

Genetyczne aspekty scrapie u owiec

AGATA PIESTRZYŃSKA-KAJTOCH, BARBARA REJDUCH

Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Piestrzyńska-Kajtoch A., Rejduch B.

Genetic aspects of scrapie in sheep

Summary

Scrapie is a fatal, neurodegenerative disease occurring in sheep, goats and mufllons. It is commonly believed that its infectious agent is a protease-resistant form of host-encoded prion protein (PrP). Polymorphism of the coding region of PrP genes has been analyzed in many countries. Polymorphism of codons 136, 154 and 171 has been associated with outbreaks of scrapie. Valine (V) in codon 136, arginine (R) in codon 154, glutamine (Q) and histidine (H) in codon 171 are associated with susceptibility to scrapie while histidine (H) in codon 154 and arginine (R) in codon 171 are associated with resistance to the illness. Alanine (A) in codon 136 is associated with low susceptibility to scrapie.

Keywords: PrP gene, scrapie

Scrapie (trzęsawka owiec) to neurodegeneracyjna, śmiertelna choroba owiec, kóz i muflonów. Razem z BSE u krów, chorobą Creutzfelda-Jacoba (vCJD) u ludzi i przewlekłą chorobą wyniszczającą (CWD) u jeleniowatych należy do grupy zwanej zakaźnymi encefalopatiami gąbczastymi (TSE – Transmissible Spongiform Encephalopathies). Powszechnie uważa się, że czynnikiem wywołującym te choroby są patogenne białka prionowe PrP^{Sc}, które powstają z produkowanego przez organizm gospodarza białka PrP^C. Charakter patogenu jest wciąż dyskutowany – mimo nagrody Nobla dla S. B. Prusiner, twórcy teorii prionowej. Powiązano już jednak rozwój TSE z ekspresją białka PrP, a u ludzi, myszy i owiec wykryto związek polimorfizmu kodującego go genu z podatnością na te choroby (4). W artykule przedstawiono bieżącą wiedzę na temat genetycznych aspektów choroby scrapie u owiec.

Scrapie atakuje centralny układ nerwowy zwierzęcia. Objawia się nerwowym zachowaniem, ataksją i skróceniem czasu przeżuwania, problemami z mlecznością. W mózgu chorych osobników obserwuje się nadmierną wakuolizację i obumieranie neuronów, a ekstrakty mózgowie tych zwierząt zawierają częściowo proteazoodporne białko PrP (PrP^{Sc}, PrP^{Res}) (10, 23). Mechanizm zakażenia chorobą nie jest dokładnie poznany. W warunkach naturalnych zakażenie następuje przez przewód pokarmowy, co udowodniono eksperymentalnie (13, 29). Uważa się, że jagnięta mogą się zarazić podczas porodu i w okresie laktacji od matek (27). Zwierzęta można też zakazić scrapie poprzez wszczepienie (15, 26). Czas inkubacji wynosi od jednego roku do trzech lat. Choroba zawsze kończy się śmiercią zwierzęcia. Zakażone osobniki nie wykazu-

jące widocznych objawów są trudne do zdiagnozowania, pomimo ciągłego opracowywania nowych testów diagnostycznych (8). Istnieją różne szczepy prionów. Objawy kliniczne i przedkliniczne choroby, jak również zmiany histologiczne w mózgu mogą być różne w zależności od tego, jakim szczepem zaraziło się zwierzę. Znaczny wpływ na przebieg choroby może mieć też aktualny stan zdrowia zwierzęcia.

Gen PrP jest konserwatywny u ssaków. U owiec został zmapowany na chromosomie 13 (13q15) (21). Składa się z 31 412 par zasad, w tym z trzech egzonów (52, 98 i 4028 nukleotydów) i dwóch przedzielających je intronów (2421 i 14 031 nukleotydów). Niekodujący region 3'UTR liczy 3246 pz. Elementy powtórzone stanowią 57,1% sekwencji genu (24). Tylko egzon trzeci ulega translacji, a otwarta ramka odczytu liczy 256 kodonów (766 pz) długości. W wyniku potranslacyjnej obróbki powstaje białko prionowe – PrP (PrP^C) złożone z 210 aminokwasów (33-35 kDa), posiadające dwa miejsca glikozylacji. Może ono występować w formie z jednym, dwoma lub nie zawierać cząsteczek cukru. Stosunek ilościowy tych form zależy od tkanki, w której występują i rodzaju TSE (4). Struktura białka prionowego jest konserwatywna u ssaków – zawiera ono elastyczną domenę N-terminalną i strukturalną domenę C-terminalną składającą się z trzech α -helis i dwóch krótkich β -harmonijek (12). Opisany polimorfizm genu PrP dotyczy przeważnie właśnie domeny C-terminalnej. Większość białek PrP jest zakotwiczona poprzez glikofosfatydyloinozylol do błony komórkowej, ale niektóre cząsteczki mogą przenikać przez błonę lub być aktywnie przez komórkę wydzielane (4). Ich funkcja nie została jeszcze do końca wyjaśniona, chociaż prawdopodobnie biorą udział

w transporcie i homeostazie jonów miedzi (Cu^{2+}), które poprzez histydynę mogą się wiązać z domeną N-terminalną (4, 30, 35).

Białko PrP^C może przekształcić się w częściowo proteazoodporną formę PrP^{Sc} (lub PrP^{res}), a wtedy staje się patogenne i akumuluje się w mózgu i innych organach. Mechanizm tej przemiany nie jest dokładnie znany. Wiadomo, że zmiana zachodzi w drugiej czwartorzędowej strukturze białka, prawdopodobnie na skutek kontaktu PrP^C z egzogennym PrP^{Sc} (31, 36). Badania kilku wariantów owczych białek PrP dowiodły, że odmienna sekwencja aminokwasów (konsekwencja polimorfizmu genu) pociąga za sobą różnice w stabilności struktury tych białek (12). Wykonano też badania *in vitro* nad konwersją białka PrP^C w PrP^{Sc} (pod wpływem tego ostatniego), używając do tego celu specjalnych linii komórkowych z różnymi polimorficznymi wariantami genu PrP. Okazało się, że proces przemiany PrP^C→PrP^{Sc} zachodził z największą wydajnością dla genu PrP z polimorfizmem A136V i L141F oraz dla genu typu dzikiego (A136 i Q171). Z niską wydajnością zachodziła przemiana w częściowo proteazoodporną formę dla wariantów z polimorfizmem R154H, Q171R i M112T (7). Z tego powodu uważa się, że polimorfizm kodującej części genu PrP może być powiązany z występowaniem scrapie.

Polimorfizm genu PrP u owiec obserwowano początkowo w całej jego sekwencji (18, 19, 22, 26). Najwięcej badań dotyczy jednak występowania polimorfizmu w obrębie kodującego fragmentu PrP i jego powiązań z podatnością, odpornością i czasem inkubacji choroby (1-7, 11, 13, 14, 16-20, 22, 25, 26, 28, 29, 31-34, 37). Dotychczas znaleziono polimorfizm aminokwasów w 23 kodonach: Q101R, M112T/I, G127V/A/S, A136V/T, M137T, S138N/R, L141F, H143R, R151C/G/H, Y152F, R154H, R167S, P168L, Q171R/H/K, Y172D, Q175E, N176D/K, H180Y, Q189L/R, T195S, T196S, R211Q, P241S (4, 11, 14). Wykryto też kilka cichych mutacji w kodonach 83, 138, 231 i 237 (14, 37). Polimorfizm kodującej części genu PrP szczegółowo przedstawiono w tab. 1. Częstość występowania wszystkich polimorfizmów w genie PrP różni się w zależności od kraju i rasy owiec. Dla trzech kodonów: 136, 154 i 171 udowodniono, w wielu badaniach, związek polimorfizmu z wrażliwością na scrapie. Nie uważa się jednak, że zmiana aminokwasu w tych kodonach jest przyczyną choroby. Występowanie waliny (V) w kodonie 136, w odróżnieniu od alaniny (A), wiąże się z wysoką podatnością (4, 6, 34) i skróceniem czasu inkubacji scrapie (4, 26), chociaż może to być także zależne od szczepu czynnika chorobotwórczego (15). W kodonie 136, u 13 owiec, Billinis i wsp. (6) odkryli także treoninę (T), która, jak się wydaje, zwiększa podatność na scrapie, jednak nie tak bardzo jak walina (V). W kodonie 154 arginina (R) związana jest z podatnością, a histydyna (H) z częściową odpornością na scrapie (4). Glutamina (Q) i histydyna (H) w kodonie 171 zwiększają podatność, a ar-

ginina (R) odporność (4, 14, 32). Lizyna (K) jest w tym kodonie rzadka – odkryto ją w pojedynczych przypadkach w USA (11), Mongolii (16), Hiszpanii (1) i u siedmiu owiec w Grecji (6). W Stanach Zjednoczonych próbowano zakazić doustnie owce chorobą scrapie. Objawy rozwinęły się tylko u owiec homozygotycznych pod względem glutaminy w kodonie 171 (choć nie wszystkie owce Q/Q zachorowały) (29). W Islandii częściową odporność powiązano z cysteiną (C) w kodonie 151 (32), a w Japonii z treoniną (T) w kodonie 112 (22). Próbę powiązania polimorfizmu innego niż w kodonach 136, 154 i 171 z trzęsawką owiec podjęli też Goldmann i wsp. (14), ale nie znaleziono statystycznie istotnego związku. Ze względu na stwierdzony związek polimorfizmu genu PrP ze scrapie, niezbędne wydają się dalsze badania populacyjne, służące jego wykryciu i powiązaniu z chorobą.

Biorąc pod uwagę polimorfizm kodonów 136 (A lub V), 154 (R lub H) i 171 (R, Q lub H) można wyodrębnić dwanaście alleli genu PrP, z czego dotychczas siedem opisano u owiec w Europie: ARR ($A_{136}R_{154}R_{171}$), ARH, ARQ, AHQ, VRQ, VRR i AHR (dwa ostatnie występują z niewielką częstością w Niemczech i na Słowacji i nie są brane pod uwagę). Ponieważ każde zwierzę ma po dwa allele danego genu, kombinacja pięciu różnych alleli daje piętnaście możliwych genotypów. W Europie, na podstawie wielu badań, scharakteryzowano je pod kątem podatności/odporności na scrapie (4). W różnych krajach, wśród różnych ras owiec frekwencja poszczególnych genotypów się zmienia. Do grupy największego ryzyka zaliczono owce o genotypach: VRQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ (2-5). Ersdal i wsp. (13) wykazali, że zakażone zwierzęta, homozygotyczne pod względem VRQ, charakteryzowały się większą akumulacją białka PrP^{Sc} w tkankach niż heterozygoty VRQ/ARQ. Walina (V) w kodonie 136 jest jednak stosunkowo rzadka. Wyjątek stanowi norweska rasa owiec rygja, w której częstość waliny jest nieco wyższa w stosunku do innych ras europejskich (34). W populacjach, w których jej nie znaleziono lub występowała sporadycznie, za najbardziej podatne na scrapie uważa się homozygoty ARQ/ARQ co potwierdzają różne badania (1, 4, 15, 32). Najbardziej odporne są homozygotyczne owce o genotypie ARR/ARR, ale nie odkryto ich np. w Islandii (32). Do tej pory odnotowano tylko jeden przypadek scrapie u owcy z takim genotypem (22). Osobniki o pozostałych wariantach (ARR/AHQ, ARR/ARQ, ARR/ARH, AHQ/AHQ, ARQ/AHQ, AHQ/ARH, ARQ/ARH, ARR/VRQ, AHQ/VRQ) wykazują pośrednią podatność na trzęsawkę. Zwykle obecność w genotypie przynajmniej jednego allelu ARR zwiększa odporność zwierzęcia, o czym może świadczyć np. niska częstość zachorowań u owiec ARR/VRQ (4). Genotyp ARR/ARQ w Wielkiej Brytanii jest najczęstszy i mało odnotowano przypadków scrapie wśród charakteryzujących się nim owiec. Według tych samych badaczy, owce AHQ/AHQ są bardziej narażone na scra-

Tab. 1. Polimorfizm genu PrP u owiec

Kodon	Sekw. DNA	Aminokwas*	Polim. sekw. DNA**	Polim. aminokwasów*	Publikacje, w których autorzy opisali polimorfizm
83	ggc	G	ggg	G	1
101	cag	Q	cgg	R	1
112	atg	M	acg	T	1, 14, 16, 22
			atc	I	37
116	gca	A	cca	P	wg**: 14
127	ggc	G	gtc	V	16
			gcc	A	wg**: 4, 14
			agc	S	16, 37
136	gcc	A	gtc	V	1-6, 9, 11, 15-17, 19, 20, 22, 25, 26, 28, 29, 32-34
			acc	T	6
137	atg	M	acg	T	11, 14, 32
138	agc	S	aac	N	32, 34
			cgc	R	11
			agt	S	37
141	ctt	L	ttt	F	1, 11, 14, 34
143	cat	H	cgt	R	1, 11, 14, 37
151	cgt	R	tgt	C	14, 32, 34
			ggt	G	1
			cat	H	1
152	tac	Y	ttc	F	37
154	cgt	R	cat	H	1-6, 9, 11, 15-17, 19, 20, 22, 25, 28, 32-34, 37
167	aga	R	ag?	S	11
168	cca	P	cta	L	14
171	cag	Q	cat	H***	1*, 2-4, 5*, 6, 9*, 11, 16, 17, 20, 22, 25, 28*, 33, 34
			cac		
			cgg	R	1-6, 9, 11, 15-17, 20, 22, 25, 28, 29, 33, 34, 37
			aag	K	1, 6, 11, 16, 37
172	tat	Y	gat	D	1
175	cag	Q	gag	E	1, 14
176	aac	N	gac	D	wg**: 4
			aaa	K	1
180	cat	H	tat	Y	11
189	caa	Q	cta	L	16, 37
			cga	R	16
195	acc	T	?	S	11
196	acc	T	?	S	11
211	cga	R	caa	Q	wg**: 4, 14
231	agg	R	cgg	R	1, 5, 16, 22, 37
237	ctg	L	ctc	L	5, 16, 37
241	cct	P	tct	S	14, 37

Objaśnienia: * – międzynarodowe symbole aminokwasów; ** – litery w kolorze czerwonym – polimorficzne zasady azotowe; *** – w tym kodonie są 2 warianty sekw. DNA dla H; autorzy nie podają, z którym wariantem spotkali się w swoich badaniach; * – oznaczono publikacje dotyczące aminokwasu H, wariantu sekwencji „cat”; ** – publikacje, w których tylko wymieniano dany polimorfizm; ? – autorzy nie podają polimorficznej sekwencji

pie niż owce AHQ/VRQ i AHQ/ARH, a ryzyko zachorowalności jest mniejsze dla genotypu ARQ/ARH niż ARQ/ARQ (4). Tongue i wsp. (33) zaproponowali podział genotypów na pięć grup wg podobnego ryzyka zachorowania na trzęsawkę. Do grupy I i najbardziej odpornej zaliczyli owce ARR/ARR; do grupy II: ARR/AHQ, ARR/ARH i ARR/ARQ; do grupy III: AHQ/AHQ, AHQ/ARQ, AHQ/ARH, ARH/ARH, ARQ/ARH, ARQ/ARQ; do grupy IV: ARR/VRQ; do grupy V najbardziej podatne zwierzęta: AHQ/VRQ, ARQ/VRQ, ARH/VRQ i VRQ/VRQ. W Grecji, gdzie najczęstszymi genotypami były ARQ/ARQ i ARQ/AHQ, na największe ryzyko zachorowania na scrapie narażone były owce VRQ/VRQ, natomiast ryzyko dla zwierząt ARQ/ARQ było trzykrotnie niższe (6).

Badano także powiązania genotypu z wiekiem padłych zwierząt i czasem inkubacji trzęsawki (2, 3, 4, 15, 18, 26). Wykazano, że u owiec VRQ/VRQ i ARH/VRQ dochodzi do zejść śmiertelnych w najmłodszym wieku w porównaniu do innych chorych na scrapie zwierząt. Jako nieco tylko starsze padają osobniki ARQ/ARQ i ARQ/VRQ. Ponadto walina w kodonie 136 skraca czas inkubacji choroby od momentu kontaktu z czynnikiem chorobotwórczym. Analizowano również różnice, z jakimi odmienne szczepy scrapie atakują osobniki o różnych genotypach (15). Badacze dowiedli, że owce ARQ/ARQ były odporne na szczep SSBP/1, a podatne na CH1641.

Unia Europejska decyzją z dnia 18.XII.2002 r. (notyfikowaną jako Dokument C(2002)5102) zaleca krajom członkowskim badania genotypów w populacjach owiec pod kątem podatności na scrapie i zwiększenie częstości warunkującego odporność allelu ARR w stadach o dużym znaczeniu gospodarczym. Najbardziej wiarygodną metodą służącą badaniu polimorfizmu jest sekwencjonowanie DNA (1, 3, 5, 6, 11, 13-16, 20, 22, 25, 32, 34). Umożliwia ono wykrycie polimorfizmu w całym badanym fragmencie genu. Pozostałe metody dotyczą tylko konkretnych kodonów. Często wykorzystuje się analizę restrykcyjną (RFLP): w przypadku kodonów 136 i 154 z enzymem BspHI (1, 6, 15, 19-22, 28, 32), a 136 i 171

enzymów BstI i AccI (1, 25). Stosunkowo prosta wydaje się metoda z zastosowaniem techniki ARMS (amplification refractory mutation system) do kodonów 136, 154 i 171, zaproponowana przez Buitkamp i Semmer w 2004 r. (9). Z kolei Belt i wsp. (5) z powodzeniem używali do analizy polimorfizmu genu PrP metody ASA (allele specific amplification) i DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). DGGE stosowali także inni badacze (6, 32). Kilku badaczy wykorzystano też hybrydyzację z sondami oligonukleotydowymi specyficznymi dla konkretnych alleli (22, 29).

W Polsce do tej pory nie odnotowano przypadku scrapie u owiec. Nie oznacza to, że w krajowej populacji owiec scrapie nie występuje. Hoinville i wsp. (cyt. 33) oszacowali, że tylko 13% z podejrzeń o trzęsawkę jest zgłaszanych odpowiednim służbom. W Polsce brak jest takich danych. Już sam ten fakt wskazuje, że badaniami genotypów i programami zwiększania w populacji alleli odporności na scrapie powinny być objęte wszystkie stada o dużym znaczeniu gospodarczym, a przynajmniej tryki stadne. W Irlandii efektem realizacji takiego programu było zwiększenie się częstości dającej odporność argininy (R) w kodonie 171 u stadnych tryków (28). Niestety, duże koszty analiz DNA uniemożliwiają takie badania w skali całego kraju.

Piśmiennictwo

1. Acin C., Martin-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzon M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J. J., Zaragoza P.: Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 2103-2110.
2. Baylis M., Chihota C., Stevenson E., Goldmann W., Smith A., Sivam K., Tongue S., Gravenor M. B.: Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 2735-2740.
3. Baylis M., Goldmann W., Houston F., Cairns D., Chong A., Ross A., Smith A., Hunter N., McLean A. R.: Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 2907-2914.
4. Baylis M., Goldmann W.: The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr. Mol. Med.* 2004, 4, 385-396.
5. Belt P. B., Muileman I. H., Schreuder B. E., Bos-de Ruijter J., Gielkens A. L., Smits M. A.: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 509-517.
6. Billinis C., Psychas V., Leontides L., Spyrou V., Argyroudou S., Vlemmas I., Leontides S., Sklaviadis T., Papadopoulos O.: Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 547-554.
7. Bossers A., de Vries R., Smits M. A.: Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J. Virol.* 2000, 74, 1407-1414.
8. Bozzetta E., Acutis P. L., Martucci F., Nappi R., Casalone C., Mazza M., Caramelli M.: Evaluation of rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2004, 107, 559-562.
9. Buitkamp J., Semmer J.: A robust, low- to medium-throughput prnp genotyping system in sheep. *BMC Infectious Diseases* 2004, 4, 30-37.
10. Capucchio M. T., Guarda F., Pozzato N., Coppolino S., Caracappa S., Di Marco V.: Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2001, 48, 23-31.
11. DeSilva U., Guo X., Kupfer D. M., Fernando S. C., Pillai A. T. V., Najjar F. Z., So S., Fitch G. Q., Roe B. A.: Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet. Genome Res.* 2003, 102, 89-94.
12. Eghiaian F., Grosclaude J., Lesceu S., Debey P., Doublet B., Treguer E., Rezaei H., Knossow M.: Insight into the PrPC→PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 10254-10259.
13. Ersdal C., Ulvund M. J., Espenes A., Benestad S. L., Sarradin P., Landsverk T.: Mapping PrPSc Propagation in Experimental and Natural Scrapie in Sheep with Different PrP Genotypes. *Vet. Pathol.* 2005, 42, 258-274.
14. Goldmann W., Baylis M., Chihota C., Stevenson E., Hunter N.: Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98, 1294-1302.
15. Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J.: PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 989-995.
16. Gombojav A., Ishiguro N., Horiuchi M., Serjmyadag D., Byambaa B., Shinagawa M.: Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 2003, 65, 75-81.
17. Hunter N., Cairns D.: Scrapie-free Merino and Poll Dorset sheep from Australia and New Zealand have normal frequencies of scrapie-susceptible PrP genotypes. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 2079-2082.
18. Hunter N., Foster J. D., Hope J.: Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. *Vet. Rec.* 1992, 130, 389-392.
19. Hunter N., Goldmann W., Benson G., Foster J. D., Hope J.: Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *J. Gen. Virol.* 1993, 74, 1025-1031.
20. Hunter N., Goldmann W., Foster J. D., Cairns D., Smith G.: Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet. Rec.* 1997, 141, 137-140.
21. Iannuzzi L., Palomba R., Di Meo G. P., Perucatti A., Ferrara L.: Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1998, 81, 202-204.
22. Ikeda T., Horiuchi M., Ishiguro N., Muramatsu Y., Kai-Uwe G. D., Shinagawa M.: Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 2577-2581.
23. Karmysheva V. Y., Pogodina V. V., Roikhel V. M.: Cytopathological changes in human and animals brains in prion diseases. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004, 34, 509-513.
24. Lee I. Y., Westaway D., Smit A. F., Wang K., Seto J., Chen L., Acharya C., Ankener M., Baskin D., Cooper C., Yao H., Prusiner S. B., Hood L. E.: Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.* 1998, 8, 1022-1037.
25. Luhken G., Buschmann A., Groschup M. H., Erhardt G.: Prion protein allele A136 H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch. Virol.* 2004, 149, 1571-1580.
26. Maciulis A., Hunter N., Wang S., Goldmann W., Hope J., Foote W. C.: Polymorphisms of a scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to experimentally induced scrapie in Cheviot sheep in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 1992, 53, 1957-1960.
27. Matthews D., Jeffrey M., Simmons M. M., Stack M., Wells G. A. H.: rozdz. 2.4.8. Scrapie. W: Vallat B.: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2004. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00074.htm (updated: 22.07.2005).
28. O'Doherty E., Aherne M., Ennis S., Weavers E., Hunter N., Roche J. F., Sweeney T.: Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep. *Vet. Rec.* 2000, 146, 335-338.
29. O'Rourke K. I., Holyoak G. R., Clark W. W., Mickelson J. R., Wang S., Melco R. P., Besser T. E., Foote W. C.: PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 975-978.
30. Qin K., Coomaraswamy J., Mastrangelo P., Yang Y., Lugowski S., Petro-milli C., Prusiner S. B., Fraser P. E., Goldberg J. M., Chakrabarty A., Westaway D.: The PrP-like protein Doppel binds copper. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 8888-8896.
31. Smits M. A., Bossers A., Schreuder B. E.: Prion protein and scrapie susceptibility. *Vet. Q.* 1997, 19, 101-105.
32. Thorgeirsdottir S., Sigurdarson S., Thorisson H. M., Georgsson G., Palsdottir A.: PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J. Gen. Virol.* 1999, 80, 2527-2534.
33. Tongue S. C., Wilesmith J. W., Cook C. J.: Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain. *Vet. Rec.* 2004, 154, 9-16. Erratum in: *Vet. Rec.* 2004, 154, 116.
34. Tranulis M. A., Osland A., Bratberg B., Ulvund M. J.: Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J. Gen. Virol.* 1999, 80, 1073-1077.
35. Westaway D., Carlson G. A.: Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, 301-307.
36. Westaway D., Telling G., Priola S.: Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 11030-11031.
37. Zhang L., Li N., Fan B., Fang M., Xu W.: PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim. Genet.* 2004, 35, 457-461. Erratum in: *Anim. Genet.* 2005, 36, 93.