geschuldet ist. Dennoch müssen die Ergebnisse für die Cortexproben weiterhin mit gewisser Vorsicht interpretiert werden. Überdies konnte bei einem intrakranial mit BSE infizierten Schaf nach einer genauen Untersuchung der Inokulationsstelle die ursprüngliche Hypothese derselben Autoren aus einer früheren Veröffentlichungen widerlegt werden (Jeffrey & Gonzalez, 2004; Aguilar-Calvo *et al.*, 2015), dass nach intrakranialer Inokulation die Menge von PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen um den Einstichkanal herum höher ist. Darüber hinaus konnte mit Hilfe PrP-spezifischer

Antikörper, die an jeweils unterschiedlichen Bindungsepitopen anhaften, um zwischen ovinem bzw. bovinem PrP zu differenzieren, veranschaulicht werden, dass die PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen an der Injektionsstelle tatsächlich neu geformtes ovines PrP<sup>Sc</sup> war und nicht Reste des bovines Inokulums (Siso *et al.*, 2009b). Der einzige, mit einer intrakraniellen Inokulation verbundene Effekt kann die Feststellung von geringfügig mehr PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im Vorderhirn sein (Siso *et al.*, 2009b). In dieser Studie wurde weiterhin nachgewiesen, dass nach intrakranieller Inokulation von Schafen, PrP<sup>Sc</sup> und Infektiosität zunächst aus dem betroffenen Hirnareal mit dem Blutstrom in die Peripherie transportiert wird (Siso *et al.*, 2009a). Nachfolgend steigt das infektiöse Agens, vermutlich über den neuronalen Weg, langsam zum ZNS auf (Wells *et al.*, 2005). Demzufolge können die Ergebnisse von intrakranial mit atypischer BSE infizierten Rindern weitgehend mit denen von oral mit klassischer BSE infizierten Rindern in Relation gesetzt werden.

Zehn verschiedene Hirnregionen wurden biochemisch hinsichtlich der Menge der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen analysiert, damit ist diese Studie detaillierter als bereits veröffentlichte Studien. Während bei der C-BSE die PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen weitestgehend auf den Hirnstamm und in geringerem Ausmaß auf das Kleinhirn beschränkt sind, zeigten an beiden Formen der atypischen BSE erkrankte Rinder eine nahezu gleichmäßige Verteilung des pathologischen Prion-Proteins über das gesamte Gehirn. Obwohl das Ablagerungsmuster für H- und L-Typ-BSE sehr ähnlich war, konnten bei der L-BSE generell stärkere Signale gemessen werden. Auch wenn nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die Ergebnisse der Cortexregionen wie oben diskutiert durch die Inokulationsroute beeinflusst sein können, wurden die deutlichsten Unterschiede in diesen Regionen nachgewiesen. Während an klassischer BSE erkrankte Rinder selbst im Endstadium der Krankheit nur geringe Signale in diesen Regionen aufwiesen, zeigten an beiden Formen der atypischen BSE erkrankte Rinder eindeutig höhere PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen in den untersuchten Großhirnrindengebieten. Für alle drei BSE-Formen konnten auffallend große Mengen an PrP<sup>Sc</sup> im Mittelhirn, verlängerten Mark und Thalamus nachgewiesen werden. Jedoch wurden bei der klassischen BSE im kaudalen Anteil des verlängerten Marks (*Medulla oblongata*) höhere Konzentrationen des pathologischen Prion-Proteins gefunden als in weiter kranial gelegenen Abschnitten. Dagegen war für beide atypische BSE-Formen mehr PrP<sup>Sc</sup> im kranialen Abschnitt des verlängerten Marks nachweisbar als im kaudalen Anteil. Dies könnte darauf hindeuten, dass die atypische

BSE ihren Ursprung tatsächlich im Gehirn hat, während es im Fall von klassischer BSE zu einem Aufstieg aus der Peripherie kommt und zunächst die kaudale Medulla erreicht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer anderen Studie beschrieben (Polak & Zmudzinski, 2012). Dieser Befund macht eine sorgfältige Entnahme der diagnostischen Probe für den BSE-Schnelltest aus der Obexregion unverzichtbar, um der Gefahr vorzubeugen, zu weit kaudal und somit die weniger betroffenen kaudalen Anteile der *Medulla oblongata* zu entnehmen. Dies gilt insbesondere in Hinblick auf L-Typ-BSE, bei dem Thalamus, Basalkerne und Mittelhirn stärker betroffen sind als der Obex und vor allem als die kaudale *Medulla oblongata*. Der IDEXX HerdChek® BSE EIA ist einer der in der EU zugelassenen BSE-Schnelltests mit einer vergleichbar hohen Sensitivität für alle drei BSE-Formen (Meloni *et al.*, 2012). Nach Untersuchung mit diesem Enzymimmunoassay (EIA) wurden für alle zehn untersuchten Hirnregionen von mit L-BSE infizierten Rindern Werte für die optische Dichte (OD) nahe der Sättigungsgrenze bestimmt, diese verliefen somit nicht linear.

Bei der atypischen BSE-Pathogenesestudie fielen im Endstadium der Erkrankung Unterschiede im Verhalten zu den mit klassischer BSE infizierten Rindern auf, von denen bereits früher ausführlich berichtet wurde (Balkema-Buschmann *et al.*, 2011b). An klassischer BSE erkrankte Rinder fielen durch Bewegungsstörungen bis hin zum Festliegen sowie Übererregbarkeit auf optische, akustische und taktile Reize auf. Weiterhin zeigten sie einen deutlichen Konditionsverlust (Balkema-Buschmann *et al.*, 2011a). Vergleicht man das klinische Bild der klassischen BSE bei Rindern mit denen der atypischen BSE-Formen, so lassen sich folgende Unterschiede erkennen: Während bei der klassischen BSE Ataxie und Hypersensibilität im Vordergrund stehen, fällt bei atypischer BSE zuerst ein deutlicher Konditionsverlust auf. Rinder, die an atypischer BSE erkranken, werden frühzeitig lethargisch und antriebslos und separieren sich von der Herde. Erst wenn solche Tiere während der klinischen Untersuchung bestimmten Reizen ausgesetzt werden, werden Ataxie der Hinterhand, Hyperästhesie (insbesondere am Kopf) sowie Ängstlichkeit wie bei der klassischen BSE erkennbar. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen, die bei L-Typ-BSE-infizierten Rindern Gedämpftheit, Aktivitätsminderung und Überreaktion bei Berührungen am Kopfbereich (Lombardi *et al.*, 2008), eine anfängliche Überreaktion auf taktile Reize, die später einer eher schwerfälligen Form wich (Konold *et al.*, 2012) sowie einen auffälligen

Konditionsverlust feststellten (Okada *et al.*, 2011). Insofern überwiegen Symptome wie Aktivitätsminderung und Konditionsverlust bei den atypischen BSE-Formen. Die unterschiedliche klinische Symptomatik kann somit in der Funktion und Phylogenese der verschiedenen betroffenen Hirnareale begründet sein. So könnte die Schwerfälligkeit durch die stärkere Mitbeteiligung der Großhirnrinde, als Sitz des komplexen Bewusstseins und zielgerichteter Bewegung, bei den beiden atypischen BSE-Formen verursacht sein.

### **5.3.2. Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> in peripheren Organen atypischer BSE-infizierter Rinder**

#### **5.3.2.1. Proteinbiochemische Untersuchungen**

Mit den hier angewandten biochemischen Untersuchungsmethoden (ELISA, PTA-WB) konnten für die Proben des zentralen Nervensystems (Obex und Rückenmark sowie Sehnerv) positive Ergebnisse erzielt werden. Der Sehnerv wird als Ausstülpung des Zwischenhirns und somit wie auch die Retina entwicklungsgeschichtlich als Teil des ZNS beschrieben (Nickel, 2004). Alle Proben der peripheren Gewebe aus dem peripheren Nervensystem, Lymphoretikular-, Respirations-, Reproduktions-, Digestions- sowie Muskuloskelettsystem waren negativ im angewandten BSE-Schnelltest, jedoch zeigten einzelne Nervengewebeproben des PNS „high negative readings“. Da dieser Test vorrangig für die Untersuchung von Gehirnproben validiert wurde, war zunächst unklar, ob diesen hoch-negativen Ergebnissen eine diagnostische Relevanz zugeordnet werden kann. Damit waren diese beiden biochemischen Untersuchungsmethoden weniger sensitiv als die Immunhistochemie, die im Abschnitt 5.3.2.2 diskutiert wird. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Notwendigkeit der Etablierung sensitiverer biochemischer Untersuchungsmethoden, mit dem Ziel, die Maus-Bioassays langfristig zu ersetzen.

#### **5.3.2.2. Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen**

Die histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen peripherer Gewebe von mit atypischer BSE infizierten Rindern bestätigten für beide atypische BSE-Formen eine weitgehende Restriktion der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen auf das Nervensystem, analog zur klassischen BSE. Somit scheinen sich die drei BSE-Formen in ihrer Pathogenese zu ähneln. Dies bestätigten auch andere Studien (Okada *et al.*, 2011; Konold *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2012b). Jedoch wies der H-Typ eine frühzeitigere und stärkere PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation in peripheren Ganglien und dem

Sehnerv als der L-Typ auf. Zudem zeigten H-Typ-BSE-infizierte Rinder ein interessantes Phänomen in der weißen Substanz des Rückenmarks: Efferente, absteigende Rückenmarksbahnen wiesen eine stärkere PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung auf als afferente, aufsteigende Bahnen. KONOLD (Konold *et al.*, 2012) beschrieb zwar ebenfalls bereits für den H-Typ ein ausgedehntes gliales Ablagerungsmuster in der weißen Rückenmarkssubstanz, differenzierte dabei jedoch nicht hinsichtlich der Informationsübertragungswege von efferenten und afferenten Bahnen. In Hinblick auf den intrakraniellen Inokulationsweg mag dieser Unterschied wenig überraschen, kann allerdings in Zusammenhang mit den niedrigeren Signalen im Gehirn im Gegensatz zum L-Typ für eine mögliche, schnellere Ausbreitung des H-Typ-assoziierten PrP<sup>Sc</sup> vom Gehirn in die Peripherie eine Rolle spielen bzw. auf einen glialen Zelltropismus hindeuten. Bei L-Typ-BSE-infizierten Rindern wurde dieses Phänomen dagegen nicht beobachtet. Zusammen mit den Befunden aus der Untersuchung des Gehirns mit den deutlich stärkeren Signalen für den L-Typ kann man schlussfolgern, dass sich L-Typ-BSE bei infizierten Rindern vorwiegend im Gehirn repliziert, wo sich mehr Neuronen befinden als im PNS, wohingegen der H-Typ eher zu einer zentrifugalen Ausbreitung über periphere, Glia-äquivalente Schwannsche Zellen zu neigen scheint, was von OKADA *et al.* (Okada *et al.*, 2013) ebenfalls vermutet wurde.

Obwohl auch andere Arbeitsgruppen zunächst ebenfalls keine histopathologischen Veränderungen in diversen Skelettmuskelproben nachweisen konnten (Okada *et al.*, 2012b), wurden in italienischen und britischen Studien amyotrophe Veränderungen (Lombardi *et al.*, 2008) bzw. PrP-Reaktivität (Konold *et al.*, 2012; Suardi *et al.*, 2012) in der Muskulatur nachgewiesen. Da eine zentrifugale Ausbreitung über periphere Nerven nach Replikation im ZNS analog zur klassischen BSE wahrscheinlich ist (Iwamaru *et al.*, 2010; Okada *et al.*, 2012a; Okada *et al.*, 2013), bleibt die Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in peripheren Organen vermeintlich ein Resultat der Innervation und wird nur im Spätstadium einer klinischen BSE-Erkrankung von Rindern nachgewiesen.

#### **5.3.2.3. Pathogenesestudien mit Hilfe von Tgbov XV-Mäusen (Maus-Bioassay)**

Der ebenfalls am FLI Riems durchgeführte Maus-Bioassay von verschiedenen Gewebeproben aus ZNS, PNS, LRS sowie Skelettmuskulatur von mit atypischer L- bzw. H-Typ-BSE infizierten Rindern bestätigte die weitgehende Restriktion der Infektiosität auf nervales Gewebe. Jedoch konnten Unterschiede sowohl in der

peripheren PrP<sup>Sc</sup>-Verteilung als auch der Infektiosität des PNS zwischen beiden atypischen BSE-Formen nachgewiesen werden. Eine Infektion von Tgbov XV-Mäusen mit Nervenproben L-BSE-infizierter Rinder resultierte in kürzeren Inkubationszeiten und höheren Infektionsraten (bis zu 100%) in den eingesetzten Tiergruppen im Gegensatz zu Infektionsraten von weniger als 50% nach Infektion mit Nervenproben von mit H-BSE infizierten Rindern.

Mit H-Typ-BSE infizierte Rinder schienen im Vergleich zur L-Typ-BSE frühere und stärkere PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulationen im dorsalen Wurzelganglion, Trigeminalganglion und Sehnerv aufzuweisen. Hingegen zeigten mit L-BSE infizierte Rinder eine stärkere Beteiligung des Vagusnervs sowie des peripheren motorischen Nervensystems und Muskuloskelettsystems. Der Gehalt an BSE-Infektiosität peripherer Nervengewebe bei mit L-BSE infizierten Rindern war im Vergleich zu H-BSE deutlich gesteigert, wobei die Inkubationszeiten für H-BSE im Maus-Bioassay ebenfalls verlängert waren. Angesichts des 10fach höheren Erregergehalts (festgestellt durch Paralleltitration in Tgbov XV-Mäusen) des L-Typ-BSE-Inokulums im Vergleich zum H-Typ-Inokulum müssen diese Unterschiede sowie die resultierenden unterschiedlichen Infektionstitern in den Geweben der H- und L-Typ-BSE-infizierten Rindern allerdings vorsichtig interpretiert werden.

Die unterschiedlichen PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulationsmuster und histopathologischen Veränderungen in Verbindung mit den Ergebnissen aus dem Maus-Bioassay lassen einen unterschiedlichen Zelltropismus sowie divergierende Replikationsorte bei den beiden atypischen BSE-Formen sowie der C-BSE vermuten, wie es auch bereits für verschiedene Scrapie-Stämme beschrieben wurde (Gonzalez *et al.*, 2009). Somit scheint naheliegend, dass beide atypische BSE-Formen ihren Ursprung im Nervensystem haben, während C-BSE nach oraler Aufnahme des Erregers über das PNS in das ZNS aufsteigt (Hoffmann *et al.*, 2011). Insbesondere L-BSE kann durch seine Affinität zu Neuronen ein Indikator für die ursprüngliche PrP<sup>Sc</sup>-Bildung in Neuronen des ZNS und PNS mit einer anschließenden neuronalen Ausbreitung im Körper darstellen. Verdeutlicht wurde diese neuronale Affinität der L-Typ-BSE durch sehr hohe PrP<sup>Sc</sup>-Konzentrationen in allen zehn untersuchten Hirnregionen mit Höchstwerten in Mittelhirn, Riechhirn und Thalamus in Verbindung mit der hochgradigen, teils konfluierenden, intraneuronalen Vakuolenbildung sowie der frühen PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung im Vagusnerv und peripheren motorischen Nervensystem. Hingegen weisen die Ergebnisse für H-Typ-BSE mit einem überwiegend glialen PrP<sup>Sc</sup>-

Akkumulationsmuster auf einen stärkeren Zelltropismus zu Makroglia des ZNS (Astrozyten und Oligodendrozyten) als mögliche Replikationsstellen hin.

Die in einzelnen Muskelproben (*Musculus longissimus dorsi*, *Musc. semitendinosus*) nachgewiesene Infektiosität reiht sich in die Theorie der zentrifugalen nervalen peripheren Ausbreitung ein. Die nach primärer Bildung im ZNS von Rindern erfolgende Ausbreitung von PrP<sup>Sc</sup> und Infektiosität über Nervenbahnen in periphere Körpergewebe scheint somit für beide atypische BSE-Formen plausibel zu sein.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Grit Priemer

### **Pathogenese und Erregerdifferenzierung der atypischen L-Typ- und H-Typ-BSE-Infektion bei Rindern**

Nach umfangreicher Untersuchung von zehn Gehirnabschnitten und einer Vielzahl peripherer Organe mit diversen Untersuchungsmethoden lässt sich für die beiden bisher bekannten atypischen BSE-Formen, dem L-Typ und dem H-Typ, eine ähnliche Pathogenese wie bei der klassischen C-BSE bestätigen. Dies entspricht einer generellen Restriktion auf das Nervensystem. Erst im späten klinischen Stadium der BSE-Erkrankung und nach Replikation im ZNS kommt es zu einer zentrifugalen Ausbreitung über periphere Nerven, wodurch es im Endstadium der Erkrankung ebenfalls zu positiven PrP<sup>Sc</sup>-Nachweisen in Skelettmuskelpartien kommen kann. Bei Aufrechterhaltung der bisherigen tierseuchenrechtlichen und fleischhygienischen Bestimmungen zur Eindämmung der BSE besteht für den Endverbraucher kaum Gefahr einer erneuten BSE-Epidemie. Jedoch werden aufgrund der stark zurückgegangenen klassischen BSE-Fälle sowie der lediglich sporadisch auftretenden atypischen BSE diese Maßnahmen auf Basis einer Kosten-Nutzen-Rechnung nach und nach deutlich reduziert.

Hinsichtlich der Erregerverteilung im Gehirn bleibt zu vermerken, dass es hier Unterschiede zwischen den drei BSE-Formen gibt: der L-Typ betrifft recht gleichmäßig alle Gehirnabschnitte, jedoch mit deutlichen Peaks in Riechhirn, Thalamus und Mittelhirn, wohingegen der H-Typ ein ähnliches Verteilungsmuster, jedoch generell niedrigere Signale in allen Gehirnabschnitten als der L-Typ aufweist. Für C-BSE lässt sich nach oraler Infektion nur eine minimale Beteiligung der Großhirnrinde feststellen, wobei zu erwähnen ist, dass andere Arbeitsgruppen eine stärkere Beteiligung der Großhirnrinde nach intrakranialer Inokulation ermittelten, die jedoch nicht die Stärke der atypischen BSE-Formen erreichte. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Art und Ausprägung der klinischen Symptomatik sein. Eine weitere betroffene Region des ZNS stellt das verlängerte Mark (*Medulla oblongata*) dar: Zeigt die klassische BSE deutlich stärkere Signale in der kaudalen *Medulla*, ist diese bei beiden atypischen BSE-Formen jedoch vorwiegend auf die kranialen Abschnitte der *Medulla oblongata* beschränkt. Dies könnte ein Hinweis hinsichtlich der Ausbreitung im Gesamtorganismus sein: Für klassische BSE kommt primär der orale Infektionsweg über das den Darm innervierende enterische Nervensystem und danach weiter über

parasympathische und sympathische Nerven hin zum Rückenmark bzw. dem Gehirn, dort insbesondere der Obexregion im verlängerten Mark, in Betracht. Demgegenüber sprechen die Befunde bei beiden atypischen BSE-Formen eher für einen kranialen, und somit sporadischen Ursprung. Dieser Umstand sollte bei der Entnahme der diagnostischen Probe (Obex) stets beachtet werden, d.h. die sogenannte „Löffelprobe“ darf nicht zu weit kaudal entnommen werden.

Die Untersuchungen zur proteolytischen Stabilität der BSE-Stämme zeigen für beide atypische BSE-Formen eine geringere Proteaseresistenz gegenüber dem deutlich stabileren C-Typ, wobei der H-Typ die höchste Empfindlichkeit aufweist. Ob dies *in vivo* mit einem schnelleren Abbau des pathologischen Prion-Proteins und damit einer erhöhten Inkubationszeit einhergeht, lässt sich nur vermuten. Ein anscheinend bestehender Zelltropismus für Neuronen bei der L-BSE bzw. der Makroglia bei der H-BSE kann Rückschlüsse auf den Ursprung der atypischen BSE im Gehirn ermöglichen. Ebenso ist noch nicht eindeutig geklärt, ob dieser unterschiedliche Zelltropismus der drei BSE-Formen einen Einfluss auf den Abbau des PrP<sup>Sc</sup> hat oder ob die Konformation des PrP<sup>Sc</sup> eines jeweiligen TSE-Stammes durch die unterschiedlichen Zelltypen bestimmt wird. Weiterhin kann ein Zelltropismus Bedeutung bei der zentrifugalen Ausbreitung des PrP<sup>Sc</sup> vom Gehirn in die Peripherie haben, wofür erste Anzeichen beim H-Typ vorzufinden sind. Bedenkt man dessen überwiegend gliales Reaktionsmuster und das mengenmäßige Vorhandensein der Glia-Analoga im PNS, so kann man dem H-Typ bessere Möglichkeiten zur peripheren Ausbreitung über die Schwannschen Zellen als dem stärker Neuronen-präferierenden L-Typ zuschreiben.

## 7. SUMMARY

Grit Priemer

### **Pathogenesis and agent differentiation of atypical L-type and H-type BSE infection in cattle**

After the extensive investigation of ten brain areas and a huge panel of different peripheral organs with diverse analytical methods a pathogenesis study for the two atypical L- and H-BSE types was carried out and results compared to classical C-BSE type infections. All BSE types display a general restriction to the nervous system and a centrifugal spread via peripheral nerves was observed only in the late clinical stages of all three types after a massive replication in the central nervous system (CNS) leading to PrP<sup>Sc</sup> depositions even in skeletal muscles eventually. By maintaining the present regulations for transmissible spongiform encephalopathies (i. e. SRM, monitoring), the risk for the consumer remains negligible. But since classical and atypical BSE occurs very rare currently, the regulations are downscaled more and more after cost-benefit-analysis. However, in regards to the PrP<sup>Sc</sup> distribution in the CNS of BSE infected cattle, this study revealed differences between the three BSE types: L-type BSE after intracranial inoculation leads to a massive deposition which seems to be evenly distributed in all brain areas, but with only distinct peaks in rhinencephalon, thalamus and midbrain. Likewise does H-type BSE display almost a similar but less pronounced pattern as L-type BSE. In contrast, classical BSE (following oral infection) is affecting only basal CNS regions and hardly the cortex. It has to be mentioned that other research groups found a higher affection of cortices after intracranial challenge, but never reaching the levels found in cattle infected with atypical BSE here in this study. We postulate that this may be a plausible reason for the different clinical picture seen in classical and atypical BSE. Another affected region of the CNS is the medulla oblongata: C-BSE leads to a strong PrP<sup>Sc</sup> deposition at the caudal medulla, whereas for both atypical BSE types rather the cranial medulla is affected. These different deposition patterns in the medulla should be kept in mind when samples for BSE testing are sourced. This could also be an indication of the distribution in the entire organism. The oral route of infection with entrance in the gut associated enteric nervous system followed by an ascending infection via parasympathetic and sympathetic nerves to the spinal cord and / or the brain prevails for classical BSE. In contrast, investigations for both atypical L- and H-BSE indicate an intracranial and therefore rather a sporadic origin.

Analysis of proteolytic stability reveals for both atypical L- and H-type BSE a lower proteinase resistance as compared to the notably more stable C-type BSE PrP<sup>Sc</sup>, showing the highest PK susceptibility for H-type BSE. It is only speculative whether this fact corresponds *in vivo* with a faster degradation of pathologic prion protein and, as a consequence thereof, with a longer incubation period. An apparent cell tropism for neurons in L-type BSE versus macroglia for H-type BSE could give hints for the origin of atypical BSE in the brain. It remains to be determined whether this distinct cell tropism found in the three BSE types has an impact on the degradation of the PrP<sup>Sc</sup>, or if the PrP<sup>Sc</sup> conformation of the different TSE strains is determined by the distinct cell types. Moreover, the cell tropism could be relevant for the centrifugal PrP<sup>Sc</sup> distribution from the brain to the peripheral organs. First indications may apply for H-type BSE: in regards to its predominantly glial pattern as well as the amount of glial analogs in contrast to the presence of neurons in the peripheral nervous system, H-type BSE may more easily spread into the periphery via Schwann cells, as compared to the neuronal spread observed for L-type BSE.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aguilar-Calvo, P., Fast, C., Tauscher, K., Espinosa, J. C., Groschup, M. H., Nadeem, M., Goldmann, W., Langeveld, J., Bossers, A., Andreoletti, O. & Torres, J. M. (2015).** Effect of Q211 and K222 PRNP Polymorphic Variants in the Susceptibility of Goats to Oral Infection With Goat Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Infect Dis* **212**, 664-672.
- Aldhous, P. (1990).** BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature* **345**, 194.
- Alper, T. (1985).** Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. *Nature* **317**, 750.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967).** Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-766.
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. & Wells, G. A. (1996).** Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**, 779-788.
- Anonym (2011).** Beschluss des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) 603: Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit Transmissibler Spongiformer Enzephalopathie (TSE) assoziierter Agenzien in TSE-Laboratorien. *GMBI Nr 12 vom 05 Mai 2011, S 237*.
- Anonym (2016a).** Case of classical BSE confirmed in France. *The Veterinary record* **178**, 328.
- Anonym (2016b).** OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Bovine Spongiform Encephalopathy, Chapter 2.4.5, May 2016 edn, pp. 1-14.
- Anonym (October 2016).** National CJD Research & Surveillance Unit Data and Reports. Latest NCJDSRU CJD Monthly Statistics [cited 2016 October].
- Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills, B. & Groschup, M. H. (2011a).** Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev Vet Med* **102**, 112-117.
- Balkema-Buschmann, A., Priemer, G., Keller, M., Mazza, M., Hills, B. & MH, G. (2016).** Intra- and Interspecies Transmission of Atypical BSE – What Can We Learn from It? *Food Safety Vol. 4 (2016) No. 4*, pp. 121-129.
- Balkema-Buschmann, A., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hoffmann, C., Rogers, R., Hills, B. & Groschup, M. H. (2011b).** Experimental challenge of cattle with German atypical bovine spongiform encephalopathy (BSE) isolates. *J Toxicol Environ Health A* **74**, 103-109.
- Baron, T., Vulin, J., Biacabe, A. G., Lakhdar, L., Verchere, J., Torres, J. M. & Bencsik, A. (2011).** Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice. *PLoS One* **6**, e15839.
- Bencsik, A., Leboidre, M., Debeer, S., Aufauvre, C. & Baron, T. (2013).** Unique properties of the classical bovine spongiform encephalopathy strain and its emergence from H-type bovine spongiform encephalopathy substantiated by VM transmission studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**, 211-218.
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A. & Bratberg, B. (2003).** Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *The Veterinary record* **153**, 202-208.
- Beringue, V., Andreoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J. L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabe, A. G., Baron, T., Caramelli, M., Casalone, C. & Laude, H. (2007).** A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform

- encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci* **27**, 6965-6971.
- Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T. L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A. G., Baron, T., Vilotte, J. L. & Laude, H. (2006).** Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog* **2**, e112.
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S. & Baron, T. (2004).** Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* **5**, 110-115.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P. & Prusiner, S. B. (1982).** Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-1311.
- Brown, D. R. (1999a).** Comment on: Neurotoxicity of prion peptide 106-126 not confirmed by Beat Kunz, Erika Sandmeier, Philipp Christen, FEBS letters 458 (1999) 65-68. *FEBS Lett* **460**, 559-560; discussion 561.
- Brown, D. R. (1999b).** Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem* **73**, 1105-1113.
- Brown, D. R., Besinger, A., Herms, J. W. & Kretzschmar, H. A. (1998a).** Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* **9**, 1425-1429.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. & Kretzschmar, H. (1997).** The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.
- Brown, D. R., Schmidt, B., Groschup, M. H. & Kretzschmar, H. A. (1998b).** Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* **75**, 29-37.
- Brown, D. R., Schmidt, B. & Kretzschmar, H. A. (1998c).** Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem* **70**, 1686-1693.
- Brown, K. L., Stewart, K., Ritchie, D. L., Mabbott, N. A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W. I. & Bruce, M. E. (1999).** Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1308-1312.
- Brown, P., McShane, L. M., Zanusso, G. & Detwile, L. (2006).** On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis* **12**, 1816-1821.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997).** Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992).** Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582.
- Burger, D. & Hartsough, G. R. (1965).** Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis* **115**, 393-399.
- Buschmann, A., Gretzschel, A., Biacabe, A. G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C. & Groschup, M. H. (2006).** Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* **117**, 103-116.
- Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Catania, M., Rossi, G., Di Fede, G., Giaccone, G., Bruzzone, M. G., Minati, L., Corona, C., Acutis, P., Gelmetti, D., Lombardi, G., Groschup, M. H.,**

- Buschmann, A., Zanusso, G., Monaco, S., Caramelli, M. & Tagliavini, F. (2007).** Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog* **3**, e31.
- 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., Raymond, G. J. & Bessen, R. A. (1998).** Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**, 32230-32235.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. & Caughey, W. S. (1991).** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-7680.
- Clawson, M. L., Richt, J. A., Baron, T., Biacabe, A. G., Czub, S., Heaton, M. P., Smith, T. P. & Laegreid, W. W. (2008).** Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE. *PLoS One* **3**, e1830.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. & Prusiner, S. B. (1994).** Structural clues to prion replication. *Science* **264**, 530-531.
- Collinge, J., Beck, J., Campbell, T., Estibeiro, K. & Will, R. G. (1996a).** Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **348**, 56.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. (1996b).** Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-690.
- Comoy, E. E., Casalone, C., Lescoutra-Etcheagaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marce, D., Auvre, F., Ruchoux, M. M., Ferrari, S., Monaco, S., Sales, N., Caramelli, M., Leboulch, P., Brown, P., Lasmezas, C. I. & Deslys, J. P. (2008).** Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS One* **3**, e3017.
- Cooke, J., (ed) (1998).** *The French catastrophe. In: Cooke, J. (ed.). Cannibals, cows and the CJD catastrophe.* Sydney, Australia: Random House.
- Creutzfeldt, H. G. (1920).** Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatr* **57**, 1-18.
- Cutlip, R. C., Miller, J. M., Hamir, A. N., Peters, J., Robinson, M. M., Jenny, A. L., Lehmkuhl, H. D., Taylor, W. D. & Bisplinghoff, F. D. (2001).** Resistance of cattle to scrapie by the oral route. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **65**, 131-132.
- Delasnerie-Laupretre, N., Poser, S., Pocchiari, M., Wientjens, D. P. & Will, R. (1995).** Creutzfeldt-Jakob disease in Europe. *Lancet* **346**, 898.
- Diack, A. B., Head, M. W., McCutcheon, S., Boyle, A., Knight, R., Ironside, J. W., Manson, J. C. & Will, R. G. (2014).** Variant CJD. 18 years of research and surveillance. *Prion* **8**, 286-295.
- Dickinson, A. G. & Outram, G. W. (1988).** Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* **135**, 63-83.
- Diringer, H., Beekes, M. & Oberdieck, U. (1994).** The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci* **724**, 246-258.
- Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C. & Anderson, R. M. (2002).** Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc Biol Sci* **269**, 2179-2190.
- Eddy, R. G. (1995).** Origin of BSE. *The Veterinary record* **137**, 648.

- Faris, R., Moore, R. A., Ward, A., Race, B., Dorward, D. W., Hollister, J. R., Fischer, E. R. & Priola, S. A. (2017). Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci Rep* 7, 41556.
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S. & Grassi, J. (2005). Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280, 11247-11258.
- Fraser, H., Bruce, M. E., Chree, A., McConnell, I. & Wells, G. A. (1992). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* 73 ( Pt 8), 1891-1897.
- Fukuda, S., Onoe, S., Nikaido, S., Fujii, K., Kageyama, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Yoshioka, M., Murayama, Y., Mohri, S., Yokoyama, T. & Okada, H. (2012). Neuroanatomical distribution of disease-associated prion protein in experimental bovine spongiform encephalopathy in cattle after intracerebral inoculation. *Japanese journal of infectious diseases* 65, 37-44.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. & Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.
- Gajdusek, D. C. & Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257, 974-978.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388-389.
- Gonzalez, L., Martin, S., Siso, S., Konold, T., Ortiz-Pelaez, A., Phelan, L., Goldmann, W., Stewart, P., Saunders, G., Windl, O., Jeffrey, M., Hawkins, S. A., Dawson, M. & Hope, J. (2009). High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of PRNP genotype and age. *Vet Res* 40, 65.
- Greenlee, J. J., Smith, J. D., West Greenlee, M. H. & Nicholson, E. M. (2012). Clinical and pathologic features of H-type bovine spongiform encephalopathy associated with E211K prion protein polymorphism. *PLoS One* 7, e38678.
- Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., Erhardt, G. & Groschup, M. H. (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health* 52, 55-63.
- Hardt, M., Baron, T. & Groschup, M. H. (2000). A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122, 43-53.
- Harmeyer, S., Pfaff, E. & Groschup, M. H. (1998). Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol* 79 ( Pt 4), 937-945.
- Harris, D. A., Falls, D. L., Johnson, F. A. & Fischbach, G. D. (1991). A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7664-7668.
- Hartsough, G. R. & Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 115, 387-392.
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Lingappa, V. R. (1998). A

- transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827-834.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997a). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-450, 526.
- Hill, A. F., Will, R. G., Ironside, J. & Collinge, J. (1997b). Type of prion protein in UK farmers with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **350**, 188.
- Hoffmann, C., Eiden, M., Kaatz, M., Keller, M., Ziegler, U., Rogers, R., Hills, B., Balkema-Buschmann, A., van Keulen, L., Jacobs, J. G. & Groschup, M. H. (2011). BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res* **42**, 21.
- Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B. & Groschup, M. H. (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **88**, 1048-1055.
- Hope, J., Wood, S. C., Birkett, C. R., Chong, A., Bruce, M. E., Cairns, D., Goldmann, W., Hunter, N. & Bostock, C. J. (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol* **80** ( Pt 1), 1-4.
- Hope, J., Wood, S. C., Birkett, C. R., Chong, A., Bruce, M. E., Cairns, D., Goldmann, W., Hunter, N. & Bostock, C. J. (2000). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol* **81** Pt 3, 851.
- Hornlimann, B., Guidon, D. & Griot, C. (1994). [Risk assessment for importing bovine spongiform encephalopathy (BSE)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **101**, 295-298.
- Hunter, G. D. & Millson, G. C. (1964). Studies on the Heat Stability and Chromatographic Behaviour of the Scrapie Agent. *J Gen Microbiol* **37**, 251-258.
- Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Masujin, K., Shimizu, Y., Shu, Y., Kurachi, M., Kasai, K., Murayama, Y., Fukuda, S., Onoe, S., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Sata, T., Mohri, S., Okada, H. & Yokoyama, T. (2010). Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. *Emerg Infect Dis* **16**, 1151-1154.
- Jacobs, J. G., Langeveld, J. P., Biacabe, A. G., Acutis, P. L., Polak, M. P., Gavier-Widen, D., Buschmann, A., Caramelli, M., Casalone, C., Mazza, M., Groschup, M., Erkens, J. H., Davidse, A., van Zijderveld, F. G. & Baron, T. (2007). Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol* **45**, 1821-1829.
- Jacobs, J. G., Sauer, M., van Keulen, L. J., Tang, Y., Bossers, A. & Langeveld, J. P. (2011). Differentiation of ruminant transmissible spongiform encephalopathy isolate types, including bovine spongiform encephalopathy and CH1641 scrapie. *J Gen Virol* **92**, 222-232.
- Jakob, A. M. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose - Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Z Nervenheilk* **70**, 132-146.
- Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058.

- Jeffrey, M. & Gonzalez, L. (2004).** Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Current topics in microbiology and immunology* **284**, 65-97.
- Kaatz, M., Fast, C., Ziegler, U., Balkema-Buschmann, A., Hammerschmidt, B., Keller, M., Oelschlegel, A., McIntyre, L. & Groschup, M. H. (2012).** Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *Am J Pathol* **181**, 515-524.
- Kirkwood, J. K. & Cunningham, A. A. (1994).** Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *The Veterinary record* **135**, 296-303.
- Kong, Q., Zheng, M., Casalone, C., Qing, L., Huang, S., Chakraborty, B., Wang, P., Chen, F., Cali, I., Corona, C., Martucci, F., Iulini, B., Acutis, P., Wang, L., Liang, J., Wang, M., Li, X., Monaco, S., Zanusso, G., Zou, W. Q., Caramelli, M. & Gambetti, P. (2008).** Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virol* **82**, 3697-3701.
- Konold, T., Bone, G. E., Clifford, D., Chaplin, M. J., Cawthraw, S., Stack, M. J. & Simmons, M. M. (2012).** Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Vet Res* **8**, 22.
- Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M. J., Stack, M. J., Hawkins, S. A., Wilesmith, J. W. & Wells, G. A. (2013).** Unsuccessful oral transmission of scrapie from British sheep to cattle. *The Veterinary record* **173**, 118.
- Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. & Bodemer, W. (1996).** Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP<sup>0/0</sup> mice. *Mol Med* **2**, 725-734.
- Krasemann, S., Jurgens, T. & Bodemer, W. (1999).** Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *Journal of biotechnology* **73**, 119-129.
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. & DeArmond, S. J. (1986).** Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**, 1-5.
- Kuczius, T., Haist, I. & Groschup, M. H. (1998).** Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J Infect Dis* **178**, 693-699.
- Lasmez, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996).** BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-744.
- Lee, Y. H., Sohn, H. J., Kim, M. J., Kim, H. J., Lee, W. Y., Yun, E. I., Tark, D. S., Cho, I. S. & Balachandran, A. (2013).** Strain characterization of the Korean CWD cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci* **75**, 95-98.
- Leggett, M. M., Dukes, J. & Pirie, H. M. (1990).** A spongiform encephalopathy in a cat. *The Veterinary record* **127**, 586-588.
- Levavasseur, E., Laffont-Proust, I., Morain, E., Faucheux, B. A., Privat, N., Peoc'h, K., Sazdovitch, V., Brandel, J. P., Hauw, J. J. & Haik, S. (2008).** Regulating factors of PrP glycosylation in Creutzfeldt-Jakob disease--implications for the dissemination and the diagnosis of human prion strains. *PLoS One* **3**, e2786.
- Lombardi, G., Casalone, C., A, D. A., Gelmetti, D., Torcoli, G., Barbieri, I., Corona, C., Fasoli, E., Farinazzo, A., Fiorini, M., Gelati, M., Iulini, B., Tagliavini, F., Ferrari, S., Caramelli, M., Monaco, S., Capucci, L. & Zanusso, G. (2008).** Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog* **4**, e1000075.

- Manson, J. C., Clarke, A. R., McBride, P. A., McConnell, I. & Hope, J. (1994).** PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* **3**, 331-340.
- Marsh, R. F. (1974).** Slow virus diseases of the central nervous system. *Adv Vet Sci Comp Med* **18**, 155-178.
- Martin-Lannere, S., Halliez, S., Hirsch, T. Z., Hernandez-Rapp, J., Passet, B., Tomkiewicz, C., Villa-Diaz, A., Torres, J. M., Launay, J. M., Beringue, V., Vilotte, J. L. & Mouillet-Richard, S. (2016).** The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells* **35**, 754-765.
- Masujin, K., Orru, C. D., Miyazawa, K., Groveman, B. R., Raymond, L. D., Hughson, A. G. & Caughey, B. (2016).** Detection of Atypical H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy and Discrimination of Bovine Prion Strains by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol* **54**, 676-686.
- McGowan, J. (1922).** Scrapie in sheep. *Scott J Agric* **5**, 365-375.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. (1983).** A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62.
- McKinley, M. P., Braunfeld, M. B., Bellinger, C. G. & Prusiner, S. B. (1986).** Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect Dis* **154**, 110-120.
- Meloni, D., Davidse, A., Langeveld, J. P., Varello, K., Casalone, C., Corona, C., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Ingravalle, F. & Bozzetta, E. (2012).** EU-approved rapid tests for bovine spongiform encephalopathy detect atypical forms: a study for their sensitivities. *PLoS One* **7**, e43133.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. & Iqbal, K. (1981).** Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**, 63-74.
- Miller, J. M., Jenny, A. L., Taylor, W. D., Marsh, R. F., Rubenstein, R. & Race, R. E. (1993).** Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **5**, 309-316.
- Morel, E., Fouquet, S., Chateau, D., Yvernault, L., Frobert, Y., Pincon-Raymond, M., Chambaz, J., Pillot, T. & Rousset, M. (2004).** The cellular prion protein PrP<sup>c</sup> is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J Biol Chem* **279**, 1499-1505.
- Nicholson, E. M., Brunelle, B. W., Richt, J. A., Kehrli, M. E., Jr. & Greenlee, J. J. (2008).** Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE. *PLoS One* **3**, e2912.
- Nickel, S., Seiferle (2004).** *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV*. Stuttgart, Germany: PAREY Verlag.
- O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Besser, T. E., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Wells, G. A., Ryder, S. J., Parish, S. M., Hamir, A. N., Cockett, N. E., Jenny, A. & Knowles, D. P. (2000).** Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* **38**, 3254-3259.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. & et al. (1985).** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-746.
- Okada, H., Iwamaru, Y., Fukuda, S., Yokoyama, T. & Mohri, S. (2012a).** Detection of disease-associated prion protein in the optic nerve and the adrenal gland of cattle with bovine spongiform encephalopathy by using highly sensitive

- immunolabeling procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **60**, 290-300.
- Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Mohri, S., Yokoyama, T. & Czup, S. (2011).** Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. *Vet Res* **42**, 79.
- Okada, H., Iwamaru, Y., Kakizaki, M., Masujin, K., Imamura, M., Fukuda, S., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Mohri, S. & Yokoyama, T. (2012b).** Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraspecies passages. *Vet Pathol* **49**, 819-823.
- Okada, H., Iwamaru, Y., Yokoyama, T. & Mohri, S. (2013).** Immunohistochemical detection of disease-associated prion protein in the peripheral nervous system in experimental H-type bovine spongiform encephalopathy. *Vet Pathol* **50**, 659-663.
- Orgel, L. E. (1996).** Prion replication and secondary nucleation. *Chem Biol* **3**, 413-414.
- Paisley, L. G. & Hostrup-Pedersen, J. (2004).** A quantitative assessment of the risk of transmission of bovine spongiform encephalopathy by tallow-based calf milk-replacer. *Prev Vet Med* **63**, 135-149.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & et al. (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.
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B. & Gambetti, P. (1996).** Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of neurology* **39**, 767-778.
- Parchi, P., Strammiello, R., Notari, S., Giese, A., Langeveld, J. P., Ladogana, A., Zerr, I., Roncaroli, F., Cras, P., Ghetti, B., Pocchiari, M., Kretzschmar, H. & Capellari, S. (2009).** Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta neuropathologica* **118**, 659-671.
- Pearson, G. R., Gruffydd-Jones, T. J., Wyatt, J. M., Hope, J., Chong, A., Scott, A. C., Dawson, M. & Wells, G. A. (1991).** Feline spongiform encephalopathy. *The Veterinary record* **128**, 532.
- Polak, M. P. & Zmudzinski, J. F. (2012).** Distribution of a pathological form of prion protein in the brainstem and cerebellum in classical and atypical cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J* **191**, 128-130.
- Priemer, G., Balkema-Buschmann, A., Hills, B. & Groschup, M. H. (2013).** Biochemical Characteristics and PrP(Sc) Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. *PLoS One* **8**, e67599.
- Prusiner, S. B. (1982).** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991).** Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-1522.
- Prusiner, S. B. (1998).** Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-13383.
- Ramljak, S., Herlyn, H. & Zerr, I. (2017).** Cellular Prion Protein (PrPc) and Hypoxia: True to Each Other in Good Times and in Bad, in Sickness, and in Health. *Front Cell Neurosci* **10**, 292.
- Richt, J. A. & Hall, S. M. (2008).** BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog* **4**, e1000156.

- Richt, J. A., Kasinathan, P., Hamir, A. N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J. M. & Kuroiwa, Y. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* **25**, 132-138.
- Rigter, A., Langeveld, J. P., Timmers-Parohi, D., Jacobs, J. G., Moonen, P. L. & Bossers, A. (2007). Mapping of possible prion protein self-interaction domains using peptide arrays. *BMC biochemistry* **8**, 6.
- Ritchie, D. L., Boyle, A., McConnell, I., Head, M. W., Ironside, J. W. & Bruce, M. E. (2009). Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. *J Gen Virol* **90**, 3075-3082.
- Romeis, B., (ed) (1989). *Mikroskopische Technik*. München: Verlag Urban und Schwarzenberg.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **268**, 20276-20284.
- Schreuder, B. E., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. & Straub, O. C. (1997). Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union. *The Veterinary record* **141**, 187-190.
- Siso, S., Jeffrey, M. & Gonzalez, L. (2009a). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**, 232-246.
- Siso, S., Jeffrey, M., Martin, S., Houston, F., Hunter, N. & Gonzalez, L. (2009b). Pathogenetical significance of porencephalic lesions associated with intracerebral inoculation of sheep with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**, 247-258.
- Smith, P. G. & Bradley, R. (2003). Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *Br Med Bull* **66**, 185-198.
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Choi, K. S., Nah, J. J., Joo, Y. S., Jean, Y. H., Ahn, S. W., Kim, O. K., Kim, D. Y. & Balachandran, A. (2002). A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. *J Vet Med Sci* **64**, 855-858.
- Spraker, T. R., Miller, M. W., Williams, E. S., Getzy, D. M., Adrian, W. J., Schoonveld, G. G., Spowart, R. A., O'Rourke, K. I., Miller, J. M. & Merz, P. A. (1997). Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in northcentral Colorado. *J Wildl Dis* **33**, 1-6.
- Spraker, T. R., O'Rourke, K. I., Balachandran, A., Zink, R. R., Cummings, B. A., Miller, M. W. & Powers, B. E. (2002). Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **14**, 3-7.
- Stack, M. J., Aldrich, A. M., Kitching, A. D. & Scott, A. C. (1995). Comparative study of electron microscopical techniques for the detection of scrapie-associated fibrils. *Res Vet Sci* **59**, 247-254.
- Suardi, S., Vimercati, C., Casalone, C., Gelmetti, D., Corona, C., Iulini, B., Mazza, M., Lombardi, G., Moda, F., Ruggerone, M., Campagnani, I., Piccoli, E., Catania, M., Groschup, M. H., Balkema-Buschmann, A., Caramelli, M., Monaco, S., Zanusso, G. & Tagliavini, F. (2012). Infectivity in skeletal muscle of cattle with atypical bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One* **7**, e31449.

- Sweeney, T., Kuczius, T., McElroy, M., Parada, M. G. & Groschup, M. H. (2000).** Molecular analysis of Irish sheep scrapie cases. *J Gen Virol* **81**, 2121.
- Taylor, D. M., Woodgate, S. L. & Atkinson, M. J. (1995).** Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *The Veterinary record* **137**, 605-610.
- Taylor, D. M., Woodgate, S. L., Fleetwood, A. J. & Cawthorne, R. J. (1997).** Effect of rendering procedures on the scrapie agent. *The Veterinary record* **141**, 643-649.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1995).** Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. & Manson, J. C. (1996).** Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642.
- Torres, J. M., Andreoletti, O., Lacroux, C., Prieto, I., Lorenzo, P., Larska, M., Baron, T. & Espinosa, J. C. (2011).** Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerg Infect Dis* **17**, 1636-1644.
- Urrea, L., Segura-Feliu, M., Masuda-Suzukake, M., Hervera, A., Pedraz, L., Aznar, J. M., Vila, M., Samitier, J., Torrents, E., Ferrer, I., Gavin, R., Hagesawa, M. & Del Rio, J. A. (2017).** Involvement of Cellular Prion Protein in alpha-Synuclein Transport in Neurons. *Mol Neurobiol*.
- Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J. & Collinge, J. (2001).** Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**, 171-180.
- Wells, G. A., Hancock, R. D., Cooley, W. A., Richards, M. S., Higgins, R. J. & David, G. P. (1989).** Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *The Veterinary record* **125**, 521-524.
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. & Bradley, R. (1987).** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *The Veterinary record* **121**, 419-420.
- Wells, G. A., Spiropoulos, J., Hawkins, S. A. & Ryder, S. J. (2005).** Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *The Veterinary record* **156**, 401-407.
- Westergard, L., Christensen, H. M. & Harris, D. A. (2007).** The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 629-644.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. & Atkinson, M. J. (1991).** Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The Veterinary record* **128**, 199-203.
- Wilesmith, J. W. & Wells, G. A. (1991).** Bovine spongiform encephalopathy. *Current topics in microbiology and immunology* **172**, 21-38.
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P. & Ryan, J. B. (1988).** Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary record* **123**, 638-644.

- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & Smith, P. G. (1996).** A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.
- Will, R. G. & Kimberlin, R. H. (1998).** Creutzfeldt-Jakob disease and the risk from blood or blood products. *Vox Sang* **75**, 178-180.
- Williams, E. S. & Young, S. (1980).** Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**, 89-98.
- Wood, J. L. & Done, S. H. (1992).** Natural scrapie in goats: neuropathology. *The Veterinary record* **131**, 93-96.
- Wood, J. L., Lund, L. J. & Done, S. H. (1992a).** The natural occurrence of scrapie in moufflon. *The Veterinary record* **130**, 25-27.
- Wood, J. N., Done, S. H., Pritchard, G. C. & Wooldridge, M. J. (1992b).** Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs. *The Veterinary record* **131**, 66-68.
- Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T. N., Gruffydd-Jones, T. J., Wells, G. A. & Wilesmith, J. W. (1991).** Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *The Veterinary record* **129**, 233-236.
- Zlotnik, I. & Rennie, J. C. (1967).** The effect of heat on the scrapie agent in mouse brain. *Br J Exp Pathol* **48**, 171-179.

## 9. ANHANG

### 9.1. Material

#### 9.1.1. Tiergut klassische BSE

**Tab. 7:** Übersicht über die oral mit klassischer BSE infizierten Rinder als Vergleichsgruppe aus der BSE-Pathogenitätsstudie (Hoffmann *et al.*, 2007)

orale C-BSE	IT09	IT22	IT38	IT49
<i>mpi</i>	32	44	44	36
<b>GEHIRNREGION:</b>				
<b>Kleinhirn</b>	+	+	+	+
<b>Mittelhirn</b>	++	++	++	++
<b>kraniale Medulla</b>	+	++	++	++
<b>kaudale Medulla</b>	++	+	++	++
<b>Rhinencephalon</b>	-	+	+	+
<b>frontaler Cortex</b>	+	+	-	-
<b>parietaler Cortex</b>	-	-	-	-
<b>okzipitaler Cortex</b>	-	-	-	-
<b>Basalkerne</b>	+	+	-	++
<b>Thalamus</b>	-	+	+	++
<b>Klinischer Status</b>	0-1	3	2	3
<b>Immunhistochemie</b>	++	+++	++	+++

### 9.1.2. Antikörper gegen das Prion-Protein (PrP)

**Tab. 8:** Übersicht über die im Western Blot und in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper

Antikörper	Epitop	Tierart	Verdünnung	Lieferant	Literatur
Western Blot					
<b>L42</b> , monoklonal	145-163	Rind, Schaf, Mensch	1:2.000	R-Biopharm AG, Darmstadt	(Harmeyer <i>et al.</i> , 1998; Hardt <i>et al.</i> , 2000)
Immunhistochemie					
<b>L42</b> , monoklonal	145-163	Rind, Schaf, Mensch	1:250	FLI, Insel Riems	(Hardt <i>et al.</i> , 2000; Hoffmann <i>et al.</i> , 2011)
<b>6C2</b> , monoklonal	114-120	Rind, Schaf	1:25-1:50 Chargen- abhängig	J. Langeveld, Central Veterinary Institute CIDC- Lelystad Wageningen, Niederlande	(Rigter <i>et al.</i> , 2007; Hoffmann <i>et al.</i> , 2011)
<b>F99/97.6.1</b> , monoklonal	217-231	Rind, Schaf, Wildwiederkä- uer	1:10.000	VMRD, Inc.; Pullman, WA, USA	(Spraker <i>et al.</i> , 2002; Hoffmann <i>et al.</i> , 2011)
<b>12F10</b> , monoklonal	144-152	Rind, Schaf, Mensch	1:1.000	J. Grassi, CEA, Gif sur Yvette, Frankreich	(Krasemann <i>et al.</i> , 1996; Krasemann <i>et al.</i> , 1999; Feraudet <i>et al.</i> , 2005)

### 9.1.3. Konjugate

#### Konjugate für die Untersuchungen im Western Blot:

- Ziege-Anti-Maus IgG, spezifisch für die H- und L-Ketten, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt (115-035-062, Dianova, Hamburg; Verdünnung 1:2.000);
- Precision Protein™ StrepTactin AP-Konjugat (Fa. Bio-Rad, München; Verdünnung 1:5.000), zur Detektion des mit einem Strep-Tag versehenen Precision Plus Protein™ Dual Color Marker

#### Konjugate für die Untersuchungen in der Immunhistochemie:

- EnVision™-System-HorseRadish Peroxidase Labelled Polymer Anti-rabbit (Meerrettichperoxidase-markiertes Polymer, konjugiert mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper; Fa. Dako, Hamburg)

#### 9.1.4. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

##### A

Acrylamid-Stammlösung (30%ig) mit Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure (98–100%ig)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt

##### B

Bromphenolblau	Riedel de Hën, Sigma-Aldrich Steinheim
----------------	---

##### C

CDP-Star	Tropix, Perkin Elmer, Foster City, USA
----------	--

##### D

Desoxycholat (DOC)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	AppliChem, Darmstadt

##### E

Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, (100%ig), p.a. (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe

##### F

Formalin (37%ig)	Roth, Karlsruhe
------------------	-----------------

##### H

Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
-------------	------------------

##### I

Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol p.a. (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe

**K**

Kalium-Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung, isotonisch (0,9%-ig)	Braun, Melsungen

**M**

Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Magnesiumchloridhexahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

**N**

Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumiodat	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N-Lauryl-Sarkosin (Sarkosyl)	Sigma, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP-40)	Roche, Mannheim

**P**

Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphorwolframsäure (PTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat, (Tween 20)	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Mannheim

**S**

Salzsäure konz. (37%-ig)	Riedel de Häen, Sigma- Aldrich, Steinheim
Sucrose	Roth, Karlsruhe

**T**

Trinatriumzitatdihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Invitrogen, Karlsruhe

**W**

Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
---	------------------

**X**

Xylol	Roth, Karlsruhe
-------	-----------------

**Z**

Ziegenserum	Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems
Zitronensäuremonohydrat	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim

**9.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Abzugstisch (TAZ 19)	Medite, Burgdorf
Bestecke (Klemmen, Pinzetten, Scheren, u. a.)	Heiland, Hamburg; Lenecke, Schortens
Bijoux-Röhrchen (30 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Blotting-Apparatur Trans-Blot, Semi Dry	Bio-Rad, München
Cover-Plates	Life Science Int. GmbH, Frankfurt/ Main
Dampfsterilisator Varioklav	Thermo Scientific
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig

---

Einbettautomat EG 1140H	Leica, Wetzlar
Einbettkassetten, Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Eindeckautomat CV5030	Leica, Wetzlar
Einwegkanülen (18G, 20G, 23G)	Terumo, Leuven, Belgien
Einwegpetrischalen, quadratisch	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpinzetten	Lenecke, Schortens
Einwegskalpelle Cutfix	Lenecke, Schortens
Gewebeinfiltrationsautomat ASP 300	Leica, Wetzlar
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Glaskasten mit Färbegestell für Histologie	Roth, Karlsruhe
HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA (FLI-B 409), Schnelltestkit	IDEXX, Hoofddorp, Niederlande
Immobilon-P Transfermembran	Millipore, Bedford, USA
Kamera für Lichtmikroskop Zeiss AxioCam HRc	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Lichtmikroskop Axiostar	Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena
Lichtmikroskop Axioskop 2 plus	Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena
Magnetrührer mit Heizung CB162, Stuart	VWR, Darmstadt
Metalleinbettschälchen	Medite, Burgdorf
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise	Tecan Group Ltd., Schweiz
Mikrotomklingen S 35	Produkte für die Medizin AG, Köln
Mini Protean II Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Objektträger (Super Frost, Super Frost Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen normal (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filter (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten (5 ml)	Roth, Karlsruhe
Probenbeutel, Rotilabo (diverse Größen)	Roth, Karlsruhe
Ribolyser-Röhrchen (7 ml)	IDEXX, Hoofddorp, Niederlande
Ribolyser TeSeE Precess 48	Bio-Rad, München
Rotationsmikrotom RM 2145	Leica, Wetzlar
Skalpellklingen	Lenecke, Schortens
Software Quantity One	Bio-Rad, München
Sterilbank (LaminAir 1.8)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage (EW 150-JM)	Kern, Balingen-Frommern
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Trimmmessergriff und -klingen	Medite, Burgdorf
Versa Doc 5000, Imaging System	Bio-Rad, München
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wägeschalen	Merck, Darmstadt
Wärmeschrank (T6030)	Heraeus, Hanau
Wasserbad HI 1210	Leica, Wetzlar
Whatman-Chromatographiepapier	Whatman, Maldstone, England

## 9.2. Methoden

### 9.2.1. Verwendete Puffer und Lösungen, Rezepturen

Alle Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, mit A. bidest angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Der pH-Wert der Puffer und Lösungen wurde mit Salzsäure (rauchend, 37%ig) eingestellt.

**APS-Lösung (10%ig)**

Ammoniumpersulfat	1 g
A. bidest.	10 ml

**Assay Puffer (10x, pH 9,8)**

Tris	24,2 g
MgCl <sub>2</sub>	2,03 g
A. bidest.	ad 1 l

**Blotting Puffer**

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
SDS	2 g
A. bidest.	ad 1 l

**Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0; Immunhistochemie)**

Trinatriumzitat-dihydrat	2,94 g
A. bidest.	ad 1 l

**CVL-Probenpuffer (10x, pH 6,8)**

SDS	2 g
Tris/HCl-Lösung (1 M, pH 7,4)	5 ml
Mercaptoethanol	5 ml
Sucrose	3 g
1%ige Bromphenolblau-Lösung	5 Tropfen
A. bidest.	ad 20 ml

**DAB-Lösung**

Diaminobenzidintetrahydrochlorid	100 mg
----------------------------------	--------

Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)	ad 200 ml
-------------------------------------	-----------

Vor Gebrauch filtrieren.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (kurz vor Gebrauch zufügen)	70 µl
---	-------

### Eosin

Eosin G	10 g
---------	------

Eisessig	10 Tropfen
----------	------------

Ethanol (50 % v/v)	ad 1 l
--------------------	--------

### E-Puffer (10x)

Tris	150 g
------	-------

Glycin	720 g
--------	-------

SDS	50 g
-----	------

A. bidest.	ad 5 l
------------	--------

Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt

### Formalin (4%ig, neutral gepuffert)

A. bidest.	900 ml
------------	--------

Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	4 g
-------------------------------------	-----

Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	8,15 g
---------------------------------------	--------

komplett mit Magnetrührstäbchen lösen

37%iges Formalin	100 ml
------------------	--------

### Hämatoxylin-Lösung

Hämatoxylin	1 g
-------------	-----

A. bidest.	ad 1 l
------------	--------

vollständig lösen

Natrium-Iodat	0,2 g
---------------	-------

Kalium-Aluminiumsulfat	50 g
------------------------	------

dazugeben und vollständig lösen

Chloralhydrat 50 g

Zitronensäure-Monohydrat 50 g

Mindestens 4 Wochen reifen lassen. Vor Gebrauch mittels Faltenfilter filtrieren.

**Imidazol/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,1)**

Imidazol 1,36 g

A. bidest. ad 200 ml

**Laufpuffer für Trenngel (SDS-PAGE)**

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 48 ml

10%iges SDS 2 ml

**Magermilch (5%ig)**

Magermilchpulver 5 g

PBS-Tween ad 100 ml

**Methanol mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 %ig 20 ml

Methanol 180 ml

**Natriumazidlösung (10%ig)**

Natriumazid 0,65 g

A. bidest ad 100 ml

**Natronlauge (2 M)**

Natriumhydroxid 80 g

A. bidest. ad 1 l

**PBS (10x)**

Natriumchlorid 400 g

Kaliumchlorid 10 g

Kaliumdihydrogenphosphat	10 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	57,5 g
A. bidest.	ad 5 l

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

#### **PBS mit 4% Sarkosyl (pH 7,4)**

Sarkosyl	10 g
PBS	ad 250 ml

#### **PBS-Tween**

Tween 20	1 ml
PBS	ad 1 l

#### **Pefabloc (0,1 M)**

Pefabloc SC	100 mg
A. bidest.	ad 4,17 ml

Lagerung bei -20 °C.

#### **PK-Gebrauchslösung (Histologie, 4 µg/ml PK)**

PK-Stammlösung	760 µl
PK-Puffer (1x)	190 ml

#### **PK-Puffer (10x, pH 8,3)**

Tris	60,56 g
EDTA	2,92 g
Tween 20	10 ml
A. bidest.	ad 1 l

Mit A. bidest. wurde auf 1x Konzentration verdünnt. Lagerung bei 4-8 °C.

#### **PK-Stammlösung (1 mg/ml)**

Proteinase K	100 mg
--------------	--------

A. bidest. 100 ml

Lagerung bei -20 °C.

### **Sammelgelpuffer für Trenngele (SDS-PAGE)**

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 48 ml

10%iges SDS 2 ml

### **SDS-Lösung (10%ig)**

SDS 1 g

A. bidest. ad 10 ml

### **Sucrose-DOC-&P40-Lysis-Puffer**

Sucrose 10,95 g

NP40 0,5 ml

DOC 0,5 g

A. bidest. ad 100 ml

### **TBS (10x, pH 7,6)**

Tris 60,57 g

Natriumchlorid 80 g

A. bidest. ad 1 l

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

### **TBS mit 10% Ziegen Serum und 0,03% Natriumazid**

Ziegen Serum  
(hitzeinaktiviert 3 h, 56 °C Wasserbad) 10 ml

Natriumazid (30%ig) 300 µl

1x TBS ad 100 ml

Lagerung bei 4-8 °C.

**Tris-Puffer**

Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8

Tris 60,57 g

A. bidest. ad 1 l

Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris 181,71 g

A. bidest. ad 1 l

## 9.2.2. Protokolle biochemischer Methoden

### 9.2.2.1. Kurzprotokoll des IDEXX HerdChek® BSE-Scrapie Antigen EIA gemäß Herstellerangaben (Auszug aus der Gebrauchsinformation 06-08519-03, Version #03, S. 34)

Testverfahren		Kurzprotokoll
Schritt	Temperatur – alle Inkubationen	Alle Schritte bei 18°-25°C
1	Probenzugabe in unbeschichtete Mikrotiterplatte zur Probenverdünnung	120 µl Probe mit 30 µl Arbeitslösung des Probenverdünners <b>GUT MISCHEN</b> [...]
2	Probenzugabe in Antigen-Bindungsplatte	*100 µl der verdünnten Probe auf die Antigen-Bindungsplatte pipettieren *Kontrolllösung mischen und 100 µl im Doppelansatz auf Antigenbindungsplatte pipettieren *Mikrotiterplatte abdecken
3	Capture-Platten-Inkubation	45-60 Min., langsam schütteln, 200±100 U/min
4	Mit 1x Waschlösung 1 waschen	Die Vertiefungen 6 Mal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 1 waschen.
5	Zugabe / Inkubation Konditionierungspuffer	100 µl Konditionierungspuffer in jede Vertiefung hinzugeben, die Mikrotiterplatte abdecken und 10±1 Min. inkubieren
6	Mit 1x Waschlösung 2 waschen	Die Vertiefungen 3 Mal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 2 waschen.
7	Konjugatzugabe	100 µl verdünntes Konjugat (bei Rinderhirn [...] CC verwenden [...]) und Mikrotiterplatte abdecken
8	Konjugatinkubation	45-50 Min.
9	Mit 1x Waschlösung 2 waschen	Die Vertiefungen 5 Mal mit ~350 µl 1x-Waschlösung 2 waschen.
10	Substratzugabe	100 µl Substart in jede Vertiefung hinzugeben, Mikrotiterplatte abdecken, 15±1 Min. lang inkubieren (keine Klebeabdeckung verwenden).
11	Zugabe Stopplösung/ Mikrotiterplatte ablesen	100 µl Säurestopplösung hinzugeben, die Mikrotiterplatte kann bis zu 30 Min. im Dunkeln aufbewahrt werden, bevor die optische Dichte (450 nm) abgelesen wird, mit einer Referenzwellenlänge von ( $A_{REF}$ ) 620 nm bis 650 nm.

### 9.2.2.2. Kurzprotokoll der modifizierten PTA-Fällung

- 100 µl Homogenat
- 5 µl PK zugeben, kurz vortexen, anzentrifugieren
- 1 h bei 55°C schütteln
- kurz anzentrifugieren
- 2 µl Pefabloc zugeben, kurz vortexen, anzentrifugieren

- 5 min bei 95°C schütteln, abkühlen lassen
- kurz anzentrifugieren
- 100 µl PBS-Sarkosyl und 16 µl PTA zugeben, kurz vortexen, anzentrifugieren
- 1 h bei 37°C schütteln
- 30 min bei 13.300 rpm (U/min) zentrifugieren
- Überstand abnehmen durch Abpipettieren und verwerfen
- Pellet in 20 µl 2xCVL aufnehmen
- auf das Gel auftragen bzw. bei -20°C einfrieren

### 9.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gele

Trenngele, 12,5%ig (zwei Gele)		Taschengele, 4%ig (zwei Gele)	
Aqua bidest	3,75 ml	Aqua bidest	5,67 ml
Laufpuffer	5,0 ml	Sammelgelpuffer	3,0 ml
30%iges Bis-Acrylamid	6,25 ml	30%iges Bis-Acrylamid	1,33 ml
APS	120 µl	APS	80 µl
TEMED	30 µl	TEMED	20 µl

### 9.2.2.4. Western Blot- SemiDry-Blotting Apparatur: 15 V, 0,3 A pro Blot, 45 min

- PVDF-Membran in Blottingschälchen mit 5%iger Magermilch
- 30 min Inkubation in 5%iger Magermilch bei RT
- Primärantikörper 60-90 min schwenkend inkubieren
- 3x jeweils 10 min waschen mit PBS-Tween
- Sekundärantikörper 60 min schwenkend inkubieren
- 3x jeweils 10 min waschen mit PBS-Tween
- 2x 2 min in 10xAssay-Puffer inkubieren
- 1-1,5 ml CDP-Star auf die PVDF-Membran pipettieren und 5 min inkubieren
- PVDF-Membran einscannen mit dem VersaDoc™: 120 sec

### 9.2.3. Protokolle histologischer Methoden

#### 9.2.3.1. Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica, ASP 300S), Standardprotokoll

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

#### 9.2.3.2. H.-E.- Färbeprotokoll

Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnittpräparate zur Vorbereitung auf die anschließende Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe:

Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Isopropanol 96%ig I	3 min
Isopropanol 96%ig II	3 min
Ethanol 96%ig	2 min
Ethanol 70%ig	2 min

Ethanol 50%ig                      2 min

Hämatoxylin                        10 min

4 x waschen in kaltem Leitungswasser für jeweils 5 min

Eosin                                 3 min

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe:

Ethanol 50%ig                      2 min

Ethanol 70%ig                      2 min

Ethanol 96%ig                      2 min

Isopropanol 96%ig I                2 min

Isopropanol 96%ig II               2 min

Xylol I                                3 min

Xylol II                                3 min

Die Schnittpräparate per Hand mit Entellan® eindeckeln und an der Luft trocknen.

### **9.2.3.3. Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie**

In Abhängigkeit des zu verwendenden Antikörpers wurden die immunhistochemischen Gewebeschnitte verschiedenen Vorbehandlungen zur Demaskierung der Epitope unterzogen.

**Tab. 9:** Übersicht zu Vorbehandlungen von Gewebeschnitten in Abhängigkeit des verwendeten, monoklonalen Prion-Protein-Antikörpers

monoklonaler Antikörper (mAk)	Ameisensäure	Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung	Hitzebehandlung, im Autoklav (121°C, 3 bar)	Puffermedien	Proteinase K-Verdau
<b>L42</b>	15 min	30 min	-	PK-Puffer	15 min / 37°C
<b>12F10</b>	15 min	30 min	-	PK-Puffer	15 min / 37°C
<b>6C2</b>	30 min	30 min	20 min	Citratpuffer	-
<b>F99/97.6.1</b>	30 min	30 min	20 min	Citratpuffer	-

#### 9.2.3.4. Protokolle der Immunhistochemie

Die Entparaffinierung der Schnittpräparate zur Vorbereitung auf die anschließenden Färbungen erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe und wurde wie folgt durchgeführt:

Entparaffinierung und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe:

Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Isopropanol 96%ig I	3 min
Isopropanol 96%ig II	3 min
Ethanol 96%ig	2 min
Ethanol 70%ig	2 min
Ethanol 50%ig	2 min

#### Protokoll I (mAk 12F10, L42)

- 15 min Inkubation in 98-100%iger Ameisensäure
- 5 min unter fließend kaltem Leitungswasser spülen
- 30 min Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) versetztem Methanol
- 3x waschen in TBS-Puffer

- 5 min in PK-Puffer inkubieren
- PK-Verdau: 190 ml PK-Puffer + 760 µl PK → 15 min in 37°C-Wasserbad
- Schnitte in TBS-Küvette überführen
- 3x waschen in TBS

### **Protokoll II (mAk 6C2, F99)**

- 30 min Inkubation in 98-100%iger Ameisensäure
- 5 min unter fließend kaltem Leitungswasser spülen
- 30 min Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) versetztem Methanol
- 3x waschen in TBS-Puffer
- 20 min Dampfautoklavierung bei 121°C und 3 bar in Citratpufferlösung (pH 6,0)
- 3x waschen in TBS-Puffer

### **Zum Antigennachweis wurden bei Protokoll I und II folgende Schritte durchgeführt:**

- Überführen der Schnitte aus der Küvette in ein *Cover-Plate-System*
- Auftragen des Primärantikörpers, Inkubation für 2 Stunden bei RT und anschließend 3x waschen mit TBS
- Auftragen des Sekundärantikörpers, Inkubation 30 min bei RT und anschließend 3x waschen mit TBS
- Überführen der Schnitte in Küvetten
- Färben mit DAB-Lösung (30%ig), 10 min inkubieren und anschließend 3x waschen in TBS

### **Gegenfärbung:**

- kurzes Spülen der Schnitte in A. bidest

- 10 min Färbung in Hämatoxylinlösung und 1x spülen in TBS, anschließend mindestens 15 min unter fließend kaltem Leitungswasser spülen

Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe:

Ethanol 50%ig                      2 min

Ethanol 70%ig                      2 min

Ethanol 96%ig                      2 min

Isopropanol 96%ig I                2 min

Isopropanol 96%ig II               2 min

Xylol I                                 3 min

Xylol II                                 3 min

Die Schnittpräparate wurden per Hand oder mit Hilfe eines Eindeckelautomaten der Fa. Leica mit Entellan eingedeckelt und an der Luft getrocknet.

#### **9.2.3.5. Auswertung von histologisch untersuchten Schnittpräparaten**

Die mikroskopische Auswertung der Schnittpräparate erfolgte zur Vergleichbarkeit mit dem 10er Okular (100fache Vergrößerung) und die Bewertung wurde pro Gesichtsfeld durchgeführt.

**Tab. 10:** Bewertungsschema zur graduellen Einteilung des Ausprägungsgrades histopathologischer Veränderungen (spongiforme Veränderungen des Neuropils und vakuoläre Degenerationen von Neuronen) an H.-E.-Schnittpräparaten.

Anmerkung: Die histopathologischen Veränderungen per se sind nicht spezifisch für eine TSE-Erkrankung.

geringgradig	+	weniger als 5 Vakuolen
mittelgradig	++	5-10 Vakuolen
hochgradig	+++	mehr als 10 Vakuolen

**Tab. 11:** Bewertungsschema zur graduellen Einteilung des Anteils PrP<sup>Sc</sup>-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl der Gewebestruktur für die immunhistochemischen Untersuchungen

geringgradig	+	einzelne positive Zellen, maximal 20% der Gesamtzellzahl
mittelgradig	++	viele positive Zellen, 20 bis maximal 60% der Gesamtzellzahl
hochgradig	+++	(nahezu) alle Zellen positiv, 60 bis 100% der Gesamtzellzahl

### 9.3. Ergebnistabellen

#### 9.3.1. Ergebnisse der TSE-Schnelltestuntersuchung von Gehirnproben mittels IDEXX HerdChek® BSE-Scrapie Antigen EIA (Mittelwerte aus Doppelansatz)

**Tab. 12:** OD-Werte der atypische L-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( $n=6$ )

GEHIRNREGION	ABKÜRZUNG	RA01 (5 mpi)	RA02 (16 mpi)	RA03 (15 mpi)	RA04 (16 mpi)	RA05 (12 mpi)	RA06 (14 mpi)
Kleinhirn	KH	0,057	3,075	3,074	3,074	1,394	3,059
Mittelhirn	MH	0,077	3,041	3,109	3,049	3,033	3,061
kraniale Medulla	CR-MED	0,138	3,013	3,088	3,053	3,002	3,052
kaudale Medulla	CA-MED	0,064	3,012	3,000	3,006	2,301	2,985
Rhinencephalon	RHIN	0,062	3,009	3,088	3,044	1,213	3,037
frontaler Cortex	F-CORT	0,067	2,984	3,036	2,350	1,086	3,067
parietaler Cortex	P-CORT	0,061	3,010	3,054	2,981	0,395	3,065
okzipitaler Cortex	O-CORT	0,063	3,015	3,060	3,015	0,323	2,947
Basalkerne	BASA	0,063	3,028	3,062	3,053	1,724	2,495
Thalamus	THALA	0,074	3,015	3,065	3,047	2,988	3,077

**Tab. 13:** OD-Werte der atypische H-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( $n=5$ )

GEHIRNREGION	ABKÜRZUNG	RA10 (12 mpi)	RA13 (14 mpi)	RA14 (15 mpi)	RA15 (16 mpi)	RA16 (16 mpi)
Kleinhirn	KH	0,488	1,597	1,906	2,547	2,326
Mittelhirn	MH	2,338	2,642	2,825	2,843	2,869
kraniale Medulla	CR-MED	2,625	2,694	2,618	2,741	2,739
kaudale Medulla	CA-MED	0,634	2,629	2,743	2,477	2,385
Rhinencephalon	RHIN	1,600	2,527	2,499	2,604	2,291
frontaler Cortex	F-CORT	0,234	1,452	1,854	2,760	2,448
parietaler Cortex	P-CORT	0,214	1,872	2,031	2,334	1,894
okzipitaler Cortex	O-CORT	0,286	1,938	2,117	1,465	2,215
Basalkerne	BASA	2,259	2,525	2,668	0,716	2,800
Thalamus	THALA	2,570	2,433	2,708	2,770	2,814

**Tab. 14:** OD-Werte der klassischen C-BSE unterschiedlicher Gehirnregionen von Rindern ( $n=4$ ), zusätzlich ein nicht infiziertes, negatives Kontrolltier KT29

GEHIRNREGION	ABKÜRZUNG	IT09 (32 mpi)	IT22 (44 mpi)	IT38 (44 mpi)	IT49 (36 mpi)	KT29
Kleinhirn	KH	2,692	2,454	2,239	3,098	0,058
Mittelhirn	MH	3,126	3,062	3,082	3,103	0,068
kraniale Medulla	CR-MED	1,182	3,055	3,066	3,124	0,072
kaudale Medulla	CA-MED	3,141	3,045	3,056	3,126	0,074
Rhinencephalon	RHIN	0,186	2,921	0,303	2,390	0,067
frontaler Cortex	F-CORT	0,518	2,590	0,174	1,341	0,065
parietaler Cortex	P-CORT	0,500	1,125	0,759	1,595	0,059
okzipitaler Cortex	O-CORT	0,128	0,489	0,135	1,071	0,060
Basalkerne	BASA	1,600	3,012	0,266	2,895	0,071
Thalamus	THALA	2,206	3,043	0,686	2,993	0,067

**Tab. 15:** Mittelwerte der optischen Dichte (OD) innerhalb der jeweiligen BSE-Form sowie der jeweiligen Gehirnregion

GEHIRNREGION	ABKÜRZUNG	C-BSE ( $n=4$ )	L-BSE ( $n=5$ )	H-BSE ( $n=5$ )
Kleinhirn	KH	2,304 ( $\pm 0,58$ )	2,735 ( $\pm 0,75$ )	2,094 ( $\pm 0,82$ )
Mittelhirn	MH	3,093 ( $\pm 0,03$ )	3,059 ( $\pm 0,03$ )	2,794 ( $\pm 0,22$ )
kraniale Medulla	CR-MED	2,607 ( $\pm 0,95$ )	3,041 ( $\pm 0,03$ )	2,698 ( $\pm 0,06$ )
kaudale Medulla	CA-MED	3,092 ( $\pm 0,05$ )	2,861 ( $\pm 0,31$ )	2,559 ( $\pm 0,87$ )
Rhinencephalon	RHIN	1,450 ( $\pm 1,41$ )	2,678 ( $\pm 0,82$ )	2,480 ( $\pm 0,41$ )
frontaler Cortex	F-CORT	1,156 ( $\pm 1,07$ )	2,505 ( $\pm 0,85$ )	2,128 ( $\pm 0,99$ )
parietaler Cortex	P-CORT	0,995 ( $\pm 0,48$ )	2,501 ( $\pm 1,18$ )	2,033 ( $\pm 0,83$ )
okzipitaler Cortex	O-CORT	0,455 ( $\pm 0,44$ )	2,472 ( $\pm 1,20$ )	1,933 ( $\pm 0,79$ )
Basalkerne	BASA	1,943 ( $\pm 1,29$ )	2,672 ( $\pm 0,58$ )	2,177 ( $\pm 0,85$ )
Thalamus	THALA	2,232 ( $\pm 1,10$ )	3,038 ( $\pm 0,04$ )	2,681 ( $\pm 0,16$ )

### 9.3.2. Untersuchungen zu den Erregereigenschaften der drei BSE-Formen L-Typ, H-Typ und C-Typ mittels PTA-WB

#### 9.3.2.1. Glykopprofil

**Tab. 16:** Glykopprofil von L-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit L-BSE infizierten Rindern ( $n=5$ )

Prozentuale Anteile der diglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**di-**), monoglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**mono-**), unglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**un-**) am Gesamtsignal sowie molekulare Masse (MM) der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Bande

L-BSE ( $n=5$ ) Gehirnregion	Anteil am Gesamtsignal (%)			MM (kDa) unglyk. PrP <sup>Sc</sup>
	di-	mono-	un-	
Kleinhirn	41,34 ( $\pm 4,0$ )	36,57 ( $\pm 2,4$ )	22,09 ( $\pm 2,2$ )	17,62 ( $\pm 0,3$ )
Mittelhirn	45,09 ( $\pm 5,5$ )	33,05 ( $\pm 2,7$ )	21,86 ( $\pm 3,9$ )	17,59 ( $\pm 0,2$ )
kraniale Medulla	41,35 ( $\pm 2,0$ )	36,92 ( $\pm 0,9$ )	21,72 ( $\pm 2,3$ )	17,47 ( $\pm 0,4$ )
kaudale Medulla	45,12 ( $\pm 4,5$ )	34,92 ( $\pm 2,4$ )	19,97 ( $\pm 3,4$ )	17,76 ( $\pm 0,2$ )
Rhinencephalon	40,89 ( $\pm 2,2$ )	36,56 ( $\pm 1,0$ )	22,55 ( $\pm 2,7$ )	17,45 ( $\pm 0,3$ )
frontaler Cortex	41,70 ( $\pm 5,4$ )	34,26 ( $\pm 1,9$ )	24,05 ( $\pm 3,7$ )	17,71 ( $\pm 0,2$ )
parietaler Cortex	40,91 ( $\pm 3,0$ )	36,34 ( $\pm 1,0$ )	22,76 ( $\pm 2,5$ )	17,56 ( $\pm 0,1$ )
okzipitaler Cortex	41,87 ( $\pm 2,4$ )	35,68 ( $\pm 1,5$ )	22,45 ( $\pm 2,8$ )	17,53 ( $\pm 0,1$ )
Basalkerne	41,25 ( $\pm 2,0$ )	36,22 ( $\pm 2,2$ )	22,53 ( $\pm 2,7$ )	17,59 ( $\pm 0,1$ )
Thalamus	41,97 ( $\pm 0,7$ )	35,27 ( $\pm 3,0$ )	22,76 ( $\pm 3,0$ )	17,60 ( $\pm 0,3$ )

**Tab. 17:** Glykopprofil von H-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit H-BSE infizierten Rindern ( $n=5$ )

Prozentuale Anteile der diglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**di-**), monoglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**mono-**), unglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**un-**) am Gesamtsignal sowie molekulare Masse (MM) der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Bande

H-BSE ( $n=5$ ) Gehirnregion	Anteil am Gesamtsignal (%)			MM (kDa) unglyk. PrP <sup>Sc</sup>
	di-	mono-	un-	
Kleinhirn	51,54 ( $\pm 4,0$ )	30,59 ( $\pm 1,6$ )	17,88 ( $\pm 4,9$ )	18,57 ( $\pm 0,3$ )
Mittelhirn	54,55 ( $\pm 4,3$ )	28,94 ( $\pm 5,1$ )	16,51 ( $\pm 3,6$ )	18,54 ( $\pm 0,4$ )
kraniale Medulla	53,60 ( $\pm 5,1$ )	29,96 ( $\pm 1,0$ )	16,44 ( $\pm 4,6$ )	18,62 ( $\pm 0,2$ )
kaudale Medulla	55,27 ( $\pm 2,9$ )	30,78 ( $\pm 1,3$ )	13,94 ( $\pm 2,9$ )	18,94 ( $\pm 0,6$ )
Rhinencephalon	53,43 ( $\pm 3,4$ )	30,39 ( $\pm 2,2$ )	16,18 ( $\pm 2,5$ )	18,57 ( $\pm 0,5$ )
frontaler Cortex	57,66 ( $\pm 6,9$ )	26,61 ( $\pm 3,3$ )	15,73 ( $\pm 4,1$ )	19,01 ( $\pm 0,4$ )
parietaler Cortex	57,32 ( $\pm 6,8$ )	27,89 ( $\pm 1,6$ )	14,79 ( $\pm 6,4$ )	18,65 ( $\pm 0,3$ )
okzipitaler Cortex	53,21 ( $\pm 7,0$ )	28,86 ( $\pm 1,2$ )	17,92 ( $\pm 7,0$ )	18,70 ( $\pm 0,3$ )
Basalkerne	55,44 ( $\pm 7,5$ )	28,43 ( $\pm 2,0$ )	16,13 ( $\pm 6,5$ )	18,78 ( $\pm 0,3$ )
Thalamus	54,41 ( $\pm 4,6$ )	28,73 ( $\pm 1,7$ )	16,87 ( $\pm 4,0$ )	18,63 ( $\pm 0,3$ )

**Tab. 18:** Glykopprofil von C-BSE: Mittelwerte aus unterschiedlichen Gehirnregionen von mit C-BSE infizierten Rindern ( $n=4$ )

Prozentuale Anteile der diglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**di-**), monoglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**mono-**), unglykosylierte PrP<sup>Sc</sup>-Bande (**un-**) am Gesamtsignal sowie molekulare Masse (MM) der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Bande

C-BSE Gehirnregion ( $n=4$ )	Anteil am Gesamtsignal (%)			MM (kDa)
	di-	mono-	un-	unglyk. PrP <sup>Sc</sup>
Kleinhirn	61,16 ( $\pm 4,3$ )	28,82 ( $\pm 1,2$ )	10,02 ( $\pm 3,3$ )	17,82 ( $\pm 0,4$ )
Mittelhirn	55,58 ( $\pm 4,7$ )	29,55 ( $\pm 0,9$ )	14,87 ( $\pm 4,0$ )	17,53 ( $\pm 0,5$ )
kraniale Medulla	57,70 ( $\pm 9,5$ )	26,92 ( $\pm 4,9$ )	15,38 ( $\pm 5,0$ )	17,46 ( $\pm 0,5$ )
kaudale Medulla	60,27 ( $\pm 4,9$ )	27,07 ( $\pm 1,6$ )	12,66 ( $\pm 3,6$ )	17,74 ( $\pm 0,8$ )
Rhinencephalon	59,65 ( $\pm 3,6$ )	25,76 ( $\pm 0,6$ )	14,59 ( $\pm 4,2$ )	17,51 ( $\pm 0,7$ )
frontaler Cortex	72,63 ( $\pm 6,3$ )	20,92 ( $\pm 4,9$ )	6,46 ( $\pm 1,4$ )	17,19 ( $\pm 0,5$ )
parietaler Cortex	kein Signal	kein Signal	kein Signal	kein Signal
okzipitaler Cortex	kein Signal	kein Signal	kein Signal	kein Signal
Basalkerne	61,85 ( $\pm 10,7$ )	26,08 ( $\pm 3,0$ )	12,07 ( $\pm 7,7$ )	17,45 ( $\pm 0,2$ )
Thalamus	59,09 ( $\pm 9,8$ )	27,52 ( $\pm 4,9$ )	13,39 ( $\pm 6,0$ )	17,94 ( $\pm 0,4$ )

### 9.3.2.2. Proteinase K-Stabilität

**Tab. 19:** Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber steigender PK-Konzentration: molekulare Masse der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Bande (Mittelwerte aus drei Testläufen)

BSE-Form	PK-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	25	50	250	500	1000
L-BSE	17,33 ( $\pm 0,5$ )	17,27 ( $\pm 0,6$ )	17,33 ( $\pm 0,7$ )	17,44 ( $\pm 1,0$ )	17,47 ( $\pm 1,6$ )
H-BSE	17,66 ( $\pm 0,5$ )	17,50 ( $\pm 0,7$ )	17,36 ( $\pm 0,8$ )	nicht messbar	nicht messbar
C-BSE	17,57 ( $\pm 0,2$ )	17,70 ( $\pm 0,5$ )	17,77 ( $\pm 0,4$ )	17,91 ( $\pm 0,3$ )	17,96 ( $\pm 0,2$ )

**Tab. 20:** Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber steigender PK-Konzentration aus drei Testläufen (prozentuale Anteile am Gesamtsignal)

PK-Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ )	C-BSE			L-BSE			H-BSE		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3
25	97	111	113	101	122	105	61	133	129
50 (Standard)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
250	73	73	82	79	60	60	39	23	35
500	54	68	60	19	8	2	9	1	1
1000	39	61	60	17	3	1	9	1	0

**Tab. 21:** Mittelwerte der prozentualen Anteile am Gesamtsignal je BSE-Form aus drei Testläufen bei steigender PK-Konzentration

PK-Konz. ( $\mu\text{g/ml}$ )	C-BSE	L-BSE	H-BSE
25	106,8 ( $\pm 8,3$ )	109,3 ( $\pm 11,2$ )	107,8 ( $\pm 40,4$ )
50 (Standard)	100	100	100
250	75,8 ( $\pm 5,4$ )	66,4 ( $\pm 10,6$ )	32,2 ( $\pm 8,5$ )
500	60,4 ( $\pm 6,9$ )	9,8 ( $\pm 8,8$ )	3,6 ( $\pm 4,4$ )
1000	53,5 ( $\pm 12,7$ )	7,0 ( $\pm 8,7$ )	3,2 ( $\pm 4,7$ )

**Tab. 22:** Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber Langzeit-PK-Verdau: molekulare Masse der unglykosylierten PrP<sup>Sc</sup>-Bande (Mittelwerte aus drei Testläufen)

BSE-Form	Langzeit-PK-Verdau (PK-Konz. 50 $\mu\text{g/ml}$ )				
	1 h	3h	6h	10h	26h
L-BSE	17,65 ( $\pm 1,1$ )	17,27 ( $\pm 1,3$ )	17,32 ( $\pm 1,3$ )	17,68 ( $\pm 1,3$ )	17,66 ( $\pm 1,4$ )
H-BSE	18,83 ( $\pm 0,7$ )	18,56 ( $\pm 0,6$ )	18,47 ( $\pm 0,4$ )	18,41 ( $\pm 0,2$ )	18,19 ( $\pm 0,4$ )
C-BSE	17,94 ( $\pm 0,5$ )	17,46 ( $\pm 0,8$ )	17,54 ( $\pm 0,9$ )	17,57 ( $\pm 1,0$ )	17,74 ( $\pm 1,0$ )

**Tab. 23:** Stabilität der jeweiligen BSE-Form gegenüber Langzeit-PK-Verdau aus drei Testläufen (prozentuale Anteile am Gesamtsignal):

Zeitpunkt (Std.)	C-BSE			L-BSE			H-BSE		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3
1h (Standard)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3h	81	78	89	76	79	90	73	64	61
6h	94	81	79	57	59	70	50	49	43
10h	70	58	79	51	53	65	23	34	35
26h	36	60	59	34	32	62	38	32	14

**Tab. 24:** Mittelwerte der prozentualen Anteile am Gesamtsignal je BSE-Form aus drei Testläufen im Langzeit-PK-Verdau

Zeitpunkt	C-BSE	L-BSE	H-BSE
1h (Standard)	100	100	100
3h	82,6 ( $\pm 5,7$ )	81,9 ( $\pm 7,4$ )	65,8 ( $\pm 6,2$ )
6h	84,7 ( $\pm 8,0$ )	62,1 ( $\pm 7,2$ )	47,5 ( $\pm 3,8$ )
10h	69,2 ( $\pm 10,8$ )	56,1 ( $\pm 7,4$ )	30,5 ( $\pm 6,6$ )
26h	51,9 ( $\pm 13,4$ )	42,7 ( $\pm 17,1$ )	27,9 ( $\pm 12,8$ )

### 9.3.2.3. Quantifizierung / Signalintensitäten

**Tab. 25:** Intensitäten der PTA-WB-Signale in unterschiedlichen Gehirnregionen im Vergleich klassische zu atypischer L- bzw. H-BSE

Die craniale Medulla wurde als Referenzregion mit 100 % gleichgesetzt.

GEHIRNREGION	ABKÜRZUNG dt. (engl.)	C-BSE (n=4)	L-BSE (n=5)	H-BSE (n=5)
Kleinhirn	KH (CB)	15,7	81,2	26,5
Mittelhirn	MH (MB)	102,0	167,0	152,2
kraniale Medulla	CR-MED (crM)	100,0	100,0	100,0
kaudale Medulla	CA-MED (caM)	47,6	51,9	50,5
Rhinencephalon	RHIN (RH)	7,7	98,7	28,9
frontaler Cortex	F-CORT (FC)	8,6	37,7	29,3
parietaler Cortex	P-CORT (PC)	3,7	58,2	13,1
okzipitaler Cortex	O-CORT (OC)	1,4	78,6	22,2
Basalkerne	BASA (BG)	26,8	135,8	52,4
Thalamus	THALA (TH)	48,5	169,6	134,8

### 9.3.2.4. Immunhistochemie (IHC)

**Tab. 26:** Semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Untersuchung nervaler Gewebe von mit atypischer L- bzw. H-BSE infizierten Rindern

BSE-FORM	NERVEN- GEWEBE	SEKTIONSZEITPUNKT (mpi)				
		5	12	14	15	16
H-BSE (n=5)	Obex	nicht untersucht	+/++	++	++	++/+++
	Rückenmark		+	+/++	++	++
	DRG		(+)	-	((+))	((+))
	Sehnerv		((+))	+	+	+
	TRG		((+))	(+)	(+)	(+)
	N. vagus cervicalis		-	-	+	(+)
	Ggl. stellate		-	-	-	(+)
L-BSE (n=6)	Obex	fraglich	+	+/++	++	++/+++
	Rückenmark	fraglich	+	+/++	++	+/++
	DRG	-	-	((+))	((+))	((+))
	Sehnerv	-	((+))	(+)	(+)	(+)
	TRG	-	-	(+)	-	-
	N. vagus cervicalis	-	-	-	-	((+))
	Ggl. stellate	-	-	-	-	-

DRG = dorsales Wurzelganglion; TRG = Trigeminalganglion; N = Nervus; Ggl. = Ganglion

Zur filigraneren Darstellung von Unterschieden zwischen beiden atypischen BSE-Formen in der Ablagerungsintensität im PNS wurde die semiquantitative graduelle Einteilung des Anteils PrP<sup>Sc</sup>-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl der Gewebestruktur aus Tab.11 von drei auf fünf Bewertungsstufen erweitert:

minimal	((+))	ein bis drei positive Zellen (<1%)
vereinzelt	(+)	1-5% der Gesamtzellzahl
geringgradig	+	einzelne positive Zellen in jedem Gesichtsfeld, maximal 20% der Gesamtzellzahl
mittelgradig	++	viele positive Zellen, 20 bis maximal 60% der Gesamtzellzahl
hochgradig	+++	(nahezu) alle Zellen positiv, 60 bis 100% der Gesamtzellzahl



## **Danksagung**

Ich möchte an dieser Stelle allen meinen herzlichen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dr. h. c. T. C. Mettenleiter danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems.

Bei Prof. Dr. M. H. Groschup möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Anne Balkema-Buschmann für die wissenschaftliche Betreuung, fachlichen Anregungen und Unterstützung sowie die gemeinsame Betreuung der Rinder im BSE-Stall.

Dr. Christine Fast danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und interessanten Diskussionen bei der Anfertigung der Arbeit.

Für die Unterstützung und Zusammenarbeit im TSE-Labor möchte ich mich bei Dan Balkema, Annika Bremke und Ina Römer bedanken.

Ich bedanke mich bei Dr. Mario Ziller und Maya Gussmann von der AG Biomathematik des FLI Riems für die statistische Auswertung meiner Daten.

Weiterhin gilt mein Dank allen beteiligten Mitarbeitern des INNT sowie den Tierpflegern des BSE-Stalls für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Mitwirkung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten. Insbesondere Dr. K. Tauscher möchte ich für die etlichen Stunden und gegenseitige Unterstützung bei der Betreuung und Untersuchung der Rinder und Ziegen im BSE-Stall sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit und den moralischen Rückhalt danken.

Mein besonderer, persönlicher Dank geht an meine Eltern, die mir stets moralisch, familiär, geduldig und mitfiebernd beigestanden haben und mich auch sonst in jedweder Hinsicht unterstützten.