

Untersuchungen zur Ätiologie der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP)

FABIAN DEUTSKENS



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rügenapf

Untersuchungen zur Ätiologie der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich der Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Fabian Deuskens

Tierarzt aus Duisburg

Gießen, 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof.Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Gutachter: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf
 2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Doll
- Prüfer: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 06. Juli 2012

Ich habe die vorgelegte Dissertation ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Fabian Deuskens

Das Projekt war ein Teilprojekt des durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) finanzierten Verbundprojekts „Ursachenermittlung der bei Kälbern auftretenden Hämorrhagischen Diathese (Bovine Neonatale Panzytopenie)“.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

Deutskens F., Lamp B., Riedel C., Wentz E., Lochnit G., Doll K., Thiel H.-J., Rümenapf T. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Panzytopenie (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex class I (MHC I), *Veterinary Research*. 42:97.

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	I
2 Abkürzungsverzeichnis	V
3 Einführung	1
3.1 Überblick zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie	1
3.1.1 Klinische Symptome	1
3.1.2 Hämatologische Befunde.....	3
3.1.3 Pathologie und Histopathologie	4
3.1.4 Epidemiologie	6
3.1.5 BVD-Impfung	7
3.1.6 PregSure® BVD-Vakzine	9
3.2 Bisherige Untersuchungen zur Ätiologie der BNP	10
3.2.1 Genetische Ätiologie.....	11
3.2.2 Toxische Ätiologie	11
3.2.2.1 Sulfonamide	11
3.2.2.2 Furazolidon	12
3.2.2.3 Mykotoxine	12
3.2.2.4 DCVC.....	13
3.2.2.5 Ptaquilosid	13
3.2.3 Infektiöse Ätiologie	14
3.2.3.1 Bovine Virusdiarrhö.....	14
3.2.3.2 Epizootic hemorrhagic disease und Blauzungenkrankheit.....	15
3.2.3.3 Weitere Viruskrankheiten	16
3.2.3.4 Bakterielle Erreger	16
3.2.4 Nachweis von Alloantikörpern in Serum und Kolostrum von BNP-Muttertieren	17
3.3 Zielsetzung.....	18
4 Material und Methoden	19
4.1 Material	19

4.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	19
4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
4.1.3	Geräte.....	22
4.1.4	Enzyme.....	22
4.1.5	Kits	23
4.1.6	Antikörper	23
4.1.6.1	Primärantikörper.....	23
4.1.6.2	Sekundärantikörper.....	23
4.1.6.3	Rinderseren	24
4.1.7	Eukaryotische Zellen	25
4.1.8	Medien, Lösungen und Puffer.....	25
4.1.9	Impfstoffe.....	28
4.2	Methoden	28
4.2.1	Gewinnung von Rinder-Vollblut	28
4.2.2	Gewinnung von Serum	29
4.2.3	Gewinnung von PBMCs.....	29
4.2.4	Gewinnung von Kolostrum.....	29
4.2.5	Arbeit mit Zellen.....	30
4.2.5.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	30
4.2.5.2	Bestimmung der Zellzahl.....	31
4.2.5.3	Indirekter Immunperoxidase-Test	31
4.2.6	Arbeit mit Proteinen	32
4.2.6.1	Acetonfällung von Proteinen	32
4.2.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Starcher et al.	32
4.2.6.3	Proteinkonzentrationsbestimmung im BCA-Assay	33
4.2.6.4	Biotinylierung von Zell-Oberflächenproteinen	34
4.2.6.5	SDS-PAGE	35
4.2.6.6	Proteinfärbemethoden.....	36
4.2.6.7	Western Blot	36
4.2.6.8	Nachweis von Proteinglykosylierung mittels PNGase F.....	38
4.2.7	Charakterisierung von Antigenen der BNP-Alloantikörper	38

4.2.7.1	Affinitätsreinigung von zellulären Oberflächenproteinen mit immobilisiertem Gesamt-IgG.....	38
4.2.7.2	Affinitätsreinigung von zellulären Oberflächenproteinen mit Alloantikörpern	40
4.2.7.3	Affinitätsreinigung von Alloantikörpern aus BNP ⁺ -Seren.....	41
4.2.8	Quantifizierung von Alloantikörper-Titern.....	41
4.2.8.1	Quantifizierung von Serumantikörpern mittels CELISA.....	41
4.2.9	Identifizierung von Antigenen mit MALDI-ToF-PMF	43
4.2.9.1	Grundlagen der Massenspektrometrie	43
4.2.9.2	MALDI-ToF-PMF (Peptide Mass Fingerprinting).....	45
5	Ergebnisse	47
5.1	Charakterisierung von BNP-Alloantikörpern.....	47
5.1.1	BNP-Alloantikörper binden an Oberflächenproteine von bovinen Kulturzelllinien	47
5.1.2	BNP-Muttertier-IgG zeigt eine Reaktivität gegen 44 und 12 kDa Proteine von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen.....	48
5.1.3	Optimierung der Affinitätsreinigung von oberflächenbiotinyliertem MDBK-Lysat mit Rinderserum.....	49
5.1.4	Nur Serum von PregSure [®] BVD geimpften Tieren zeigt eine Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein	50
5.1.5	Nachweis von Allo-AK gegen das 12 und 44 kDa Protein in Rinderkolostrum	52
5.1.6	Allo-AK zeigen eine Reaktivität mit dem 12 und 44 kDa Protein von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs).....	53
5.2	Identifizierung der Zielantigenen der BNP-Alloantikörper.....	55
5.2.1	Deglykosylierung	55
5.2.2	Identifizierung von MHC I und β 2M mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF).....	55
5.2.3	Serologische Bestätigung der Identifizierung von MHC I und β 2M.....	57
5.3	Charakterisierung des PregSure [®] BVD-Impfstoff	58
5.3.1	Identifizierung im PregSure [®] BVD enthaltener MHC-I-Varianten.....	59
5.4	Nachweis von MHC-I-Allo-AK korreliert nicht immer mit BNP	60
5.4.1	Quantifizierung von BNP-Alloantikörpern	62

5.5	Vergleich des PregSure® BVD mit anderen inaktivierten BVD-Impfstoffen	64
5.5.1	Induktion von Alloantikörper auch durch andere BVD-Impfstoffe?	65
5.5.2	Quantifizierung von Alloantikörpern in Bovilis®- und Bovidec®-Seren.....	66
5.5.3	Nachweis von MHC I in anderen BVD-Impfstoffen	66
5.5.4	Gesamtproteinkonzentrationen verschiedener BVD-Impfstoffe	67
6	Diskussion	69
6.1	Reaktivität von BNP ⁺ -Serum gegen MDBK-Zellen	69
6.1.1	Identifizierung der 44 und 12 kDa Proteine als MHC I und β2M.....	70
6.1.2	Reaktivität von Allo-AK gegen MHC I von Rinder-PBMCs.....	71
6.1.3	MHC I ist eine Kontaminante des PregSure® BVD-Impfstoff	72
6.2	Passt MHC I zur Pathogenese der BNP?	74
6.2.1	MHC I	74
6.2.2	Einfluss des Allo-AK-Titers auf die BNP-Manifestation.....	76
6.2.3	MHC-I-Allo-AK basiertes Modell der BNP-Pathogenese	78
6.3	Ausblick.....	80
7	Zusammenfassung.....	82
8	Summary	83
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Danksagung.....	95

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
Allo-AK	Alloantikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
BL-3	„Bovine B-cell Lymphosarcoma cell line 3“
BHK-21	„Baby Hamster Kidney 21“
BNP	Bovine Neonatale Panzytopenie
BNP ⁺	PregSure [®] BVD geimpftes Muttertier eines an BNP erkrankten Kalbes
BNP ⁻	PregSure [®] BVD geimpftes Muttertier bei dessen Nachkommen BNP nicht aufgetreten ist
BoLA class I	„bovine leukocyte antigen class I“
BSA	bovines Serumalbumin
BT	„bluetongue disease“, Blauzungenerkrankung
BTV	„bluetongue virus“
BTV-8	„bluetongue virus Serotyp 8“
BVD	Bovine Virusdiarrhö
BVDV	Bovines Virusdiarrhö-Virus
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CELISA	„Cell Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
cp	„cytopathogenic“, zytopathogen
DAS	Diazetoxyszirpenol
defiz.	defizient
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
DCVC	S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-Cystein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHD	„epizootic hemorrhagic disease“
EHDV	„epizootic hemorrhagic disease virus“
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Fa.	Firma
FAIT	Fetale Alloimmune Thrombozytopenie
Fam.	Familie
Fc	„fragment crystalizable“
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G/l	Giga (10 ⁹) pro Liter
h	Stunde (lat.: „hora“)
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
HLA	„human leukocyte antigen“, humanes Leukozytenantigen

HPA	„human platelet antigen“, humanes Plättchenantigen
IgG	Immunglobulin G
ISCOM	„immune stimulating complexe“
IU	„international unit“, internationale Einheit
JLU	Justus-Liebig-Universität
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	„Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation“
MDBK	„Madin Darby Bovine Kidney“
mg	Milligramm
MHC I	„major histocompatibility complex class I“, Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOWSE	„Molecular Weight Search“
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungszahl
<i>n</i>	Anzahl
NAIT	Neonatale Alloimmune Thrombozytopenie
ncp	„non-cytopathogenic“, nicht zytopathogen
Neg.	Negativkontrolltier (BVDV-frei, nicht gegen BVD geimpftes Tier)
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2
PMF	„Peptide Mass Fingerprinting“; Peptidmassen Fingerabdruck
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAPO	Streptavidin-Peroxidase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SK-6	„Swine Kidney 6“
sog.	so genannte
Sv	Sievert
T/l	Tera (10^{12}) pro Liter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
ToF	„Time of Flight“
V	Volt
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent
WB	Western Blot
Wo.	Woche(n)

3 Einführung

3.1 Überblick zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie

Seit 2007 wird eine Häufung an Fällen von Kälbern mit ungewöhnlicher Blutungsneigung beobachtet. Die Krankheit wurde in der Fachliteratur zunächst als „haemorrhagic diathesis“, „bleeding calf syndrome“ oder im deutschsprachigen Raum auch als „Blutschwitzen“ bezeichnet (Friedrich et al., 2011). Erste Erkenntnisse wurden auf dem Satellite Symposium „Haemorrhagic Diathesis in Calves“ am 2. Dezember 2009 in Marseille präsentiert. Hier einigte man sich auf den einheitlichen Namen „Bovine Neonatale Panzytopenie“ (BNP) für das neue Syndrom.

Außerdem wurde eine einheitliche Definition für das Vorliegen von BNP erarbeitet. Demnach ist von einem BNP-Fall auszugehen, wenn sechs Kriterien erfüllt sind: 1.) eine vermehrte Blutungsneigung vorliegt, 2.) Antigen des Bovinen Virusdiarrhö Virus (BVD) nicht nachgewiesen werden kann, 3.) eine massive Thrombozytopenie (≤ 200 G/l) und Leukopenie im Blutbild vorliegen, 4.) die Kälber nicht älter als 4 Wochen sind, 5.) die Kälber keine Anzeichen einer Septikämie aufweisen und 6.) *post mortem* im Knochenmark eine Panmyelophthase nachgewiesen werden kann (Friedrich et al., 2009a).

3.1.1 Klinische Symptome

An BNP erkrankte Kälber entwickeln in der Regel klinische Symptome innerhalb der ersten 30 Lebensstage. In den meisten Fällen treten Krankheitssymptome in der zweiten oder dritten Lebenswoche auf (Bell, 2011; Schröter et al., 2011). In einer Studie entwickelten die Kälber Krankheitssymptome zwischen dem 5.-16. Lebenstag (Pardon et al., 2010). In einer anderen Studie zeigten die Kälber im Mittel Symptome nach 12,7 Tagen (Friedrich et al., 2009c). In den meisten Fällen tritt der Tod 24-48 h nach Krankheitsbeginn ein (Bell et al., 2010). Je nach Studie sterben die meisten betroffenen Kälber durchschnittlich am 13. Lebenstag (7-21 Tage) (Pardon et al., 2010) oder 17. (6.-32. Tag) Lebenstag (Friedrich et al., 2009c). Die Letalität beträgt 90 % der betroffenen Kälber (Pardon et al., 2010). Wenige Tiere überleben die Krankheit und tragen keine dauerhaften Schäden davon (Corbiere et al., 2009; Pardon et al., 2010). Allen Symptomen der Erkrankung liegt eine gesteigerte Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese) zu Grunde (Friedrich et al., 2009c).

Eines der häufigsten Krankheitssymptome sind frische Blutbeimengungen im Kot oder Meläna (durch Hämatin schwarz gefärbter Kot) (Pardon et al., 2010). Die Menge des Blutes ist von Fall zu Fall variabel und reicht von wenigen schleimig-blutigen Schlieren bis zum Absatz von fast reinem Blut (Friedrich et al., 2009c). Ebenso häufig wie Blutbeimengungen im Kot treten Petechien an der Mundschleimhaut, der Zungenunterseite, dem Naseneingang, den Lidrändern, den Ohren und der Vulvaschleimhaut auf (Bell, 2011; Friedrich et al., 2009c). Die Blutungsneigung betroffener Kälber wird durch vermehrtes Nachbluten aus Injektionsstellen, beim Enthornen oder beim Einziehen der Ohrmarken deutlich (Friedrich et al., 2009c).

Hautblutungen, die zur Namensgebung „Blutschwitzen“ geführt haben, treten nur in 60 % der Fälle auf (Friedrich et al., 2009c). Bei diesem Symptom ist eine signifikante Saisonabhängigkeit festzustellen. Es tritt besonders in den Sommermonaten auf (Friedrich et al., 2009c). Die Hautblutungen sind vermutlich eine Folge von Insektenstichen und werden daher vermehrt in den Sommermonaten beobachtet, wenn die Insektenpopulation besonders groß ist (Pardon et al., 2010). Das Symptom des „Blutschwitzens“ ist damit nicht bei jedem BNP-Fall vorhanden. Außerdem ist der Begriff „Blutschwitzen“ irreführend, da zum Auftreten der Hautblutungen Läsionen vorhanden sein müssen und man daher nicht mehr von „Schwitzen“ sprechen kann (Friedrich et al., 2009c).

Weitere, weniger häufig beobachtete Symptome sind flächenhafte subsklerale Blutungen (Friedrich et al., 2009c), Hämorrhagien aus Zahnfleischrändern und Nasenbluten (Epistaxis), sowie Hämatome (Bell, 2011). Eine erhöhte Körpertemperatur zu Beginn klinischer Symptome bis hin zu hohem Fieber (Pyrexie, beim Kalb 40-41,8°C) im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium können auftreten (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010). Das Fieber bei BNP Kälbern ist oft therapieresistent und reagiert nicht auf die Gabe nicht-steroidaler Entzündungshemmer (Pardon et al., 2010). Im moribunden Stadium der Erkrankung können die Tiere auf Grund des massiven Blutverlustes Untertemperatur (Hypothermie, 35-37°C) zeigen (Pardon et al., 2010). Das Allgemeinbefinden und die Futteraufnahme sind beim Eintreten klinischer Symptome ungestört. Erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium werden die Tiere zunehmend apathisch bis moribund (Friedrich et al., 2009c). In vielen Fällen leiden an BNP erkrankte Kälber an sekundären Infektionen. Dabei kommen vor allem Durchfälle (Diarrhö), Lungenentzündungen (Pneumonien), Nabelentzündungen (Omphalitis oder Omphalophlebitis) und Blutvergiftungen (Septikämien) vor (Friedrich et al., 2009c).

Die adäquate Behandlung der BNP ist umstritten. Beschrieben sind die Gabe von Vollblut und

hochdosiertem Kortison, sowie die Gabe von Antibiotika (Cephalosporine, Fluorchinolone, Sulfonamide, Penizillin oder Makrolide) zur Prävention von Sekundärinfektionen (Bell et al., 2009a; Pardon et al., 2010).

3.1.2 Hämatologische Befunde

Gesunde Kälber besitzen andere Referenzbereiche für Blutzellen als erwachsene Tiere. Der Referenzbereich für Thrombozyten liegt bei Kälbern zwischen 200-1300 G/l, für Leukozyten zwischen 4,0-14,0 G/l und für Erythrozyten bei 6,0-10,0 T/l (Knowles et al., 2000; Mohri et al., 2007; Tennant et al., 1974).

Auffälligste Veränderung in der Hämatologie an BNP erkrankter Kälber ist eine massive Thrombozytopenie (Werte bis zu <10 G/l) (Bell, 2011). Eine Thrombozytopenie ist eine Verminderung der Zahl zirkulierender Blutplättchen, die beim Rind ab dem Unterschreiten eines kritischen Wertes von etwa 100-200 G/l zu hämorrhagischen Diathesen auf Grund von Störungen in der primären Hämostase führt (Stöber, 2007; Sutor, 2000). Thrombozytopenien sind die Folge einer verminderten Thrombozytenproduktion oder eines erhöhten Umsatzes von Plättchen oder einer Kombination aus diesen beiden Vorgängen. Sie sind abzugrenzen von Thrombozytopathien, die mit Strukturanomalien der Plättchen und dadurch hervorgerufenem Funktionsverlust einhergehen (Buck et al., 2011). Die hämorrhagischen Diathesen prägen das klinische Bild der BNP (Friedrich et al., 2009c; Witt et al., 2011). Die Thrombozytenzahlen unterliegen im Laufe der Erkrankung charakteristischen Veränderungen. In den ersten beiden Lebenstagen sinken die Thrombozytenzahlen auf Werte von 200-300 G/l um dann bis zum dritten Tag wieder anzusteigen. Danach erfolgt ein kontinuierlicher Abfall der Thrombozytenzahl. Klinische Symptome setzen bei den Tieren ein, wenn die Thrombozytenzahl unter den Referenzbereich (<200 G/l) abfällt (Schröter et al., 2011). Überleben die Kälber die Erkrankung kommt es zu einer spontanen Erhöhung der Thrombozytenwerte (Pardon et al., 2010). Die Thrombozyten weisen bei der BNP-Erkrankung eine physiologische Struktur auf. Es liegt also keine Thrombozytopathie vor (Buck et al., 2011). Variabler und nicht immer in zeitlicher Assoziation mit der Thrombozytopenie tritt eine Leukopenie ($\leq 0,8-1,3$ G/l) auf (Schröter et al., 2011). Bei dieser handelt es sich um eine Lymphopenie, Neutropenie und Monozytopenie mit relativer Lymphozytose (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). Die Leukopenie ist vermutlich verantwortlich für die gesteigerte Empfänglichkeit für sekundäre Infektionen (Witt et al., 2011).

Die Erythrozytenzahl liegt zu Beginn der Erkrankung meist im Normbereich. Erst im Laufe der

Erkrankung kann es zu einer normozytären, normochromen Anämie (Erythrozyten: 1,7-3,0 T/l) kommen, die zunächst auf den Blutverlust zurückzuführen ist. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung geht sie in eine aplastische Anämie über (Bell, 2011; Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c). Die Veränderungen im Blutbild in Folge der Knochenmarksveränderungen, korrelieren mit der Lebensspanne der unterschiedlichen Blutzelltypen. Zunächst sinken Granulozyten- (Lebensspanne beim Kalb: wenige Stunden) und Thrombozytenwerte (Lebensspanne beim Kalb: 3-5 Tage), gefolgt von Lymphozyten- und zuletzt Erythrozytenzahlen (Lebensspanne beim Kalb: 60 Tage) im Finalstadium der Erkrankung (Bell, 2011; Mizuno et al., 1959; Witt et al., 2011).

Durch hämatologische Untersuchungen wurde gezeigt, dass neben den Tieren, die klinische Symptome hatten, einige klinisch unauffällige Kälber in den betroffenen Betrieben ebenfalls verringerte Thrombo- und Leukozytenwerte aufwiesen (Pardon et al., 2010). In der Untersuchung eines einzelnen Betriebes wurde nachgewiesen, dass 16,4 % der Kälber verringerte Zellzahlen in mindestens zwei der drei Blutzelllinien aufwiesen, ohne dass bei diesen Tieren klinische Symptome von BNP auftraten (Witt et al., 2011). Für diese Tiere wurde der Begriff der subklinischen BNP eingeführt (Pardon et al., 2010).

Bei der Blutbiochemie ist in allen Fällen eine Hypoproteinämie nachweisbar, die vermutlich eine Folge des Blutverlustes darstellt (Pardon et al., 2010). Die Prothrombinzeit, ein Marker für die Blutgerinnung, ist normal (Bell et al., 2010) bis leicht verlängert (Pardon et al., 2010). Erst 1-2 Tage vor dem Tod der Tiere ist sie extrem verlängert (Friedrich et al., 2011). Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT, physiologisch beim Kalb: 27-33 s), eine Methode zur Bestimmung eines Mangels an intrinsischen Vorphase-Gerinnungsfaktoren ist ebenfalls im Normbereich (Bell, 2011) bis leicht verlängert (51-82 s) (Friedrich et al., 2011; Pardon et al., 2010). Fibrinogen kann im Einzelfall erhöht sein (Pardon et al., 2010).

3.1.3 Pathologie und Histopathologie

Die Körper an BNP verendeter Kälber befinden sich meist in gutem Allgemein- und Ernährungszustand (Bell et al., 2009b). Sie wirken auf Grund der hochgradigen Anämie blass. Petechien und Ekchymosen kommen in Haut, Subkutis sowie der Serosa und Mukosa des Gastrointestinaltraktes vor (Kappe et al., 2010). Des Weiteren können Ekchymosen bis hin zu flächenhaften Sugillationen an Lunge, Milz, Thymus, Herz (Epikard und Endokard), Meningen und der Skelettmuskulatur gefunden werden (Bell et al., 2009b). Blutungen ins Darmlumen und

Meläna sind nachweisbar (Buck et al., 2011). In den großen Körperhöhlen kann es zu hämorrhagischen Pleural- oder Abdominalergüssen kommen und teilweise sind Gelenke mit serosanguinöser Flüssigkeit gefüllt (Pardon et al., 2010). Es handelt sich um hämorrhagische Diathesen bei erhaltener Endothel- und Gefäßarchitektur. Das Fehlen von Vaskulopathien weist auf eine hochgradige Koagulopathie hin (Bell et al., 2009b; Pardon et al., 2009b). Des Weiteren können in einigen Fällen fibrinöse oder suppurative Pneumonien und fokale ulzerative bis nekrotisierende Entzündungen der Maulschleimhaut nachgewiesen werden (Kappe et al., 2010).

Das Knochenmark der langen Röhrenknochen und des Sternums der Tiere ist blass bis hellrot und zum Teil sehr fetthaltig (Bell et al., 2009b; Kappe et al., 2010). Histopathologisch können am Knochenmark die bedeutendsten Veränderungen festgestellt werden. Es weist eine Depletion der erythroiden, lymphoiden, myeloiden und mekaryozytären Zelllinien (Panmyelophthise) auf, welche in schweren Fällen in einer totalen Aplasie dieser Zellen mündet (Kappe et al., 2010; Scholes, 2009). In anderen Fällen verbleiben kleine Inseln mit hämatopoetisch aktivem Gewebe, die fokale Degenerationen und Apoptose der Blutstamm- und Blutvorläuferzellen aufweisen können (Kappe et al., 2010). Durch den Zelluntergang entstehende Räume zwischen den Stromazellen des Knochenmarks sind hyperämisch oder mit homogenem eosinophilem Material oder Fett gefüllt (Kappe et al., 2010). In Assoziation zu Resten hämatopoetischem Gewebes befinden sich vermehrt Makrophagen. Diese Makrophagen besitzen einen ovalen, exzentrischen Kern und einen prominenten Nukleolus mit basophilem Chromatin. Das Zytoplasma dieser Zellen ist angefüllt und weist Vakuolen auf, wie sie bei aktivierten Makrophagen vorkommen. Teilweise ist Hämophagozytose nachweisbar (Pardon et al., 2009b). Die pathologischen Veränderungen des Knochenmarks können als Ursache für die gesteigerte Blutungsneigung und Immunsuppression betroffener Kälber angesehen werden (Buck et al., 2011). Bisher wurden nur in wenigen Fällen wiederholt Knochenmarksaspirationen im Verlauf der Krankheit durchgeführt. Vermutlich handelt es sich aber um einen progressiven Prozess, bei dem im Anfangsstadium der Erkrankung noch Blutstamm- und Blutvorläuferzellen vorhanden sind, deren Zahl aber mit dem Fortschreiten der Krankheit bis zur totalen Aplasie abnimmt (Pardon et al., 2010).

In Lymphknoten und Milz betroffener Kälber ist in T- und B-Zellarealen eine lymphoide Depletion nachweisbar (Lymphadenopathie), die auf Apoptose der Lymphozyten zurückzuführen ist (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). In der Milz sind diese Veränderungen sowohl in den periarteriellen lymphatischen Scheiden, als auch in den

Lymphfollikeln nachweisbar. Bei Ausstrichen von Milzpunktaten werden stets aktivierte Lymphozyten (Immunoblasten) und Plasmazellen gefunden (Pardon et al., 2009b). Die Lymphknoten weisen kortikal und parakortikal eine Lymphozytendepletion auf. Lymphoide Depletionen im Thymus wurden in einer Studie nur bei 18 % der untersuchten Kälber beobachtet (Pardon et al., 2009b).

3.1.4 Epidemiologie

Im Jahr 2007 wurden erstmals vermehrt Fälle von hämorrhagischer Diathese bei Kälbern in Deutschland wahrgenommen (Friedrich et al., 2009c). Zunächst blieb unklar, ob es sich um eine neuartige Erkrankung handelt, oder ob das Krankheitsbild bereits längere Zeit unentdeckt bestanden hat. Aufgrund der Offensichtlichkeit klinischer Symptome und der durch die Krankheit verursachten hohen Kälberverluste auf einzelnen Betrieben war ein neuartige Erkrankung wahrscheinlicher (Friedrich et al., 2009c). In der Vergangenheit hatte es immer Einzelfälle von hämorrhagischer Diathese bei Rindern gegeben. In den Jahren 2006-2007 trat eine sprunghafte Häufung dieser Fälle zugleich in Deutschland (Friedrich et al., 2011), Belgien (Pardon et al., 2009a), Frankreich (Corbiere et al., 2009), Großbritannien (Ellis-Iversen et al., 2009) und Italien (Gentile et al., 2009) auf. In den folgenden Jahren kamen auch Berichte über BNP aus weiteren europäischen Ländern, unter anderem aus Spanien (Armengol et al., 2010), den Niederlanden (Smolenaars et al., 2009) und Irland (Sanchez-Miguel et al., 2010). Im August 2011 wurden erste Fälle aus Neuseeland berichtet. Neuseeland stellt damit das einzige Land außerhalb Europas dar, in dem bestätigte Fälle aufgetreten sind (ProMED-mail number: 20110828.2636). Insgesamt wurden europaweit nach Angaben des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI), Langen, Deutschland mehr als 4500 Fälle gemeldet, davon allein in Deutschland über 3000 (Stand 28. Februar 2011, http://www.pei.de/cln_101/nn_1686480/DE/infos/presse/pm/2011/06.html). Die Mehrheit der BNP-Fälle trat in den Jahren 2008 und 2009 auf, seit 2011 sind die Fallzahlen rückläufig (Doll, K., persönliche Kommunikation). In Betrieben variiert die Zahl betroffener Kälber von Einzelfällen bis zu 5-10 % des gesamten Bestandes (Bastian et al., 2011). Schätzungen der Inzidenz der Erkrankung liegen bei 0,00005 % (Friedrich et al., 2011). Im jahreszeitlichen Ablauf wird beschrieben, dass es zu einer Häufung von Fällen im Frühjahr und den Sommermonaten kommt (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010). Diese Beobachtung konnte an der Klinik für Wiederkäuer der JLU Gießen nicht bestätigt werden (Doll, K., persönliche Kommunikation).

Das Geschlecht der Kälber scheint bei der Entwicklung von BNP keine Rolle zu spielen, da

beide Geschlechter zu gleichen Teilen betroffen sind (Bell, 2011; Pardon et al., 2009b). Ebenso wenig scheint eine Rasseprädisposition vorzuliegen. Das Auftreten von BNP wurde unter anderem für die Rassen Holstein-Friesian, Fleckvieh, Weißblaue Belgier, Aberdeen Angus, Charolais, Blonde d'Aquitaine, Montebéliarde und Limousin beschrieben (Bell et al., 2009a; Corbiere et al., 2009; Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2009a). Auch das Alter der Muttertiere scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung von BNP zu haben. In einer Studie mit 84 an BNP erkrankten Kälbern waren 40 % der Muttertiere Erstkalbinnen, 30 % Zweitkalbinnen, 25 % Drittkalbinnen und 4 % Viertkalbinnen (Pardon et al., 2009a). Vatertieren scheint eine gewisse Rolle bei der BNP-Pathogenese zuzukommen. So sind einige Bullen signifikant häufiger als Vatertiere von Kälbern, die BNP entwickeln, vertreten als andere (Ballingall et al., 2011).

Interessanterweise sind keine BNP-Fälle aus Ländern bekannt, die frei von boviner Virusdiarrhö (BVD) sind oder nicht gegen das bovine Virusdiarrhö-Virus (BVDV) impfen, so z.B. Dänemark, Österreich oder die Schweiz (Friedrich et al., 2011). Bis auf einen beschriebenen Einzelfall (Kaske et al., 2009) und einen unbestätigten BNP-Fall (Corbiere et al., 2009), wurden alle Muttertiere, die BNP betroffene Kälber hervorgebracht haben, mit der gleichen inaktivierten Vakzine gegen BVDV geimpft. Dabei handelt es sich um den Impfstoff PregSure® BVD (Pfizer GmbH, Karlsruhe) (Bell et al., 2010; Corbiere et al., 2009; Friedrich et al., 2011; Pardon et al., 2009a; Schröter et al., 2011).

3.1.5 BVD-Impfung

Bei der Bekämpfung der BVD spielt neben der Erkennung und Eliminierung von persistent infizierten Tieren die Impfung auf Grund der hohen BVD-Prävalenz in Deutschland eine zentrale Rolle (Lindberg et al., 2006). Insbesondere die Vermeidung der diaplazentaren Infektion ist Hauptaufgabe der Impfung. Daher wird dem „fetalen Schutz“ schon bei der Zulassung von Impfstoffen Rechnung getragen.

Bei den in Deutschland angewendeten Impfstoffen gegen BVD ist grundsätzlich zwischen Vakzinen mit inaktivierten Viren (sog. Totimpfstoffe) sowie Vakzinen auf der Basis vermehrungsfähiger Viren (sog. Lebendimpfstoffe) zu unterscheiden (König et al., 2006). Die Schutzwirkung der risikoärmeren Totimpfstoffe wird kontrovers diskutiert (Bolin, 1995; Patel et al., 2002; Zimmer et al., 2002). Vermeintlich sind die Lebendimpfstoffe wirksamer. Allerdings kann es beim Einsatz von Lebendimpfstoffen zur Ausscheidung von vermehrungsfähigem Virus kommen. Eine Infektion trächtiger Tiere mit diesem Virus führt zu einer diaplazentaren Infektion des Fetus.

	Bovilis® BVD-MD	Bovidec®	Mucobovin®	PregSure® BVD
Hersteller	Intervet Deutschland GmbH	Virbac Tierarzneimittel GmbH	Merial GmbH	Pfizer GmbH
Virusstämme	St. C86 (cp BVDV 1a)	St. KY1203nc (ncp BVDV 1a)	St. Aveyronite (ncp BDV) New York-St. (ncp BVDV 1b)	St. 5960 (cp BVDV 1a)
Wirtssystem	k.A.	Kälbernierzellen	Fetale Lammnierzellen	Rindernierzellen
Im Handel	ja	ja	ja	nicht mehr seit 2010
Zugelassen in D	ja	ja	ja	nicht mehr seit 09/2011
Zulassung "fetaler Schutz"	ja	ja	nein	ja
Adjuvans	Aluminium ³⁺ (6 - 9mg)	Quil A 1,0 mg/Impfdosis	öliges Adjuvans	Procision-A® : 0,164 ml/Dosis Procision-A® enthält je 1 ml: Quil A 3,050 mg Cholesterol 3,050 mg Amphigen® Base 0,076 ml Drakeol 5 (fl. Paraffin) 0,228 ml
Sonstige Bestandteile	Methyl-parahydroxybenzoat Propylenglykol Tromethamin Gewebekulturmedium Salzsäure- oder Tromethamin-Lösungen Wasser für Injektionszwecke	Thiomersal 0,013 % Lösungsmittel bis 4,0ml Spuren von Polymyxin B, Nystatin, Neomycin	Benzylalkohol max. 10,4 mg	Thiomersal 0,18 mg
Impfdosis	2 ml	4 ml	2 ml	2 ml
Mindestalter zur Impfung	8 Monate	4 Monate	4 Monate	im zuchtreifen Alter
Grundimmunisierung	zweimal im Abstand von 4 Wo. zweimal im Abstand von 3 Wo. zweimal im Abstand von 4 Wo. zweimal im Abstand von 3 Wo.			
Wiederholungsimpfung	4 Wo. vor Beginn der Trächtigkeit oder alle 6 Monate	einmal jährlich	1-2 Monate vor Belegung	mind. 14 Tage vor Belegung einmal jährlich

Tabelle 1: In Deutschland zwischen 2005 - 2010 zugelassene Impfstoffe mit inaktiviertem Virus gegen BVD.

Dieses Risiko lässt sich durch das so genannte zweistufige Impfverfahren minimieren. Dabei erfolgt die Grundimmunisierung mit einer Totvakzine, die die Ausscheidung von Virus der im Abstand einiger Wochen applizierten Lebendvakzine deutlich verringert (Frey et al., 1995). Bei der reinen Grundimmunisierung mit Totimpfstoffen sind zwei Impfungen im Abstand weniger Wochen erforderlich.

Zwei Genotypen von BVDV (Typ 1 und 2) sind bekannt, die anhand von Unterschieden in der 5'-untranslatierten Region des Virusgenoms differenziert werden (Pellerin et al., 1994). In Deutschland zugelassene Vakzine basieren bisher ausschließlich auf BVDV-Typ-1-Stämmen. Zwar konnte eine Kreuzneutralisation von Typ-2-Stämmen nach Impfung nachgewiesen werden. Inwieweit diese aber einen vollständigen Schutz gegen die diaplazentare Übertragung von Typ-2-Stämmen darstellt, ist unklar (Paton et al., 1999).

Eine Zusammenstellung der zwischen 2005-2010 in Deutschland zugelassenen Totvakzine zeigt Tabelle 1.

3.1.6 PregSure® BVD-Vakzine

Da epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen BNP und der PregSure® BVD-Vakzine vermuten lassen, sollen im Folgenden kurz einige Charakteristika dieses Impfstoffes besprochen werden.

PregSure® BVD war in der Lage, wesentlich höhere neutralisierende Antikörpertiter zu induzieren, als die anderen in Deutschland zugelassenen inaktivierten BVD-Impfstoffe (König et al., 2006; Raue et al., 2011). So verwundert es nicht, dass sich dieser Impfstoff in Europa großer Beliebtheit erfreute und zwischen 2005 und 2010 circa 14 Millionen Dosen verkauft worden sind. Neben den Titern gegen BVDV-Typ-1-Stämme wurden auch kreuzneutralisierende Antikörpertiter gegen BVDV-Typ-2-Stämme in PregSure® BVD geimpften Tieren vorgefunden (Salt et al., 2004).

Wodurch Tiere, die mit PregSure® BVD geimpft worden sind, signifikant höhere neutralisierende Antikörpertiter entwickeln als Tiere, die mit anderen inaktivierten BVD-Vakzinen immunisiert worden sind, ist unklar. Möglicherweise spielen die Zusammensetzung der PregSure® BVD-Vakzine, die neuartige Adjuvanstechnologie oder die im Impfstoff enthaltene Antigen dosis eine Rolle (König et al., 2006). Die PregSure® BVD-Vakzine enthält einen cp BVDV-1-Stamm, der auf bovinen Nierenzellen hergestellt wird. Darüber hinaus wird ein sehr potentes Adjuvans verwendet. Dieses besteht aus Quil A, Cholesterin und Amphigen® (Pfizer, 2004; Salt et al., 2004). Quil A ist ein Gemisch verschiedener Saponine, die aus der Rinde des

südamerikanischen Seifenrindenbaumes (*Quillaja saponaria* Molina) extrahiert werden. Es formt zusammen mit Cholesterin und Antigenen (bei PregSure[®] BVD besonders mit den Virushüllprotein E1 und E2) sogenannte „immune stimulating complexes“ (ISCOM) (Lendemans et al., 2005; Pham et al., 2006). Amphigen[®] ist ein Öl, das vom Lecithin abstammende Phospholipide und Glykolipid-Surfactants enthält. Das Adjuvans wird zusammen mit dem Antigen in einem technischen Prozess mit hohem Druck und starken Scherkräften behandelt. Dadurch nehmen zum einen die Amphigen[®]-Mikrotröpfchen eine homogene Größe von 0,1 bis 0,2 µm an. Zum anderen lagern sich die Quil-A-Cholesterin-Antigen-Nanokomplexe auf die Oberflächen dieser Mikrotröpfchen, was nach Herstellerangaben die Antigenität verbessern soll (Pfizer, 2004). Von ISCOMs ist bekannt, dass sie sehr effizient sowohl Antigen-spezifische AK (IgG₁ und IgG₂) induzieren als auch eine ausgeprägte T-Zellantwort auslösen (Platt et al., 2008; Sjolander et al., 1997). Das genaue Prinzip der Adjuvanswirkung von ISCOMs ist nicht bekannt (Singh et al., 2003).

Im Jahre 2004 wurde PregSure[®] BVD erstmals in Europa verkauft. Der Vertrieb des Impfstoffes wurde nach Evidenzen für einen Zusammenhang mit BNP im März 2010 in Deutschland und im Juli 2010 europaweit eingestellt (Pfizer, 2010).

3.2 Bisherige Untersuchungen zur Ätiologie der BNP

Schon vor dem ersten Auftreten von BNP im Jahre 2007 wurden in der Literatur Einzelfälle von hämorrhagischen Diathesen in Folge von Panzytopenien bei Rindern beschrieben. Bei vielen dieser Fallbeschreibungen konnte keine Ursache für die Panzytopenie ermittelt werden (Weiss et al., 1985). Sie wurden als idiopathisch eingestuft. So zum Beispiel der Fall einer fünfjährigen Holstein-Friesian-Kuh, bei der Thrombozytopenie und aplastische Anämie nach einer Impfung mit einem polyvalenten Botulismus-Impfstoff aufgetreten sind (Yeruham et al., 2003).

Ein anderer Fall, bei dem die Symptome denen von BNP stark ähneln, wurde 2007 in Japan beschrieben (Shimada et al., 2007). Ein elf Tage altes Holstein-Friesian-Kalb wurde mit Meläna, blassen Schleimhäuten und Fieber vorgestellt. Auf Grund einer mangelnden Koagulation traten nach Injektionen starke Nachblutungen auf, die zu Blutverkrustungen im Fell des Tieres führten. Das Blutbild wies eine massive Thrombo- und Leukozytopenie sowie eine Anämie auf. *Post mortem* wurde im Knochenmark eine hochgradige Hypoplasie mit einer Reduktion aller Blut-Vorläuferzelllinien festgestellt. Eine Ursache konnte nicht ermittelt werden.

Grundlage der hämorrhagischen Diathesen im Verlauf der BNP ist die Depletion des Knochenmarks, die Thrombozytopenie und Leukopenie nach sich zieht. Bei BNP handelt es

sich um eine Thrombozytopenie auf Grund einer Thrombozyten-Bildungsstörung. Grundsätzlich können diese angeboren oder erworben sein. Bei den erworbenen Thrombozyten-Bildungsstörungen kommen toxische, physikalische, immunbedingte und infektiöse Ursachen in Frage (Kappe et al., 2010).

3.2.1 Genetische Ätiologie

Spezifische Mutationen, die Koagulationsstörungen bei Rindern hervorrufen, sind bekannt, unter anderem in den Genen des Koagulationsfaktors VIII (bovine Hämophilie A) (Khalaj et al., 2009) und des Koagulationsfaktors XI (Marron et al., 2004). Bei Untersuchungen im Koagulationsfaktor-XI-codierenden Gen konnten keine für BNP spezifischen Mutationen gefunden werden (Krappmann et al., 2011). Trotzdem wiesen Krappmann et al. ausdrücklich darauf hin, dass eine genetische Prädisposition oder andere Umweltfaktoren an der Pathogenese der BNP beteiligt sein können. In einer anderen Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BNP und dem Genort für MHC-Klasse II *DRB3* bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian festgestellt werden (Ballingall et al., 2011).

3.2.2 Toxische Ätiologie

Einige Toxine und Pharmaka sind dafür bekannt, dass sie bei Rindern hämorrhagische Diathesen auslösen können, die auf eine Depletion des Knochenmarks zurückzuführen sind.

3.2.2.1 Sulfonamide

In der Literatur finden sich Berichte über Thrombo- und Leukozytopenien bei Mensch und Hund, die mit einer Behandlung mit Sulfonamiden in Zusammenhang stehen (Macaulay, 1954; Weiss et al., 1987). Ebenfalls wird von idiosynkratischen Reaktionen (von der Dosis unabhängig) nach der Gabe von Sulfonamiden bei Mensch und Hund berichtet, denen vermutlich ein immunvermitteltes Geschehen zu Grunde liegt. Ihre Ursache ist nicht eine Depletion des Knochenmarks, sondern eine direkte Zerstörung peripherer Blutzellen (Trepanier, 2004).

Im Zusammenhang mit hämorrhagischen Diathesen gibt es beim Rind mehrere Berichte, unter anderem den eines 14 Tage alten Holstein-Friesian-Kalbes. Bei diesem traten nach der Gabe eines Sulfadoxin-Trimethoprim-Gemisches blutiger Durchfall und erhöhte Blutungsneigung auf. Das Blutbild wies eine Thrombo- und Neutropenie sowie eine Anämie auf. Bei der

pathologischen Untersuchung wurden Hämorrhagien in Serosen und Skelettmuskulatur beobachtet. Ursache hierfür war eine ausgeprägte Hypoplasie des Knochenmarks (Ammann et al., 1996). Sulfonamide konnten zwar in einigen Proben von BNP-Kälbern nachgewiesen werden, wurden aber als Therapieversuche der BNP und nicht als deren Auslöser gewertet (Kappe et al., 2010).

3.2.2.2 Furazolidon

Die chronische Furazolidonvergiftung (N-[5-Nitro-2furfuryliden]-3-amino-2-oxazolidon) bei Kälbern geht ebenfalls mit hämorrhagischen Diathesen einher. Diese treten auch bei früher üblicher Dosierung dieses Antibiotikums aus der Gruppe der Nitrofurane auf. Versuche mit einer täglichen, oral verabreichten Dosis von 8,5 mg/kg, 6 mg/kg und 4 mg/kg Körpergewicht (KGW) führten zu einer Thrombozytopenie, Neutropenie und final auch zu einer Anämie. Klinisch überwogen Petechien, Ekchymosen und Sugillationen in Skelettmuskulatur und anderen Organen sowie Meläna. Das Auftreten von Krankheitssymptomen korrelierte mit der Dosis. Bei einer höheren Dosis (8,5 mg/kg KGW) traten Krankheitssymptome nach 4-5 Wochen auf, der Tod trat nach 7-8 Wochen ein. Bei niedriger Dosierung war der Verlauf zeitversetzt, klinische Symptome und der Tod traten später ein. Die pathologische Untersuchung ergab eine weitgehende Aplasie des Knochenmarks. Es konnte gezeigt werden, dass die Megakaryozyten besonders Furazolidon-empfindlich zu sein scheinen. Ihre Zahl war schon nach einwöchiger Furazolidongabe stark dezimiert. Der genaue Mechanismus der Furazolidontoxizität auf das Knochenmark ist nicht bekannt (Hoffmann-Fezer et al., 1974; Hofmann et al., 1974).

Zwar ähneln die Symptome der Furazolidonvergiftung denen von BNP, doch treten diese bei therapeutischen Dosen des Medikamentes erst viel später auf. Außerdem ist der Einsatz von Nitrofuranen (einschließlich Furazolidon) durch die Verordnung (EU) Nr. 2377/90, geändert durch die Verordnung (EU) Nr. 470/2009 und (EU) Nr. 37/2010, bei lebensmittelliefernden Tieren verboten. In Proben von untersuchten BNP-Kälbern konnte kein Furazolidon nachgewiesen werden (Friedrich et al., 2009c).

3.2.2.3 Mykotoxine

Trichothezene sind Mykotoxine, die als sekundäre Stoffwechselprodukte unterschiedlicher Pilzarten (z.B. Fusarium, Trichothecium) auf befallenem Futter oder Stroh entstehen (Stöber, 2007).

Die stark zytotoxischen Toxine T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Diazetoxyszirpenol (DAS) sind die wichtigsten Mykotoxine, die zu hämatologischen Veränderungen führen. Neben anderen Symptomen kommt es nach der Aufnahme mit dem Futter zu Leukozytopenie und hämorrhagischen Diathesen auf Grund einer massiven Thrombozytopenie. Die Blutbildveränderungen sind auf eine Depletion des Knochenmarks zurückzuführen (Coppock et al., 1989; Parent-Massin, 2004; Stöber, 2007). Schon 8 Stunden nach intravenöser Gabe von 0,5 mg DAS/kg KGW konnten massive Nekrosen im hämatopoetisch aktiven Gewebe des Knochenmarks nachgewiesen werden. Allerdings kommt es nur bei schweren Vergiftungen zum Tod des Tieres (Stöber, 2007). Mykotoxine konnten in verdächtigen Futterproben BNP-betroffener Betriebe nicht nachgewiesen werden (Friedrich et al., 2009c)

3.2.2.4 DCVC

Bereits 1916 wurde eine Krankheit mit hämorrhagischem Syndrom und Aplasie des Knochenmarks bei Kälbern beschrieben (Dürener Krankheit), die mit der Aufnahme von Trichlorethylen-extrahiertem Sojaschrot in Verbindung stand (Brüggemann et al., 1958; Stockman, 1916). Als toxischer Faktor wurde S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-Cystein (DCVC) identifiziert, das beim Erhitzen von Trichlorethylen mit cysteinhaltigen Resten des Sojabohnenproteins entstehen kann (McKinney et al., 1957; Terracini et al., 1965). Studien haben gezeigt, dass 0,33 bis 2,2 mg DCVC/kg KGW intravenös oder oral verabreicht ausreichend sind, um innerhalb von 10 Tagen ein hämorrhagisches Syndrom mit Thrombozytopenie, Leukozytopenie und später auch Lymphopenie bei Kälbern auszulösen (McKinney et al., 1957; Schultze et al., 1959). Die Tiere zeigen petechiale Blutungen auf den Schleimhäuten und Blutbeimengungen im Kot. *Post mortem* werden petechiale Blutungen in der Serosa des Verdauungstraktes und großflächige intramuskuläre und subpleurale Blutungen vorgefunden. Das Knochenmark betroffener Tiere weist eine hochgradige Aplasie auf (Lock et al., 1996). DCVC und sein Metabolit N-Acetyl-DCVC konnten in Proben von untersuchten BNP-Kälbern nicht nachgewiesen werden (Friedrich et al., 2009c).

3.2.2.5 Ptaquilosid

Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) ist eine weltweit vorkommende Pflanze. Die akute Adlerfarnvergiftung (akutes hämorrhagisches Syndrom) wird durch den Inhaltsstoff Ptaquilosid (Norsequiterpen) ausgelöst, der zum Erscheinen klinischer Symptome über mehrere Wochen

mit frischem oder getrocknetem Adlerfarn aufgenommen werden muss (Fenwick, 1989; Stöber, 2007; Yamada et al., 2007). Experimentell konnte das akute hämorrhagische Syndrom bei Kälbern durch eine tägliche Gabe von 10 g Adlerfarn/kg KGW über 53-58 Tage ausgelöst werden (Anjos et al., 2009). Dabei ist zu beachten, dass die Konzentration von Ptaquilosid je nach Herkunft des Adlerfarns und der Jahreszeit starken Schwankungen unterliegt (Yamada et al., 2007). Ptaquilosid ist in der Milch nachweisbar und könnte so vom Kalb aufgenommen werden (Alonso-Amelot et al., 1996).

Die akute Adlerfarnvergiftung ist charakterisiert durch hämorrhagische Diathesen und Meläna. Eine massive Thrombozytopenie und Neutropenie sind nachweisbar, im Endstadium kann eine Anämie hinzukommen. Der Thrombozytopenie und Neutropenie liegt eine Depletion des Knochenmarks zu Grunde (Anjos et al., 2009; Stöber, 2007; Yamada et al., 2007). Die Ursache für die Myelotoxizität des Ptaquilosids ist nicht bekannt (Yamada et al., 2007). Ptaquilosid konnte in Futterproben BNP-betroffener Betriebe nicht nachgewiesen werden (Kappe et al., 2010).

3.2.3 Infektiöse Ätiologie

Eine Reihe von viralen und bakteriellen Erregern können BNP-ähnliche Symptome hervorrufen.

3.2.3.1 Bovine Virusdiarrhö

Besonders das Virus der BVD ist dafür bekannt, ein hämorrhagisches Syndrom auszulösen. Als behülltes Einzelstrang-RNS-Virus positiver Polarität zählt BVDV zum Genus *Pestivirus* in der Familie der *Flaviviridae*. Es treten zwei Genotypen von BVDV (Typ 1 und 2) auf (Pellerin et al., 1994). BVDV-Typ-1-Stämme wurden weltweit isoliert, während die Mehrzahl der BVDV-Typ-2-Isolate aus Nordamerika stammen (Ridpath et al., 2000)

Das Krankheitsbild des „hämorrhagischen Syndroms“ wird vor allem durch hochvirulente Stämme des ncp BVDV-Typ-2 ausgelöst (Buck et al., 2011; Keller et al., 2006). Das Krankheitsbild beinhaltet Durchfall, hochgradige Leukopenie (stark ausgeprägte Neutropenie), Thrombozytopenie und manchmal Blutungen. Es führt zu einer hohen Morbidität und Mortalität (bis zu 30 % erkrankter Tiere) bei Kälbern und erwachsenen Rindern (Keller et al., 2006). Erste klinische Symptome treten nach experimenteller Infektion fünf bis sieben Tage nach Inokulation des Virus auf (Walz et al., 1999). Ob die Lymphopenie und Thrombozytopenie aus einer Zerstörung von Blutvorläuferzellen im Knochenmark oder einer Zerstörung peripherer Blutzellen

resultieren, ist umstritten. Im Knochenmark nachweisbar sind bei ncp BVDV-Typ-2 infizierten Tieren eine Megakaryozytenhyperplasie sowie eine Infektion von Zellen der myeloiden Reihe (Corapi et al., 1989; Keller et al., 2006; Spagnuolo et al., 1997; Walz et al., 1999). Ein Nachweis von BVDV-Antigen oder dem viralen Genom gelang in Proben von BNP-Kälbern in den meisten Studien nicht (Buck et al., 2011; Friedrich et al., 2009c; Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). Lediglich in einer Studie, in der Proben von 101 BNP-Kälbern auf BVDV untersucht wurden, konnte bei einem Kalb mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein BVDV-Typ-1-Stamm identifiziert werden (Willoughby et al., 2009). Daher wird ein Zusammenhang zwischen BVD und BNP ausgeschlossen.

3.2.3.2 Epizootic hemorrhagic disease und Blauzungenkrankheit

Die Epizootische Hämorrhagie der Hirsche (EHD) kommt wie die Blauzungenkrankheit (BT) als Differentialdiagnose zu BNP in Betracht (Pardon et al., 2010). EHD wird durch das zur Familie *Reoviridae* und zum Genus *Orbivirus* gehörende Epizootic Haemorrhagic Disease Virus (EHDV) ausgelöst. Es ist eng mit dem Bluetongue Virus (BTV) verwandt (Temizel et al., 2009). Wie BTV wird auch EHDV durch Mücken aus der Gattung *Culicoides* übertragen (Jones et al., 1977). EHDV ist in Afrika, Asien, Nordamerika und jüngst auch in einigen Nachbarstaaten Europas nachgewiesen worden (Savini et al., 2011; Temizel et al., 2009). Nach seiner Erstbeschreibung in den 1950er Jahren in Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*), wurde die Krankheit in weiteren Wildwiederkäuer-Arten wie Maultierhirschen (*Odocoileus hemionus*), Rothirschen (*Cervus elaphus*), Bisons (*Bison bison*), Pronghorn-Antilopen (*Antilocapra americana*) und Dickhornschafen (*Ovis canadensis*) nachgewiesen (Dubay et al., 2004; Nol et al., 2010; Shope et al., 1960). Die Symptome bei EHD sind ähnlich denen von BT, es kommt zu Anorexie, blutigem Nasen- und Maulausfluss, Ödemen und hämorrhagischer Enteritis (Fischer et al., 1995; Yadin et al., 2008). Bei Rindern, Schafen und Ziegen können bei einer Infektion mit EHDV ähnliche Symptome auftreten (Temizel et al., 2009; Yadin et al., 2008). Allerdings konnten nach experimenteller Infektion von Rindern mit EHDV keine klinischen Symptome, wohl aber eine lange andauernde Virämie und anschließende Serokonversion festgestellt werden (Aradaib et al., 1994; Batten et al., 2011). EHDV war mittels PCR in Proben von BNP-Kälbern nicht nachweisbar (Pardon et al., 2010).

Auf Grund des fast zeitgleichen Auftretens von Bluetongue Virus Serotyp 8 (BTV-8) und BNP in Deutschland wurde ein Zusammenhang zwischen den beiden Krankheiten vermutet. Alle Tests zum Nachweis von BTV-8 in BNP-Kälbern blieben aber negativ (Buck et al., 2011; Kappe et al.,

2010; Pardon et al., 2010). Viele Landwirte machten die bundesweite Impfung gegen die Blauzungenkrankheit für das Auftreten von BNP verantwortlich. Kappe et al. (2010) sehen hierin allerdings keinen Zusammenhang, da erste BNP-Fälle schon 2007 aufgetreten sind, die bundesweite Blauzungen-Impfkampagne aber erst 2008 begonnen wurde (Kappe et al., 2010).

3.2.3.3 Weitere Viruskrankheiten

Willoughby et al. untersuchten Proben mehrerer BNP-Kälber auf das Vorhandensein verschiedener Viren. Bovines Respiratorisches Syncytial Virus und Bovines Parainfluenzavirus Typ 3 waren in neun Fällen mittels PCR nicht nachweisbar. Mikroarrayanalysen auf Ribonukleinsäuren (RNS) von RNS-Viren verliefen in 3 getesteten Tieren negativ, in einem Tier konnte Coronavirus-RNS im Dünndarm detektiert werden. Weitere Viren und viral bedingte Krankheiten, auf die mit negativem Ergebnis getestet worden ist: Torovirus (Fam.: *Coronaviridae*), Ebola-Virus (Fam.: *Filoviridae*), Krim-Kongo-Fieber-Virus (Fam. *Bunyaviridae*, Genus: *Arbovirus*), Seoul Virus (Fam.: *Bunyaviridae*, Genus: *Hantavirus*), Rifttal-Fieber Virus (Fam.: *Bunyaviridae*, Genus: *Phlebovirus*) und Kyasanur-Wald-Fieber-Virus (Fam.: *Flaviviridae*) (Willoughby et al., 2009).

Kappe et al. konnten mittels PCR ein Virus in Organproben von fünf von 25 BNP-Kälbern und von einem von acht Kontrolltieren amplifizieren. Das Virusgenom wies eine Nukleotidsequenz auf, die zu 99 % mit der des Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) identisch ist, daher wurde der Stamm PCV2-Ha08 genannt (Kappe et al., 2010). Eigentlich ist PCV2 bei Schweinen für das „post-weaning multisystemic wasting syndrome“ und das porcine Dermatitis- und Nephropathiesyndrom sowie Fruchtbarkeitsstörungen verantwortlich (Segales et al., 2005). Das mit PCV2 verwandte Virus der Infektiösen Anämie der Küken löst in Küken Symptome ähnlich denen von BNP bei Kälbern aus (Kappe et al., 2010). Die Existenz von PCV2 in Kälbern wurde zuvor bereits gezeigt (Nayar et al., 1999). Kappe et al. diskutieren einen möglichen Zusammenhang zwischen der Detektion von PCV2 und dem Auftreten von BNP. Trotz umfangreicher virologischer Untersuchungen konnten in andere Studien in Proben von BNP-Kälbern kein Circovirusgenom gefunden werden (Schröter et al., 2011; Willoughby et al., 2010).

3.2.3.4 Bakterielle Erreger

Infektiöse Ursachen in Form von Septikämien können ebenfalls eine Ursache für Panzytopenien sein (Valli, 2007). Kappe et al. (2010) testeten deshalb Organproben (Lunge, Leber, Milz, Niere

und Dünndarm) von 56 BNP-Kälbern auf potentiell pathogene Bakterien. *E. coli* wurde in den meisten Kälbern nachgewiesen ($n = 29$), gefolgt von *C. perfringens* ($n = 14$), *P. multocida* ($n = 3$) und *P. aeruginosa* ($n = 3$). In den Proben von 16 BNP-Kälbern konnten keine bakteriellen Pathogene nachgewiesen werden. Obwohl ein weites Spektrum an bakteriellen Pathogenen gefunden worden ist, konnte kein für BNP spezifisches Bakterium nachgewiesen werden. Somit wird eine bakterielle Ätiologie der BNP ausgeschlossen (Kappe et al., 2010).

3.2.4 Nachweis von Alloantikörpern in Serum und Kolostrum von BNP-Muttertieren

Vermeehrt wurde über eine immunpathologische Ätiologie der BNP spekuliert (Doll et al., 2010). Die These einer immunpathologischen Ätiologie wurde dadurch gestützt, dass die Krankheit durch Kolostrum von BNP-Muttertieren, der ersten IgG-reichen Milch bei Wiederkäuern, in Kälbern reproduzierbar ist (Friedrich et al., 2009b). Schließlich konnte die Existenz von Alloantikörpern im Serum von BNP-Muttertieren nachgewiesen werden (Bridger et al., 2011). Alloantikörper (Allo-AK) sind Antikörper, die in einem Individuum einer Spezies gebildet werden und an Antigene in anderen Individuen der gleichen Spezies binden können.

Bridger et al. verwendeten dazu Leukozytenisolate aus gesunden Kälbern, die mit Seren von BNP-Muttertieren und Kontrolltierseren von Muttertieren ohne BNP-Kalb inkubiert wurden. In der Durchflusszytometrie wurde die AK-Bindung mit einem Fluoresceinisothiocyanat-markierten Schaf-anti-Rind-IgG bestimmt. Dabei war die mittlere Fluoreszenzintensität bei der Benutzung von BNP-Muttertierseren unabhängig von den benutzten Leukozyten signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Dieser Test wurde mit Leukozyten-subpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) wiederholt. Dabei wurde gezeigt, dass die Allo-AK besonders effektiv an die Leukozyten- und Monozyten-Subpopulationen, aber weniger gut an die Granulozyten binden. Bridger et al. fanden jedoch auch heraus, dass die Alloantikörperbindung an Leukozyten unterschiedlicher Kälber variierte.

In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob das Kolostrum bei der Übertragung der Antikörper von der Mutter auf das Kalb eine Rolle spielt. Dazu wurden Kälber von BNP-Muttertieren mit deren Kolostrum getränkt. Eine hämatologische Beprobung der Kälber fand vor Kolostrumaufnahme, 0, 3, 6, 12, 24 h nach Kolostrumaufnahme und danach täglich bis zum 21. Lebenstag statt. Aus den Blutproben wurden die Leukozyten gewonnen und mit dem Fluoresceinisothiocyanat-markierten Schaf-anti-Rind-IgG inkubiert. Im Durchflusszytometer konnte mittels der relativen Fluoreszenzintensität schon wenige Stunden nach Kolostrumaufnahme (Höhepunkt sechs h nach Kolostrumaufnahme) eine Bindung von Allo-AK

an Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden. Die Menge an zellgebundenem IgG korrelierte dabei mit den klinischen BNP-Symptomen, die die Kälber später entwickelten. Bereits am dritten Tag nach Kolostrumaufnahme wurde in Knochenmarkspunktaten der Kälber eine leichte Panzytopenie beobachtet (Bridger et al., 2011).

Ein eventueller Zusammenhang zwischen BNP und dem Auftreten von Allo-AK zeigt große Ähnlichkeit zu einer Krankheit in der Humanmedizin. Dabei handelt es sich um die Fetale/Neonatale Alloimmune Thrombozytopenie (FAIT/NAIT). Das Syndrom wird durch die diaplazentare Übertragung von maternalen Antikörpern gegen paternale Antigene im Neonaten ausgelöst. In den meisten Fällen richten sich diese Allo-AK gegen das humane Thrombozytenantigen (HPA) (Kaplan, 2006). Allerdings sind auch Fallbeschreibungen bekannt, bei denen das Zielantigen der MHC I (human leukocyte antigen [HLA]) ist (De Tar et al., 2002; Grainger et al., 2002; Gramatges et al., 2009; Moncharmont et al., 2004; Starcevic et al., 2010; Thude et al., 2006). MHC I wird beim Menschen in großer Zahl auf Thrombozyten exprimiert (Kao et al., 1986). Beim Menschen können Antikörper ab der 14. Schwangerschaftswoche die Plazentarschranke frei überwinden (Kaplan, 2006). Beim Wiederkäuer ist dieses durch die *Plazenta epitheliochorialis* nicht möglich, weshalb Antikörper zur passiven Immunisierung erst mit dem Kolostrum nach der Geburt auf den Neonaten übertragen werden (Bridger et al., 2011). Das Phänomen der Alloantikörperübertragung mit dem Kolostrum wurde bereits für Kälber und Fohlen bei der Neonatalen Hämolytischen Isoerythrolyse beschrieben (Scott et al., 1978; Stormont, 1975).

3.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine genauere Vorstellung über die Ätiologie und möglicherweise die Pathogenese der BNP zu erhalten. Dazu sollen ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Allo-AK in BNP-Muttertieren und dem Impfstoff PregSure® BVD untersucht werden.

Im Vordergrund steht die Identifizierung des/der Zielantigen(e) der Allo-AK. In einem weiteren Schritt soll dann geklärt werden, ob mögliche Zielantigene Bestandteil der PregSure® BVD-Vakzine sind und damit der Impfstoff die Allo-AK induziert. Durch eine vergleichende Analyse mit BVD-Impfstoffen anderer Hersteller könnten dann Vermutungen darüber angestellt werden, warum allein der PregSure® BVD-Impfstoff mit BNP signifikant assoziiert ist.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fa. Roth
Acetonitril	Fa. Roth
Acrylamid (reinst)	Fa. AppliChem
Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3)	Fa. Roth
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Fa. Roth
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Fa, Roth
β -Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromphenolblau	Fa. Roth
Bovines Serumalbumin (lyophilisiert)	Fa. Serva
Coomassie-Brilliantblau R250	Fa. AppliChem
Coomassie-Brilliantblau G250	Fa. Merck
Desoxycholate (DOC)	Fa. Fluka
Diethylether	Fa. Roth
Dimethylformamid	Fa. Roth
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Pierce
DMEM ohne M u. C	Fa. Sigma-Aldrich
DMEM ohne M, C, L, I, K u. R.	Fa. Sigma-Aldrich
Ethanolamin	Fa. Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Roth

Essigsäure	Fa. Roth
Ethylenglykol	Fa. Fluka
EZ-Link [®] Sulfo-NHS-SS-Biotin (Spacer Arm: 24,3 Å)	Fa. Pierce
Fetales Kälberserum (FKS)	Fa. PAA
Glycerin	Fa. Roth
Glycin	Fa. Merck
H ₂ O (RNase frei)	Fa. Roth
Iodacetamid	Fa. Sigma-Aldrich
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	Fa. Merck
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Fa. Roth
Methanol	Fa. Fluka
Magermilchpulver	Fa. Frema
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fa. Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Fa. Roth
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	Fa. Roth
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Fa. Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Fluka
Natriumcitrat	Fa. Roth
Natriumcitratlösung (3,13 %ig)	Fa. MediPac
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fa. ICN
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Fa. Merck
n-Hexan	Fa. Merck
NHS-aktivierte Sepharose	Fa. GE Healthcare
Ninhydrin	Fa. Sigma-Aldrich
Nonidet P40 Substitut (NP-40)	Fa. Fluka
Paraformaldehyd	Fa. Fluka

Phenolrot	Fa. Fluka
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Fa. Merck
Protein G Sepharose 4 Fast flow	Fa. GE Healthcare
Roti Block	Fa. Roth
Salzsäure (HCl)	Fa. Roth
Silbernitrat (AgNO ₃)	Fa. Merck
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Fa. Fluka
Streptavidin, Meerrettichperoxidase-gekoppelt (ZyMax™ Grade)	Fa. Invitrogen
TEMED	Fa. Fluka
Trifluoressigsäure (TFA)	Fa. Sigma-Aldrich
Tricin	Fa. Roth
TRIS	Fa. Roth
Triton-X 100	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Fa. Merck

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

PPS-Donafix Blutentnahmebesteck	Fa. Braun
Sterile Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Handschuhe (rotiprotect® Latex u. Nitril)	Fa. Roth
Kanülen	Fa. Braun
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrocellulosemembran	Fa. Pall
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf

Röntgenfilme (BioMax MR u. Light)	Fa. Kodak
Ultrafiltrationseinheiten	Fa. Amicon
Vakuumflasche 500 ml	Fa. Braun

4.1.3 Geräte

Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Fa. Forma Scientific
Drehrad	Fa. Labor-Brand
ELISA-Reader	Fa. SLT
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblock	Fa. Eppendorf
Kühlwasserbad	Fa. Lauda
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA
Mehrkanal-Pipetten	Fa. Biohit
Lichtmikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Einkanal-Pipetten	Fa. Gilson
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Schüttler	Fa. Bühler
Spannungsgerät	Fa. BioRad, Fa. Stratagene
Vortex	Fa. IKA
Waagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun
Zentrifugen	Fa. Heraeus

4.1.4 Enzyme

Trypsin	Fa. Sigma-Aldrich
---------	-------------------

Trypsin (MS-Grade) Fa. Roche

4.1.5 Kits

„BCA™ Protein Assay Kit“ zur Bestimmung
von Proteinkonzentrationen

Fa. Pierce

„HiTrap™ Protein G HP affinity column“ zur
Reinigung von IgG

Fa. GE Healthcare

„PD-10 Column Sephadex G-25 M“ zum
Pufferwechsel von Proteinen

Fa. Pharmacia

„PNGase F Kit“ zur Deglykosilierung
von Proteinen

Fa. New England BioLabs

„Western Lightning™ Chemiluminescence
Reagent Plus“ für Immunoblots

Fa. Pierce

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Primärantikörper

mAK IL-A88 gegen bovinen MHC I gerichteter muriner monoklonaler
Antikörper (mAK) (Toye et al., 1990)

GTX101314 gegen humanes β_2 -Mikroglobulin gerichtetes polyklonales
Kaninchenserum (Fa. GeneTex)

4.1.6.2 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert Fa. Dianova

Ziege-anti-Maus-IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert Fa. Dianova

Ziege-anti-Rind-IgG, Meerrettichperoxidase konjugiert Fa. Dianova

4.1.6.3 Rinderseren

BNP⁺-Seren (n=16)

Seren von BNP-Muttertieren. (alle Tiere waren zumindest grundimmunisiert mit PregSure[®] BVD und hatten mindestens ein an BNP erkranktes Kalb)

Dabei galt BNP als bestätigt, wenn:

- 1.) beim Kalb eine vermehrte Blutungsneigung vorlag.
- 2.) ein BVD-Antigennachweis beim Kalb negativ blieb.
- 3.) eine massive Thrombozytopenie (≤ 200 G/l) und Leukopenie im Blutbild vorlagen.
- 4.) das Kalb nicht älter als 4 Wochen alt war.
- 5.) das Kalb keine Anzeichen einer Septikämie aufwies.
- 6.) im Knochenmark eine Panmyelophthase nachgewiesen werden konnte.
- 7.) das Kalb nur das Kolostrum des eigenen Muttertieres erhalten hat.

Die Seren stammten von Tieren der Klinik für Wiederkäuer, der JLU Gießen oder von Tieren der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof der JLU Gießen. Serumproben von vier Tieren wurden zur Verfügung gestellt von C. Kühn, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

BNP⁻-Seren (n=8)

Seren PregSure[®] BVD geimpfter Tiere, bei deren Nachwuchs BNP nicht aufgetreten ist. Die Seren stammten von Tieren der Klinik für Wiederkäuer, der JLU Gießen oder von Tieren der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof der JLU Gießen. Serumproben von vier Tieren wurden zur Verfügung gestellt von C. Kühn, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

Neg.-Seren (n=8)

Seren BVD-freier Tiere, die nicht gegen BVDV geimpft wurden. Bei den Nachkommen dieser Tiere war BNP nicht aufgetreten. Die Seren stammten von Tieren der Klinik für Wiederkäuer, der JLU Gießen oder von Tieren der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof der JLU Gießen.

Bovilis[®]-Seren (n=8)

Seren von Tieren aus einem Betrieb, der zur BVDV-Impfung ausschließlich Bovilis[®] BVD/MD einsetzte. In

diesem Betrieb trat bislang kein Fall von BNP auf. (Seren wurden zur Verfügung gestellt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen)

Bovidec[®]-Seren (n=8)

Seren von Tieren aus einem Betrieb, der zur BVDV-Impfung ausschließlich Bovidec[®] einsetzte. In diesem Betrieb trat bislang kein Fall von BNP auf. (Seren wurden zur Verfügung gestellt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen)

4.1.7 Eukaryotische Zellen

MDBK (Madin Darby Bovine Kidney)

ATCC Nr.: CCL-22

BL-3 (Bovine B-cell Lymphosarcoma cell line 3)

ATCC Nr.: CRL-8037

SK-6 (Swine Kidney 6)

Institut für Virologie, Gießen

BHK-21 (Baby Hamster Kidney 21)

ATCC Nr.: CCL-10

4.1.8 Medien, Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurde als Lösungsmittel Reinstwasser (max. 0,55 µS/cm bei 25°C) verwendet.

AEC-Substrat zum Nachweis Peroxidase-gekoppelter Immunglobuline:

9 ml 50 mM Natriumacetat-Lösung pH 5,2; 1 ml Aminoethylcarbazol in Dimethylformamid (4 mg/ml); 5 µl 30 % H₂O₂ in H₂O^{dd}

Anodenpuffer für SDS-PAGE:

200 mM Tris/HCl; pH 8,9

Coomassie-Brilliant-Blue R250 zur Färbung von Proteinen in SDS-PAGE:

0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

DMEM mit Zusätzen für die eukaryotische Zellkultur:

DME-Medium aus 4,5 g/l DMEM Pulvermedium (Fa. Gibco):

0,0178 g/l L-Alanin; 0,03 g/l L-Aspartat; 0,07 g/l Glycin; 0,075 g/l L-Glutaminsäure; 0,025 g/l L-Prolin; 0,1 mg/l Biotin; 0,025 g/l Hypoxanthin; 3,7 g/l NaHCO₃

Vor dem Gebrauch erfolgt die Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS); 100.000 IU/l Penicillin; 0,1 g/l Streptomycin

Entfärbelösung für SDS-PAGE:

40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Erythrozyten-Lysispuffer:

155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,13 mM EDTA

Gelpuffer für SDS-PAGE:

1 M Tris/HCl; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,45

Kathodenpuffer für SDS-PAGE:

100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS; 100 mM Tris/HCl; pH 8,25

Kolloidale Coomassie-Brilliantblau Färbelösung für Proteingele:

0,12 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250; 10 % (w/v) (NH₄)₂SO₄; 10 % (v/v) H₃PO₄; 20 % (v/v) Methanol

Konservierungslösung für SDS-PAGE:

20 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Glycerin

Natriumcitrat-Puffer:

120 mM Natriumcitrat; pH 3,5

Paraformaldehydlösung zur Fixierung von Zellen:

4 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS_{defiz.}

Die Suspension wird auf 50°C erhitzt und unter Rühren mit 1 M NaOH tropfenweise klar titriert.

PBS_{defiz.}:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

PBS:

0,49 mM MgCl₂; 0,68 mM CaCl₂ in PBS_{defiz.}

PBS_{Tween} für Immun-Nachweisverfahren:

0,1 % TWEEN 20 in PBS

Ponceau-Rot Färbelösung für Western Blots:

0,5 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Starcher et. al.:

Acetatpuffer: 4 M Natriumacetat (Trihydrat); 20 % (v/v) Essigsäure

Zink-Chloridlösung: 10 % (w/v) Zinkchlorid in Ethylenglykol

Ninhydrin-Reagenz: 26,7 g/l Ninhydrin in Ethylenglykol

Puffer für NHS-Kopplung:

Kopplungspuffer: 0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,3

Waschpuffer A: 0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl; pH 8,3

Waschpuffer B: 0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; pH 4

Puffer und Lösungen für MALDI-ToF-PMF:

50 % (v/v) Acetonitril

50 mM Ammoniumbicarbonat

10 mM Dithiothreitol (DTT); 50 mM Ammoniumbicarbonat

55 mM Iodacetamid; 50 mM Ammoniumbicarbonat

50 % (v/v) Acetonitril; 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure

RIPA-Puffer:

150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl; pH 8,0

SDS-Gel-Probenpuffer:

2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Triton-X-100-Puffer:

1 % (v/v) Triton-X 100; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 7,4

Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB-Substrat) für ELISA:

9 ml TMB-Puffer (100 mM Natriumacetat); 1ml TMB-Lösung (10 mg TMB in 4 ml DMSO); 1,5 µl H₂O₂

Trypsin-Lösung:

2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS

Versen-Puffer zum Ablösen von Kulturzellen:

5 mM EDTA; pH 7,4 in PBS

Western-Blot-Puffer:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,037 % (w/v) SDS

4.1.9 Impfstoffe

Bovidec[®] (Ch.-B.: BVC254)

Fa. Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe

Bovilis[®] MD/BVD (Ch.-B.: A043B01)

Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim

PregSure[®] BVD (Ch.-B.: L84525 und L84840)

Fa. Pfizer GmbH, Karlsruhe

4.2 Methoden

4.2.1 Gewinnung von Rinder-Vollblut

Rindervollblut wurde aus der *Vena jugularis* gewonnen. Dazu wurde eine Venenpunktionskanüle verwendet, die über einen Schlauch mit einer Flaschenanschlusskanüle verbunden war (PPS-Donafix, Fa. Braun). Nach der Punktion der *Vena jugularis* wurde die Flaschenanschlusskanüle in eine 500 ml Vakuumflasche eingestochen. Auf diese Weise konnten in kurzer Zeit bis zu 500 ml Vollblut gewonnen werden. Um die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurden 50 ml/500 ml Vakuumflasche 3,13 %ige Natriumcitratlösung (Fa. MediPac) vorgelegt. Natriumcitrat hemmt die Gerinnung durch die Komplexbildung von Kalzium-Ionen.

4.2.2 Gewinnung von Serum

Zur Gewinnung von Serum wurde der gerinnungshemmende Effekt von Natriumcitrat durch den Zusatz von 3,5 ml 2 M Kalziumchloridlösung pro 500 ml Citratblut aufgehoben. Je 50 ml Vollblut wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Das Vollblut wurde 12 h bei Raumtemperatur inkubiert, bis es vollständig koaguliert war. Anschließend wurde das geronnene Vollblut zentrifugiert (20 min, 20°C, 2500 x g). Das Koagulum wurde pelletiert und das Serum konnte als Überstand abgenommen werden. Eine Inaktivierung des Serums wurde durch Erhitzung für 30 min bei 56°C erreicht.

4.2.3 Gewinnung von PBMCs

Zur Gewinnung von PBMCs wurde frisch gewonnenes, Natriumcitrat-stabilisiertes Rindervollblut in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei ausgeschalteter Zentrifugenbremse in Zell- und Plasmafraktion getrennt (10 min, 20°C, 2000 x g). Der buffy coat, eine PBMC- und Thrombozyten-haltige Phase zwischen Erythrozyten und Plasma, wurde in einem Volumen von 5 ml abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Mit PBS wurde das Volumen auf 50 ml eingestellt. Es folgte eine Zentrifugation mit aktivierter Bremse (5 min, 20°C, 2000 x g). Der Überstand wurde verworfen und der pelletierte buffy coat mit kontaminierenden Erythrozyten in 5 ml Erythrozytenlysis-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml PBS gewaschen (10 min, 20°C, 400 x g), um Reste der lysierten Erythrozyten abzutrennen. Abschließend wurde das Pellet der PBMCs in 500 µl PBS aufgenommen. Die Membranintegrität wurde durch Trypanblau-Färbung überprüft und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (vgl. Kap. 4.2.2.2).

4.2.4 Gewinnung von Kolostrum

Kolostrum von Tieren wurde innerhalb von zwei Stunden *post partum* per Hand ermolken. Das Fett des Kolostrums wurde durch zweimalige Zentrifugation (je 10 min, 20°C, 13000 x g) abgetrennt. Daraufhin konnte das Fett als Überstand abgenommen und verworfen werden.

4.2.5 Arbeit mit Zellen

4.2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter Sterilbänken (LaminAir, Fa. Heraeus) statt. Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank (Fa. Forma Scientific) kultiviert. SK-6-, BHK-, BL-3- und MDBK-Zellen wurden in DMEM-Zellkulturmedium mit Zusätzen für die eukaryotische Zellkultur (4,5 g/l DMEM Pulvermedium; 0,0178 g/l L-Alanin; 0,03 g/l L-Aspartat; 0,07 g/l Glycin; 0,075 g/l L-Glutaminsäure; 0,025 g/l L-Prolin; 0,1 mg/l Biotin; 0,025 g/l Hypoxanthin; 3,7 g/l NaHCO₃) passagiert.

Zum Medium wurden vor Gebrauch 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin zugegeben. Zellkulturschalen und „Multiwell-Platten“ (Nunc™, Fa. Thermo Scientific) wurden als Zellkulturgefäße verwendet.

Eine Passagierung der Zellen wurde nach jeweils drei bis vier Tagen nach dem Auswachsen der adhären Zellen (MDBK, SK-6, BHK-21) zu einem konfluenten Rasen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 5 ml Trypsinlösung (2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS) auf den Zellrasen gegeben. Bevor der Zellrasen sich ablöste (nach 20-30 s), wurde die Trypsinlösung abgesaugt und die Zellkulturplatten für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die Trypsinierung wurde die extrazelluläre Matrix der Zellen abgebaut, wodurch Verbindungen zwischen den Zellen und zum Zellkulturgefäß gelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Rütteln von der Platte gelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Durch Trypsin-Inhibitoren, die im FKS des Zellkulturmediums vorhanden sind, wurden Trypsinreste inaktiviert. Ein Teil (1/30 bis 1/20) dieser Zellsuspension wurde zur Erhaltung der Zellkultur auf eine neue Zellkulturschale mit frischem Zellkulturmedium transferiert. Die Zelldichte wurde für Experimente durch unterschiedliche Verdünnungen eingestellt. Vor der Nutzung (CELISA, indirekter Immunperoxidase-Test, Biotinylierung, etc) wurden Zellen am Vortag frisch umgesetzt (1/3). Zur Darstellung zellulärer Proteine wurden Zellen verwendet, die mit Versen-Puffer abgelöst wurden, um negative Auswirkungen durch die Protease Trypsin auszuschließen.

BL-3-Zellen, die nur eine geringe Adhärenz zum Zellkulturgefäßboden zeigen, wurden mit Hilfe einer Pipette abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in der entsprechenden Verdünnung in frisches Medium gegeben. Um eine bessere Adhärenz der BL-3-Zellen zu erzielen, wurden diese Zellen auf kollagenisierten Zellkulturoberflächen kultiviert. Die

Kollagenisierung erfolgte durch Präinkubation der Oberflächen mit 1mg/ml Kollagen Typ I (Fa. Gibco) in PBS für 1 h bei Raumtemperatur.

4.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Adhärente Zellen wurden durch Trypsinlösung oder Versen-Puffer abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot der durch Vortexen homogenisierten Zellsuspension wurde für die Lebend-Tot-Färbung 1:10 oder 1:100 (abhängig von der erwarteten Zellzahl) mit einer 0,5 %igen (w/v) Trypanblau-Färbelösung gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der ausschließlich beschädigte Zellmembranen durchdringen kann und daher bei abgestorbenen Zellen an zytoplasmatische Proteine bindet und diese blau anfärbt. Zytoplasmatische Proteine lebender Zellen werden auf Grund einer intakten Zellmembran nicht angefärbt. Auf diese Weise ist eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen möglich. Bei der Bestimmung der Zellzahl wurden nur lebende Zellen berücksichtigt. Für die Färbung wurden die Zellen 2-3 min in der Färbelösung inkubiert. Eine Neubauer-Zählkammer wurde vorbereitet, indem das angefeuchtete Deckgläschen aufgedrückt wurde, bis sich sogenannte Newton-Ringe bilden. 20 µl der Zellsuspension wurden an den Rand des Deckgläschens gesetzt, so dass der Tropfen durch Kapillarkräfte unter dem Deckgläschen verteilt wurde. Nachdem die Zellen sedimentiert waren, konnte die Anzahl der lebenden Zellen (n) in vier Großquadraten bestimmt werden. Das Volumen eines jeden Quadrates beträgt 0,1 µl (Fläche: 1 mm², Tiefe: 0,1 mm). Der Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadraten ($n/4$) wurde berechnet. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (10 bzw. 100) ergab sich dann die Zellzahl pro ml:

Zellzahl bei Verdünnung 1:10: Zellzahl / ml = 2500 x n

Zellzahl bei Verdünnung 1:100: Zellzahl / ml = 25000 x n

4.2.5.3 Indirekter Immunperoxidase-Test

Zum Nachweis der Zielantigene der Allo-AK wurden die bovinen Zelllinien MDBK- und BL-3-, sowie heterologe SK-6- (Schwein) und BHK-21-Zellen (Hamster) verwendet. Diese Zellen wurden 1/3 verdünnt auf eine „Multiwell-Platte“ ausgesät und am Folgetag fixiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS_{defiz.} gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Behandlung mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) (20 min bei 4°C). Durch diese Art der Fixierung ist gewährleistet, dass die Zellmembran intakt bleibt und nur Oberflächenproteine der Zelle als Zielantigene zur Verfügung stehen. Die PFA-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS_{defiz.} gewaschen.

Serum von BNP-Muttertieren (BNP⁺-Seren) und Kontrollseren (Neg.-Seren: BVDV-frei und nicht gegen BVD geimpft) wurden mit PBS_{Tween} 1:25, 1:125, 1:625, 1:1000 und 1:3000 verdünnt. Um die Bindung von Allo-AK nachzuweisen, wurden die Zellen mit je einer Serumverdünnung überschichtet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Serumverdünnungen wurden abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS_{Tween} gewaschen, um nicht gebundenes AK zu entfernen. Der Nachweis der Alloantikörperbindung erfolgte durch Zugabe eines Peroxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Rind-IgG (1:1000 in PBS_{Tween}, 1 h bei 37°C). Die Sekundärantikörper-Lösung wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS_{Tween} gewaschen. Auf die Zellen wurde frisch angesetztes AEC-Substrat (9 ml 50 mM Natriumacetat-Lösung pH 5,2; 1 ml Aminoethylcarbazol in Dimethylformamid (4 mg/ml); 5 µl 30 % H₂O₂ in H₂O) gegeben und für 10-20 min bei 37°C inkubiert. Die enzymatisch katalysierte Oxidationsreaktion der Peroxidase wurde zum Nachweis der Sekundärantikörper-Bindung genutzt. Nur die Zellen, an deren Oberfläche IgG aus dem Rinderserum gebunden hatte, wurden durch die AEC-Reaktion angefärbt. Durch die Oxidation des löslichen AEC-Substrates entsteht ein unlöslicher braun-roter Farbkomplex. Mit dem Lichtmikroskop (Eclipse TS 100, Fa. Nikon) erfolgte die Auswertung des Immunperoxidase-Tests.

4.2.6 Arbeit mit Proteinen

4.2.6.1 Acetonfällung von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen wurden die Proben 1:5 (v/v) mit 100 %igem eiskaltem Aceton gemischt und mindestens 2 h bei -20°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 15000 x g) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz bei 37°C getrocknet. Für die SDS-PAGE-Analyse wurden die Pellets in SDS-Gel-Probenpuffer aufgenommen. In Abhängigkeit der Anwendungen wurden die Pellets auch in anderen Puffern gelöst.

4.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Starcher et al.

Dieser Methode geht eine saure Hydrolyse der Proteine voraus. Dabei werden die Proteine in einzelne Aminosäuren zerlegt. Anschließend wird die Aminosäurekonzentration, die mit der Proteinkonzentration direkt korreliert ist, bestimmt. Der Nachweis basiert auf der Reaktion von Ninhydrin mit den Aminogruppen der Aminosäuren. Es entsteht eine Schiffsche Base (Imin), die

weiter zu Amino-Ninhydrin reagiert. Mit einem weiteren Ninhydrin dimerisiert das Amino-Ninhydrin, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Konzentration der Aminosäuren und kann bei 575 nm ausgewertet werden.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll nach Starcher et al. verwendet (Starcher, 2001). Dazu wurden gleiche Mengen der Proben in Verdünnungsstufen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Aceton gefällt. Die pelletierten Proteine wurden mit 500 µl 6N HCl für 24 h bei 100°C hydrolysiert. Die Flüssigkeit der Proben wurde verdampft und die Trockensubstanz der Proben in 1 ml H₂O aufgenommen. Als Standard diente eine Stocklösung von lyophilisiertem bovinem Serumalbumin (BSA, Fa. Serva). Eine Standardkurve wurde erstellt, indem 0,05 mg, 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg des BSA-Standards hydrolysiert und ebenfalls in 1 ml H₂O aufgenommen wurden. Für die Reaktionslösung wurden 200 mg Ninhydrin in 7,5 ml Ethylenglykol gelöst, 2,5 ml Acetatpuffer (4 M Natriumacetat (Trihydrat); 20 % Essigsäure) und 250 µl Zink-Chloridlösung (10 % (w/v) Zinkchlorid in Ethylenglykol) hinzugefügt. Je 100 µl dieser Reaktionslösung wurden in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und 1 µl der Probenverdünnungen bzw. der Proteinstandardverdünnungen zu der Reaktionslösung gegeben. Die Platte wurde 10 min bei 100°C auf dem Heizblock inkubiert. Die Absorption des entstandenen blauen Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von 575 nm im ELISA-Reader ermittelt. Mit Hilfe der BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Probenlösung bestimmt. Die Proteinmengenbestimmung erfolgte als Mittelwert eines Dreifachansatzes.

4.2.6.3 Proteinkonzentrationsbestimmung im BCA-Assay

Das „BCA™ Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce) wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Proteinen macht sich der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay eine Reaktion von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure und Kupfersulfat mit den Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin zu Nutze. Cu²⁺-Ionen werden durch die Reaktion zu Cu¹⁺-Ionen reduziert. Cu¹⁺-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff. Bei einer Wellenlänge von 562 nm kann dessen Absorption photometrisch bestimmt werden. Die Absorption korreliert mit der Menge des in der Probe enthaltenen Proteins.

Die Proben wurden zur Bestimmung 1:10, 1:50 und 1:100 mit PBS verdünnt. Die im Kit enthaltene BSA-Stammlösung (Konzentration: 2mg/ml) diente zur Erstellung einer Standardkurve. Eingesetzt wurden Konzentrationen des Standards von 500 µg/ml, 100 µg/ml,

50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml. Zur Erstellung der Reaktionslösung wurden die BCA-Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt und je 200 µl in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt. 25 µl der Probenverdünnungen bzw. 25 µl der Protein-Standardlösungen wurden je in einer Vertiefung der Mikrotiterplatte mit der vorgelegten Reaktionslösung gemischt. Die Farbreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60°C im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet. Jede Konzentrationsbestimmung wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Für jeden Dreifachansatz wurden die Mittelwerte berechnet. Mit Hilfe der BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der Probenlösung bestimmt werden.

4.2.6.4 Biotinylierung von Zell-Oberflächenproteinen

Die Markierung von zellulären Oberflächenproteinen ermöglichte die Differenzierung von zytoplasmatischen und membranständigen Antigenen. Außerdem konnten durch die Reaktion von Streptavidin mit Biotin Proteine im Blot-Verfahren nachgewiesen werden.

Zur Biotinylierung von MDBK-Zellen wurden die Zellen einer Platte (ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen) mit Versen-Puffer abgelöst und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Um Reste des Zellkulturmediums zu beseitigen, wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS_{defiz.} gewaschen. Für die Biotinylierung von PBMCs wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2 min, 20°C, 500 x g) pelletiert und in einer Lösung von 3 mg EZ-Link[®] Sulfo-NHS-SS-Biotin (Spacer Arm: 24,3 Å, Fa. Pierce) in 10 ml PBS_{defiz.} resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Bei dem EZ-Link[®] Sulfo-NHS-SS-Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Molekül, das Zellmembranen nicht permeieren kann. Das Biotin ist durch ein Linker-Molekül mit N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) verbunden. NHS-Ester binden bei einem pH von 7-9 an primäre Amine (-NH₂) von Lysinseitenketten und dem N-Terminus von Proteinen. Durch diese Reaktion kann Biotin über eine Amidbindung selektiv an die Oberflächenproteine gebunden werden. Das Linkermolekül enthält eine Schwefeldoppelbindung, die im reduktiven Milieu abgespalten werden kann. Daher wurden alle Arbeiten, bei denen EZ-Link[®] Sulfo-NHS-SS-Biotin zur Markierung von Proteinen verwendet wurde, unter nicht reduzierenden Konditionen durchgeführt. Ungebundenes NHS wurde durch Zugabe von 200 µl Glycin (100 mM) inaktiviert. Die Zellen wurden pelletiert (2 min, 20°C, 500 x g) und zweimal mit PBS_{defiz.} gewaschen, bevor sie in 1 ml PBS aufgenommen wurden.

4.2.6.5 SDS-PAGE

Proteingemische wurden ladungsunabhängig nach der Molekülgröße in Tricin-Gelen durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Schägger et al., 1987). Standardmäßig wurden Mini-Gele (8,5 x 6,0 cm) für Probenvolumina von 1-25 µl in Apparaturen aus der Werkstatt des MZI (Gießen) verwendet. Zur Auftrennung größerer Probenvolumina (bis 60 µl) wurden größere Gele (16 x 20 cm) in Apparaturen der Firma BioRad (PROTEAN II xi) genutzt. Das sogenannte Trenngel, in dem die Proben aufgetrennt wurden, hatte einen Acrylamid-Anteil von 7,5 % (w/v). Zur Induktion der Polymerisation des Acrylamids wurden 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1 % (v/v) TEMED hinzugefügt. Das sogenannte Sammelgel oder „Stacking Gel“, in dem die Probe aufgetragen wurde, bestand aus 4 % (w/v) Acrylamid in Gelpuffer mit 0,08 % (w/v) APS und 0,1 % (v/v) TEMED. Die eingesetzte 40 %ige (w/v) Acrylamidlösung (Fa. AppliChem) bestand aus Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 29:1.

Um das Molekulargewicht aufgetrennter Proteine bestimmen zu können, wurden 3 µl eines vorgefärbten Molekulargewichtsstandards (Prestained Protein Marker, Fa. Invitrogen) auf jedem Gel in einer separaten Spur des Gels aufgetragen. Für den Gellauf wurden Probenproteine (Zelllysate, affinitätsaufgereinigte Zelllysate, Immunglobuline oder Impfstoffproteom) in SDS-Gel-Probenpuffer (2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und durch Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert. Größere Mengen Nukleinsäuren stören den Gellauf. Daher wurden für die Herstellung von Zelllysaten zunächst die Zellen mit RIPA-Puffer oder Triton-X-100-Puffer (1 % (v/v) Triton-X 100; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 7,4) 20 min bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min, 20°C, 15000 x g), wobei die Zellkerne abgetrennt wurden. Der proteinhaltige Überstand wurde in SDS-Gel-Probenpuffer aufgenommen und denaturiert.

Für den Gellauf wurden spezielle Kathoden- (100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS; 100 mM Tris/HCl; pH 8,25) und Anoden-Puffer (200 mM Tris/HCl; pH 8,9) verwendet. Solange sich die Lauffront der Probe im Sammelgel befand, wurde eine Spannung von 90 V angelegt. Wenn die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Hatte die Lauffront das untere Ende des Trenngeles erreicht, wurde die Elektrophorese, die zwischen 90 - 240 min dauerte, abgebrochen. Die Proteinbanden wurden entweder sofort durch Proteinfärbung dargestellt oder die Proteine im Gel wurden auf Nitrocellulose transferiert (Western Blot).

4.2.6.6 Proteinfärbemethoden

Zur Anfärbung von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurde standardmäßig mit einer Coomassie-Brilliantblau-R250-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) gearbeitet. Coomassie-Brilliantblau bindet direkt an Proteine oder befindet sich in hydrophober Assoziation mit ihnen. Die Gele wurden für 1-2 h in der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Gel-Matrix mit der Entfärbelösung für SDS-PAGE (40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt. Nach ausreichender Entfärbung (ca. 3 h) wurde das Gel entweder direkt eingescannt (Flachbettscanner, Fa. Epson), oder 24 h in einer Konservierungslösung (20 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Glycerin) inkubiert und zu Aufbewahrungs- und Dokumentationszwecken in einem Spannrahmen zwischen zwei Cellophan-Folien (Gel Air Cellophane Sheets, Fa. BioRad) getrocknet.

Wenn aufgrund niedriger Konzentrationen des zu detektierenden Proteins eine höhere Sensitivität erforderlich war, wurden die Polyacrylamidgele nach einem Protokoll von Candiano et al. gefärbt (Candiano et al., 2004). Dem Protokoll folgend wurden die Tricin-Gele 24 h bei Raumtemperatur in der dunkelgrünen kolloidalen Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung (0,12 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250; 10 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 % (v/v) H_3PO_4 ; 20 % (v/v) Methanol) inkubiert. Die Proteinbanden färben sich dunkelblau an. Banden mit einer Proteinmenge von 10 ng und mehr waren darstellbar.

Eine weitere Proteinfärbemethode wurde als Erfolgskontrolle der Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembran beim Western Blot eingesetzt. Dabei handelt es sich um die reversible Färbung von Proteinen mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Blotten kurz mit H_2O gewaschen, um Reste des Western-Blot-Puffers zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran für 2 min bei Raumtemperatur in Ponceau-Rot Färbelösung (0,5 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure). Zur Kontrolle des Übertragungsergebnisses wurde die Membran für 10 min in PBS entfärbt, so dass die roten Proteinbanden auf der Membran sichtbar wurden.

4.2.6.7 Western Blot

Proben wurden zunächst in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine geeignete Reaktionsoberfläche übertragen. Zunächst wurde das Sammelgel vom Trenngel abgeschnitten und das Trenngel in Western-Blot-Puffer (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,037 % (w/v) SDS) äquilibriert. Das Trenngel wurde zwischen zwei 1 mm starken Filterpapieren (Maße: 6 x 9 cm, Fa. Whatman) blasenfrei im Puffer auf eine Nitrocellulosemembran gelegt. Das so

entstandene „Filterpapier-Nitrocellulosemembran-Trenngel-Filterpapier-Sandwich“ wurde aus dem Pufferbad genommen und in eine Halteapparatur der Blotting-Kammer (Fa. BioRad) eingeklemmt. Durch ein elektrisches Feld fand der Transfer der Proteine aus dem Trenngel auf die Nitrocellulosemembran bei einer Spannung von 77 V für 45 min oder bei 15 V für 12 h statt. Ein vorgefärbter Marker, der nach Übertragung auf die Nitrocellulosemembran sichtbar war, diente zur Kontrolle des Blotting-Prozesses.

Da nach dem Blotten auf der Nitrocellulosemembran freie Proteinbindungsstellen verbleiben, mussten diese blockiert werden. Dazu wurde die Membran 1 h auf einem horizontalen Schüttler (Fa. Bühler) in 5 % (w/v) Magermilchpulver (Fa. Frema) in PBS_{Tween} oder in RotiBlock[®] (1:10 in PBS_{Tween} verdünnt, Fa. Roth) inkubiert. Da Milchpulver Biotin enthält, wurde RotiBlock[®] immer dann verwendet, wenn biotinylierte Proteine mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Streptavidin (SAPO) visualisiert werden sollten. Die verwendete Blockingreagenz wurde abgeschüttet und Reste durch einmaliges Schwenken der Membran in PBS_{Tween} abgewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler mit dem entsprechenden Primärantikörper. Hybridoma-Zellkulturüberstände wurden in Verdünnungen von 1:3 bis 1:5 in PBS_{Tween} eingesetzt. Antikörperkonzentrate und Antiseren wurden in der jeweils angegebenen Verdünnung verwendet. Rinderserum wurde als Primärantikörper 1:1000 in PBS_{Tween} verdünnt. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit PBS_{Tween} entfernt. Abhängig von der Spezies, von der die Primärantikörper stammten (Kaninchen, Maus oder Rind), wurden als Sekundärantikörper Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Ziege-anti-Maus-IgG oder Ziege-anti-Rind-IgG (1:10000 in PBS_{Tween}) verwendet. Die Nitrocellulosemembran wurde mit den Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde abgeschüttet und die Membran dreimal für 10 min bei Raumtemperatur in PBS_{Tween} gewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz auf Zellstoff getrocknet und mit Western Lightning[™] Chemiluminescence Reagent Plus (Fa. Pierce) benetzt. Überschüssiges Substrat wurde nach 1 min an Zellstoff abgetupft und die Membran in eine Filmkassette zwischen zwei transparente Kunststofffolien eingelegt. Die durch die Peroxidase katalysierte Lichtreaktion des Chemilumineszenz Reagenz wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilmes (BioMax MR bzw. BioMax Light) detektiert. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Röntgenfilme mussten alle Arbeiten in einer Dunkelkammer durchgeführt werden. Standardmäßig erfolgte eine Belichtung des Films für 30 s. Je nach Signalintensität wurden daraufhin Filme kürzer oder länger belichtet. Der Film wurde in einer Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine (Fa. AGFA) prozessiert. Anhand einer Leuchtmarkierung in der Kammer konnte die Position des Films nachträglich rekonstruiert

werden. Das Bandenmuster des vorgefärbten Größenstandards wurde mit einem Filzstift auf den Röntgenfilm übertragen.

Die Visualisierung biotinylierte Proteine erfolgte im Western Blot mit Meerrettichperoxidasegekoppeltem Streptavidin „ZyMax™ Grade“ (Fa. Invitrogen). Dazu wurde die Membran nach der Blockierung mit RotiBlock® in PBS_{Tween} gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation der Membran in SAPO (1:30000 in PBS_{Tween}). Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Streptavidin bindet in einer hochaffinen Reaktion spezifisch an Biotin. Die SAPO-Lösung wurde abgeschüttet und die Membran dreimal für 10 min in PBS_{Tween} gewaschen, um ungebundenes SAPO zu entfernen. Durch SAPO markierte Proteinbanden wurden, wie oben beschrieben, mit Hilfe von Chemilumineszenz Substrat auf Röntgenfilm dargestellt.

4.2.6.8 Nachweis von Proteinglykosilierung mittels PNGase F

PNGase F ist ein Enzym, das N-glykosidisch gebundene Glykane über Desaminierung des Asparagins spaltet. Die N-glykosidische Bindung stellt die häufigste Art der Glykosilierung von Proteinen dar, wobei das Glykan an die Säureamidgruppe von Asparagin (N) gebunden wird.

Um die Glykosilierung eines Proteins nachzuweisen, wurde das „PNGase F Kit“ (Fa. New England BioLabs) eingesetzt. Den Herstellerangaben entsprechend wurden 5 µl einer Probe in SDS-Gel-Probenpuffer mit 5 µl G7 Reaction Buffer und 5 µl NP-40 aus dem Kit gemischt. 5 µl PNGase F (entspricht 2500 IU) wurden hinzugegeben und die Probe bei 37°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden 5 µl SDS-Gel-Probenpuffer hinzugefügt und die Probe bei 95°C für 5 min erhitzt. Das Probenmaterial wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Im Vergleich mit der nicht PNGase F behandelten Probe können Glykosilierungen durch einen „Massenshift“ dargestellt werden.

4.2.7 Charakterisierung von Antigenen der BNP-Alloantikörper

4.2.7.1 Affinitätsreinigung von zellulären Oberflächenproteinen mit immobilisiertem

Gesamt-IgG

Zur Aufreinigung von IgG wurden 1,5 ml Rinderserum eines BNP⁺-Serums und eines Neg.-Serums mit 10 ml Tris-Puffer (100 mM; pH 8,0) in einem 15 ml Falconröhrchen gemischt. Um unlösliche Serumbestandteile zu eliminieren, wurde eine Zentrifugation (10 min, 4°C, 2500 x g) durchgeführt. Der Überstand wurde mit einer Spritze mit vorgeschaltetem Sterilfilter

(Porengröße 0,45 μm) über eine HiTrapTM Protein G HP affinity column (Fa. GE Healthcare) gegeben (ca. 1 ml/min). Protein G bindet selektiv das Fc-Fragment von IgG. Die Säule mit einem Volumen von 1 ml hat eine Bindungskapazität von etwa 23 mg bovinem IgG. Anschließend wurde die Säule mit jeweils 5 ml eines Tris-Puffer-Gradienten (100 und 10 mM; pH 8,0) gewaschen. Die Antikörper wurden in 10 x 1 ml Fraktionen mit Glycin-Puffer (50 mM; pH 3,0) in 1,5 ml Eppendorfgefäße eluiert, in die jeweils 100 μl Tris-Puffer (1 M; pH 8,0) vorgelegt waren. Bei pH 3,0 wird die Bindung zwischen Protein G und den Antikörpern gelöst. Die IgG-haltigen Elutionsfraktionen konnten nach SDS-PAGE und Coomassie-Brilliantblau-G250-Färbung ermittelt werden. Diese Fraktionen wurden gepoolt. Zur Koppelung an NHS-aktivierte Sepharose-Beads (Fa. GE Healthcare) musste das IgG durch Gelfiltration über eine „PD-10 Column Sephadex G-25 M“ (Fa. Pharmacia) in NHS-Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO_3 ; 0,5 M NaCl; pH 8,3) überführt werden. Niedermolekulare Substanzen (Masse \leq 1 kDa) passieren die Gelfiltrations-Säule langsamer als höhermolekulare Substanzen (Masse \geq 5 kDa), weil niedermolekulare Substanzen sich in Poren der Matrix „verfangen“ und daher später eluieren. Die Gelsäule wurde mit NHS-Kopplungspuffer äquilibriert und die IgG Fraktion in 1 ml Tris-Puffer pH 8,0 auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit NHS-Kopplungspuffer in 1 ml Fraktionen eluiert. Die IgG-reichste Fraktion wurde wiederum im Coomassie-Brilliantblau-G250 gefärbten Proteingel ermittelt. Zur Kopplung wurde diese Fraktion zu 200 μl NHS-aktivierter Sepharose gegeben, die zuvor mit eiskalter 1 mM HCl aktiviert wurde. Die Koppelungsreaktion nahm eine Zeit von 12 h bei 4°C auf dem Drehrad in Anspruch. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation (2 min, 20°C, 15000 x g) pelletiert und der Überstand abgenommen. Zur Inaktivierung von ungebundenem NHS wurde mit je 5 ml Waschpuffer A (0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl; pH 8,3), Waschpuffer B (0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; pH 4) und Waschpuffer A gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 20°C erfolgte eine Wiederholung der Waschschrte. Das an NHS-Sepharose immobilisierte IgG wurde in 1 ml $\text{PBS}_{\text{defiz.}}$ aufgenommen.

Zu den Beads wurde je 1 ml mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl; pH 8,0) lysierte oberflächenbiotinylierte MDBK-Zellen ($1,5 \times 10^7$) gegeben (12 h bei 4°C auf dem Drehrad). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Beads dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen, um von Antikörpern nicht gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution der an das IgG gebundenen Proteine wurde mit 1 ml Glycin-Puffer (100 mM; pH 2,5) durchgeführt und das Eluat zur Fällung 1:4 mit eiskaltem Aceton versetzt. Die gefällten Proteine wurden in 60 μl SDS-Gel-Probenpuffer (2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und für 5 min auf

95°C erhitzt. Nach SDS-PAGE wurden die eluierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde 1 h mit Roti-Block (Fa. Roth) geblockt und mit Peroxidasegekoppeltem Streptavidin (SAPO) inkubiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Fa. Pierce) durch SAPO auf Röntgenfilm visualisiert.

4.2.7.2 Affinitätsreinigung von zellulären Oberflächenproteinen mit Alloantikörpern

Um diejenigen Antikörper aus Rinderserum zu separieren, die an zelluläre Oberflächenproteine von Rinderzellen binden, wurden Rinderzellen mit Serum inkubiert. Nicht gebundene Antikörper und Serumbestandteile wurden durch einen Waschschrift entfernt. Die Immunkomplexe aus zellulären Oberflächenproteinen und gebundenem IgG wurden durch Zellysis mit Triton-X-100-Puffer für 15 min bei 4°C freigesetzt. Diese Immunkomplexe konnten durch Bindung an immobilisiertes Protein G isoliert werden. Grundlage dieses Versuchs ist eine modifizierte Immunpräzipitation. Bei einer Immunpräzipitation werden Antigene durch Antikörper, die an eine Matrix gekoppelt sind, präzipitiert (Peltz et al., 1987). Die Matrix besteht in den meisten Fällen aus Sepharose- oder Magnet-Beads, die kovalent gebundenes Protein A oder G auf ihrer Oberfläche tragen. Protein A und G binden gerichtet an das Fc-Fragment von IgG. Daher können Immunkomplexe mit diesen Beads aus einer Lösung präzipitiert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man deshalb als Immun-Affinitätsreinigung. Während normalerweise zunächst die Antikörper an den Beads immobilisiert werden, wurde bei der hier angewendeten Methode zuerst eine Antigen-Antikörper-Bindung an Zelloberflächen durchgeführt. Mit dieser Methode werden von der Gesamtheit der IgG-Fraktion eines Serums nur solche Antikörper an Protein G immobilisiert, die auch tatsächlich mit Antigenen assoziiert sind. Durch die Konzentration der Allo-AK konnte die Antigenausbeute wesentlich gesteigert werden.

Für die Methode wurde ein modifiziertes Protokoll nach Heinold et al. eingesetzt (Heinold et al., 2010). 2×10^6 oberflächenbiotinylierte MDBK-Zellen bzw. 2×10^6 oberflächenbiotinylierte PBMCs wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 h mit 300 µl Rinderserum in 700 µl PBS inkubiert. Im Serum vorhandene Allo-AK binden an Oberflächenantigene der Zellen. Die Zellen wurden pelletiert (2 min, 4°C, 500 x g) und dreimal mit 1 ml 4°C kaltem PBS gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Triton-X-100-Puffer aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und gevortext. Das nicht-ionische Detergens Triton-X 100 lysiert die Zellen, so dass die Komplexe aus Antikörpern und biotinylierten Antigenen freigesetzt werden. Durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 15000 x g)

wurden unlösliche Zellbestandteilen abgetrennt. Der Überstand wurde zu 35 µl Protein G Sepharose-Beads (Fa. GE Healthcare) gegeben und für 12 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Ungebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren (2 min, 4°C, 15000 x g) der Beads mit 1 ml Triton-X-100-Puffer entfernt. Zur Elution gebundener Antigene wurde 30 µl SDS-Gel-Probenpuffer zu den Beads gegeben und der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt. Das Eluat wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und die Proteinbanden mit SAPO und Chemilumineszenz auf Röntgenfilm visualisiert.

4.2.7.3 Affinitätsreinigung von Alloantikörpern aus BNP⁺-Seren

Zur Reinigung von Allo-AK wurde BNP⁺-Serum auf MDBK-Zellen gegeben. Allo-AK binden an die entsprechenden Zielantigene auf der Oberfläche der MDBK-Zellen. Durch Waschschriffe können ungebundene AK entfernt werden. An MDBK-Zellen gebundene Antikörper (Allo-AK) wurden durch Absenkung des pH-Werts aus der Antigenbindung gelöst.

12,5 ml BNP⁺-Serum wurden 1:4 in PBS verdünnt auf $4,5 \times 10^7$ adhärenente MBDK-Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Entfernen nicht gebundener Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen mit PBS. Zu den Zellen wurden 15 ml Natriumcitrat-Puffer (120 mM; pH 3,5) für 15 min gegeben und der Ansatz bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde von den Zellen abgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen, in das 15 ml Tris-Puffer (1 M; pH 8,0) vorgelegt waren, gegeben. Um Zellbestandteile zu entfernen, wurde zentrifugiert (10 min, 4°C, 2500 x g) und der antikörperhaltigen Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen.

4.2.8 Quantifizierung von Alloantikörper-Titern

4.2.8.1 Quantifizierung von Serumantikörpern mittels CELISA

„Enzyme-linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) haben sich als Standardmethode zur Quantifizierung von Antikörpern durchgesetzt (Engvall et al., 1971). Prinzipiell wird in einem ELISA ein Antigen an der Reaktionsoberfläche einer ELISA-Mikrotiterplatte immobilisiert. Freie Bindungsstellen der Reaktionsoberfläche werden mit einem neutralen Protein (z.B. BSA) blockiert. Zu dem immobilisierten Antigen wird eine antikörperhaltige Lösung gegeben, um die Bindung der Antikörper an dieses Antigen zu überprüfen. Die Bindung des Primärantikörpers wird mit einem speziesspezifischen Sekundärantikörper nachgewiesen, der mit einem Enzym konjugiert ist, das eine Farbreaktion katalysiert. Durch die Bindung des Sekundärantikörpers

wird indirekt die Bindung des Primärantikörpers nachgewiesen, weshalb diese Art von ELISA als indirekter ELISA bezeichnet wird. Tetramethylbenzidin (TMB) wird als Chromogen der Detektions-Farbreaktion benutzt. Die mit dem Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert dabei die Reaktion des farblosen TMB mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu einem löslichen blauen TMB-Radikalkation. In einer Reaktion mit Schwefelsäure wird das instabile TMB-Radikalkation zum stabilen, gelben TMB-Kation. Die Farbintensität ist dabei proportional der Menge an gebundenem Sekundärantikörper und damit indirekt mit der Menge an gebundenem Primärantikörper korreliert.

Da ein entsprechendes Antigen zur Etablierung eines ELISA nicht zur Verfügung stand, wurde für die Quantifizierung von Allo-AK in Rinderseren ein „Cell Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (CELISA) entwickelt (Arunachalam et al., 1990; Bishop et al., 1992; Effros et al., 1985; Wewetzer et al., 1996). Mit diesem konnte die Gesamtheit alloreaktiver AK gegen Oberflächenantigene der verwendeten Kulturzelllinie (MDBK-Zellen) ermittelt werden.

Dazu wurden MDBK-Zellen am Vortag 1:3 auf 96-well Platten ausgesät. Für die Verwendung im CELISA wurde das Medium abgegossen und die Zellen durch dreimaliges Waschen mit $PBS_{\text{defiz.}}$ von Mediumresten befreit. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 100 μl Paraformaldehyd für 20 min bei 4°C. Das PFA wurde abgeschüttet und PFA-Reste durch dreimaliges Waschen der Zellen mit $PBS_{\text{defiz.}}$ entfernt. Eine Blockierung von zellfreien Bereichen der Mikrotiterplatte hat sich in Vorversuchen als nicht erforderlich erwiesen. Als Primärantikörper wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1000) von Rinderserum in PBS_{Tween} eingesetzt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 μl einer Verdünnungsstufe auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde als Standard 100 μl unverdünnter Hybridomaüberstand des IL-A88 im Dreifachansatz mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Serumverdünnungen abgenommen und die Zellen in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte dreimal mit PBS_{Tween} gewaschen. Damit sollten Serumreste und ungebundene AK entfernt werden. Als Sekundärantikörper wurde Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Rind-IgG in jede Vertiefung, in der Rinderserum als Primärantikörper eingesetzt worden war, bzw. Meerrettichperoxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG für den Standard verwendet. Die Sekundärantikörper waren 1:2500 in PBS_{Tween} verdünnt. Die Mikrotiterplatte wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Sekundärantikörperlösung abgenommen und jede Vertiefung der Mikrotiterplatte dreimal mit PBS_{Tween} gewaschen, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 200 μl Tetramethylbenzidin-Substrat (9 ml TMB-Puffer [100 mM Na-

Acetat]; 1 ml TMB-Lösung [10 mg TMB in 4 ml DMSO]; 1,5 µl H₂O₂) gegeben. Da die Farbreaktion des TMB lichtempfindlich ist, wurden die Platten 10-15 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellrasen auf dem Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatte würde ein Auslesen der Platte mit einem ELISA-Reader stören. Daher wurden in jede Vertiefung einer weiteren Mikrotiterplatte 100 µl 25 %ige (v/v) Schwefelsäure vorgelegt. Von jeder Vertiefung mit Zellen wurden vorsichtig 100 µl des TMB-Mediums abgenommen und auf die andere Platte übertragen und so die Reaktion gestoppt. Die Extinktion der Lösung einer jeden Vertiefung wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm im ELISA-Reader (Spectra II, Fa. SLT) gemessen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Ansätze dieses Versuchs zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse als Quotient der gemessenen Extinktion und dem Mittelwert der Extinktionen des Standards angegeben.

4.2.9 Identifizierung von Antigenen mit MALDI-ToF-PMF

4.2.9.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen hat sich in den letzten Jahrzehnten in der Bioanalytik die Massenspektrometrie durchgesetzt. Für Proteomanalysen wurde die Massenspektrometrie erst in den 1980er Jahren durch die Erfindung von schonenden Ionisierungstechniken nutzbar. Diese sind die Matrix-unterstützte Laser-Desorption und Ionisation (MALDI, „*matrix assisted laser desorption/ionization*“) (Karas et al., 1988; Tanaka et al., 1988) und die Elektrospray Ionisation (ESI) (Fenn et al., 1989). Beide Methoden haben gemeinsam, dass der Analyt (Proteine oder Peptide) durch Energiezufuhr in die Gasphase übergeht und ionisiert wird. Mit der Massenspektrometrie (MS) kann die Molekularmasse dieser freien Ionen im Hochvakuum bestimmt werden. Die MS-Analyse gliedert sich in 1.) die Ionisierung und Beschleunigung von Analyten mit Hilfe einer Ionenquelle, 2.) die Separation von ionisierten Analyten nach ihrer Masse/Ladungszahl (m/z) und 3.) die Registrierung der Analyt-Ionen und deren Intensität an einem Detektor. Aus diesen Daten wird mit einem Computerprogramm ein Massenspektrum generiert, in dem die Intensität der Analyten gegen m/z aufgetragen wird. Für die MALDI-Analyse werden die in einem Lösungsmittelgemisch gelösten Analyten mit einem niedermolekularen organischen Aromaten (Matrix) im 1000- bis 10000-fachen Überschuss kokristallisiert. Die Probe wird auf einer leitfähigen Platte getrocknet (*dried-droplet-Methode*) und in ein Hochvakuum der Ionenquelle überführt. In der Ionenquelle

wird die Probe mit Laserimpulsen (3 ns) eines UV-Lasers mit einer Wellenlänge von 337 nm (N₂-Laser) oder 355 nm (Nd:YAG-Laser) „beschossen“. Dadurch kommt es zur Desorption, also der Ablösung von Matrix- und Analytenmolekülen, die durch die übertragene Energie in den gasförmigen Zustand übergehen. Durch Kollisionen von Matrix- und Analytenmolekülen in der Gaswolke kommt es in Abhängigkeit der Protonenaffinität des verwendeten Matrixmoleküls zur Übertragung von Protonen von der Matrix auf den Analyten, der somit ionisiert wird. Es entstehen mehrheitlich einfach geladene Analyt-Ionen [M+H]⁺ (Karas et al., 2000). Verschiedene Anwendungen erfordern unterschiedliche Matrices, da diese Unterschiede in der Kristallbildung und Protonenaffinität aufweisen. Standardmäßig wird für die Peptidanalytik α -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) (Beavis et al., 1992) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (Strupat et al., 1992) und für höhermolekulare Substanzen und Proteinen Sinapinsäure (SA) (Beavis et al., 1989) eingesetzt.

Um die Ionen nach ihrem m/z aufzutrennen, werden diese beim Flugzeit-Massenspektrometer (ToF: *time of flight*) durch ein Potentialgefälle beschleunigt und die Flugzeit auf einer feldfreien Flugstrecke bestimmt. Beim MALDI Desorptions/Ionisationsprozess entstehen einfach geladene Ionen [M+H]⁺. Daher ist die Flugzeit nur von der Masse m des jeweiligen Ions abhängig. Aufgrund unterschiedlicher Massen der erzeugten Ionen ist deren kinetische Energie E_{kin} und damit ihre Geschwindigkeit v unterschiedlich. Ionen mit einer höheren Masse (m) benötigen bei gleicher Ladungszahl länger für das Durchfliegen der feldfreien Flugstrecke als Ionen einer niedrigeren Masse (m).

Die Orts- und Geschwindigkeitsunterschiede während des Ionisationsprozess, die zu einer unterschiedlichen kinetischen Energie von Molekülen gleicher Masse führen, können durch den Einsatz eines Reflektors ausgeglichen werden (Mamyrin et al., 1973). Im Reflektor wird ein zweites elektrisches Feld erzeugt, das entgegen der Flugrichtung der Ionen wirkt. Eine unterschiedliche kinetische Energie lässt Ionen gleicher Masse unterschiedlich tief in das elektrische Feld des Reflektors eindringen und beschleunigt diese in die entgegengesetzte Richtung der ursprünglichen Flugbahn. Ionen mit hoher kinetischer Energie sind in der Lage tiefer in das elektrische Feld einzudringen als Ionen gleicher Masse mit niedrigerer kinetischer Energie. Dadurch wird die kürzere Flugzeit von Ionen mit höherer kinetischer Energie in der feldfreien Driftstrecke kompensiert. Bei richtiger Wahl der Reflektorspannung treffen Ionen gleicher Molekülmasse mit unterschiedlicher kinetischer Energie nach der Passage des Reflektors zugleich auf den Detektor, was das Auflösungsvermögen stark verbessert. MALDI-ToF-Instrumente können Massen bis zu 30 kDa auflösen. Im Bereich von 1-5 kDa, der Masse von Peptiden, wird eine Massengenauigkeit von 5-10 ppm erreicht.

4.2.9.2 MALDI-ToF-PMF (Peptide Mass Fingerprinting)

Grundsätzlich stehen bei der Massenspektrometrie zwei verschiedene Ansätze zur Proteinidentifizierung zur Verfügung. Zum einen die Methode des Peptidmassenfingerabdrucks (PMF), zum anderen die der *de novo* Sequenzierung von Peptiden mittels zwei hintereinandergeschalteter massenspektrometrischen Analysen (MS/MS). Beide Methoden setzen den Verdau mit Endoproteasen voraus, die die Proteine in charakteristische Peptide spalten. Für die PMF-Analyse ist es essentiell, dass der Analyt in möglichst reiner Form vorliegt (Proteingemische erschweren den Identifikationsprozess), weshalb in den meisten Fällen der Proteasebehandlung eine gelelektrophoretische oder chromatographische Auftrennung der Proteine vorrausgeht. Einzelne „gepickte“ Banden werden dann mit der entsprechenden Protease verdaut und die Massen der Peptide mit MALDI-ToF ermittelt. Die gemessenen Peptidmassen werden mit Massenvorhersagen eines so genannten *in silico* Verdaus in einer Datenbank verglichen. Dabei macht man sich die Spezifität der Protease zu Nutze. So spaltet die Protease Trypsin Proteine nur nach Proteinbindungen C-terminal der Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R). Dadurch lässt sich vorhersagen, welche Masse die Peptide eines bekannten Proteins nach dem Verdau haben, sie sind wie ein Fingerabdruck spezifisch für jedes Protein (Dass, 2007).

Detektierte Massen werden mit den Massen aller in einer Datenbank vorkommenden Massenvorhersagen nach dem Verdau mit einer bestimmten Protease verglichen. Durch einen Suchalgorithmus wird ein „Score“ errechnet, der unter Berücksichtigung der Anzahl der Massen-Übereinstimmungen zwischen errechneten und gemessenen Massenlisten eine Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz der Identifizierung ausdrückt. Mascot (Perkins et al., 1999) stellt eine Suchmaschine dar, die für den Vergleich von Peptidmassen mit *in silico* Daten von Proteinen geschaffen wurde. Mascot nutzt den Suchalgorithmus MOWSE (*molecular weight search*) (Pappin et al., 1993). Der MOWSE-Score berücksichtigt neben Größe, Anzahl und Massengenauigkeit der Peptide, die Häufigkeitsverteilung bestimmter Peptidmassen innerhalb aller Proteine einer Spezies. Daraus ist ersichtlich, dass Peptide einer Masse von unterschiedlichen Proteinen stammen können. Daher sind mehrere Peptide eines Proteins für eine eindeutige Proteinidentifizierung notwendig.

Die PMF-Analyse erfolgte am Institut für Biochemie, Fachbereich 11 der JLU Gießen. Zur Identifikation wurden Banden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden im Wechsel in 50 µl 50 % (v/v) Acetonitril bzw. 50 mM Ammoniumbicarbonat für 10 Minuten gewaschen, um sie zu entfärben. Durch Inkubation für 45 min in 50 µl 10 mM DTT, 50 mM Ammoniumbicarbonat bei 56°C wurden Proteine reduziert.

In einem weiteren Schritt wurden durch 30-minütige Inkubation der ausgeschnittenen Gelbände in 50 µl 55 mM Iodacetamid, 50 mM Ammoniumbicarbonat die Cysteinreste der Proteine carbamidomethyliert. Anschließend wurden die Gelstücke zweimal im Wechsel mit 50 µl 50 % (v/v) Acetonitril bzw. 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Es folgte die Trocknung der Gelstücke. Lyophilisiertes Trypsin (Fa. Roche) wurde mit 1 mM HCl aktiviert und auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml eingestellt. 50 µl dieser Trypsinlösung wurden mit 100 µl Ammoniumbicarbonat-Puffer (50 mM) gemischt und 50 µl auf die Gelbände gegeben. Eine Inkubation erfolgte für 12 h bei 37°C auf dem Schüttler. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Peptide wurden jeweils für 20 min unter Schütteln mit 50 µl H₂O, anschließend mit 50 % (v/v) Acetonitril und schließlich mit 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA eluiert. Überstände der drei Inkubationen wurden gepoolt und getrocknet. Die Proben wurden in 10 µl 50 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und mit gesättigter DHB- und HCCA-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich) als Matrix gemischt und auf einer MALDI-Platte (stainless steel) getrocknet. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben in einem Ultraflex I ToF/ToF (Fa. Bruker Daltonics) ausgestattet mit einem N₂-Laser und einer LIFT MS/MS-Einheit. Das Gerät wurde im positiv-Ionen Reflektromodus benutzt. 200-400 Einzelspektren wurden für eine Analyse aufaddiert. Die Gerätesteuerung des Massenspektrometers und die Datenprozessierung erfolgte über die Software-Pakete: Compass 1.1, FlexControl 2.4, FlexAnalysis 3.0 und BioTools 3.0. Peptidmassen wurden mit der MASCOT-Suchmaschine gegen die NCBI Inr Datenbank verglichen. Die Suche wurde auf bovine Proteine limitiert. Eine Massenabweichung von 75 ppm wurde erlaubt und Carbamidomethylation wurde als generelle und die Oxidation von Methionin als variable Modifikation erlaubt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von BNP-Alloantikörpern

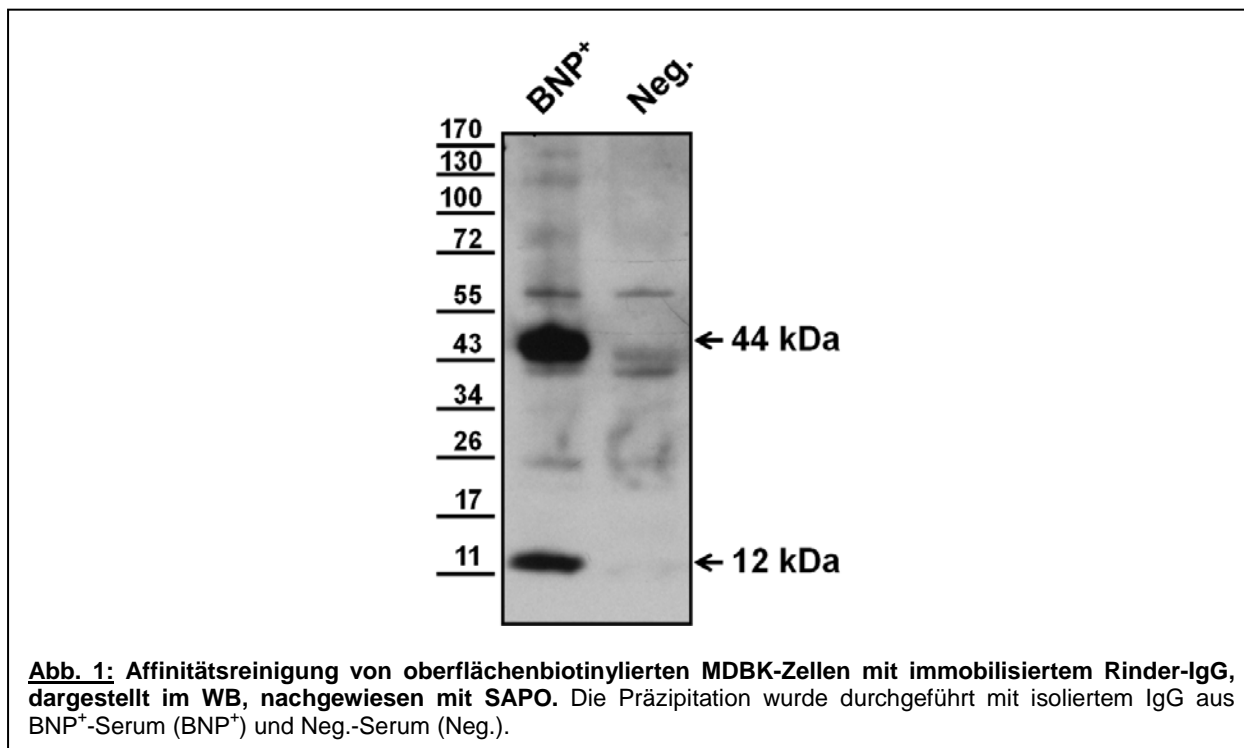
Bei der Suche nach der Ätiologie der BNP wurden toxische, infektiöse oder genetische Ursachen ausgeschlossen. Auffällig war, dass die große Mehrheit der Muttertiere von BNP-Kälbern mit der Vakzine PregSure[®] BVD immunisiert worden ist (Friedrich et al., 2009c). Außerdem war gezeigt worden, dass BNP-Muttertiere Allo-AK im Serum aufweisen, die an Leukozyten von Kälbern binden (Bridger et al., 2011). Diese Beobachtungen stellten die Basis für die vorliegenden Untersuchungen zur Ursache der BNP dar. Zweck dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen der Impfung mit PregSure[®] BVD und dem Auftreten von Allo-AK zu überprüfen. Dazu war es erforderlich das/die Zielantigen(e) der Allo-AK zu identifizieren.

5.1.1 BNP-Alloantikörper binden an Oberflächenproteine von bovinen Kulturzelllinien

Im Serum von BNP-Muttertieren befinden sich Allo-AK, die mit Oberflächenantigenen von primären Leukozyten reagieren (Bridger et al., 2011). Im Gegensatz zu primären bovinen Zellen erweist sich der Umgang mit Zelllinien als wesentlich einfacher und standardisierter. Daher sollte überprüft werden, ob Zielantigene der Allo-AK auf bovinen und nicht-bovinen Zelllinien vorkommen. Da eine Bindung der Allo-AK an Oberflächenantigene anzunehmen war, wurden die Zellen für einen indirekten Immunperoxidase-Test mit Paraformaldehyd fixiert. Seren von drei PregSure[®] BVD geimpften Muttertieren von BNP-Kälbern (BNP⁺-Seren) wurden eingesetzt. Hinzu kam ein Serum eines nicht gegen BVD geimpften BVDV-freien Tieres (Neg.-Serum) als Negativkontrolle. Die zu testenden Zelllinien wurden mit einer Verdünnungsreihe der Seren in PBS (1:25 - 1:3000) inkubiert. Der Nachweis der Alloantikörperbindung erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper Ziege-anti-Rind-IgG und AEC-Substrat. Getestet wurden MDBK-, BL-3-, SK-6-, und BHK-21-Zellen. In allen Verdünnungsstufen konnte die Bindung von Antikörpern der BNP⁺-Seren an die bovinen Zelllinien (MDBK- und BL-3-Zellen) nachgewiesen werden. Das Neg.-Serum zeigte in keiner Verdünnungsstufe eine Reaktivität gegen MDBK- oder BL-3-Zellen. Weder mit den BNP⁺-Seren noch mit dem Neg.-Serum wurde eine Antikörperbindung an die nicht-bovinen Zelllinien SK-6 (Schwein) und BHK-21 (Hamster) beobachtet.

5.1.2 BNP-Muttertier-IgG zeigt eine Reaktivität gegen 44 und 12 kDa Proteine von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen

Durch den indirekten Immunperoxidase-Test konnte gezeigt werden, dass Allo-AK aus BNP⁺-Seren an Oberflächenantigene von MDBK-Zellen binden. Um die Anzahl und molekulare Masse der Zielantigene herauszufinden, wurden Oberflächenproteine von MDBK-Zellen selektiv mit Biotin markiert. Bei der Markierungsmethode wird Biotin über ein NHS-Linkermolekül an die Proteine gebunden (EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin, Fa. Pierce). Die Biotinylierung bietet zum einen den Vorteil, dass nur Oberflächenantigene detektiert werden. Zum anderen ist der Nachweis von Biotin mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase sehr sensitiv (Daniels et al., 1998). Streptavidin ist ein Protein, das mit sehr hoher Affinität und Spezifität an Biotin bindet.



Zur Affinitätsreinigung der oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen wurden jeweils die IgG-Fraktion aus 2 ml BNP⁺-Serum und Neg.-Serum isoliert. Dazu wurde eine Protein-G-Säule (1 ml Volumen) verwendet. Protein G bindet selektiv die Fc-Region von IgG. Die isolierten AK des BNP⁺-Serums und des Neg.-Serums wurden jeweils an 200 µl NHS-Sepharose-Bead-

Suspension immobilisiert. N-Hydroxysuccinimid-Ester reagieren mit Aminogruppen von Proteinen. Es kommt zu einer kovalenten Bindung der Proteine an die Sepharosebeads. Mit derart immobilisierten AK bestand die Möglichkeit, Zielantigene von Allo-AK aus einer Lösung zu präzipitieren. Zu den immobilisierten IgG-Fractionen wurde jeweils das Lysat von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen gegeben. Das Präzipitat wurde von den Beads eluiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Biotin-markierten Oberflächenantigene wurden mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm visualisiert. Gegen einige Proteinspezies war sowohl eine Reaktivität von Antikörpern des BNP⁺-Serums als auch des Neg.-Serums zu beobachten. Eine spezifische Reaktion zeigten Allo-AK des BNP⁺-Serums mit zwei Proteinen, die als prominente Banden im Blot zu erkennen waren. Dabei handelt es sich um Proteine mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 12 kDa und ca. 44 kDa (Abb. 1).

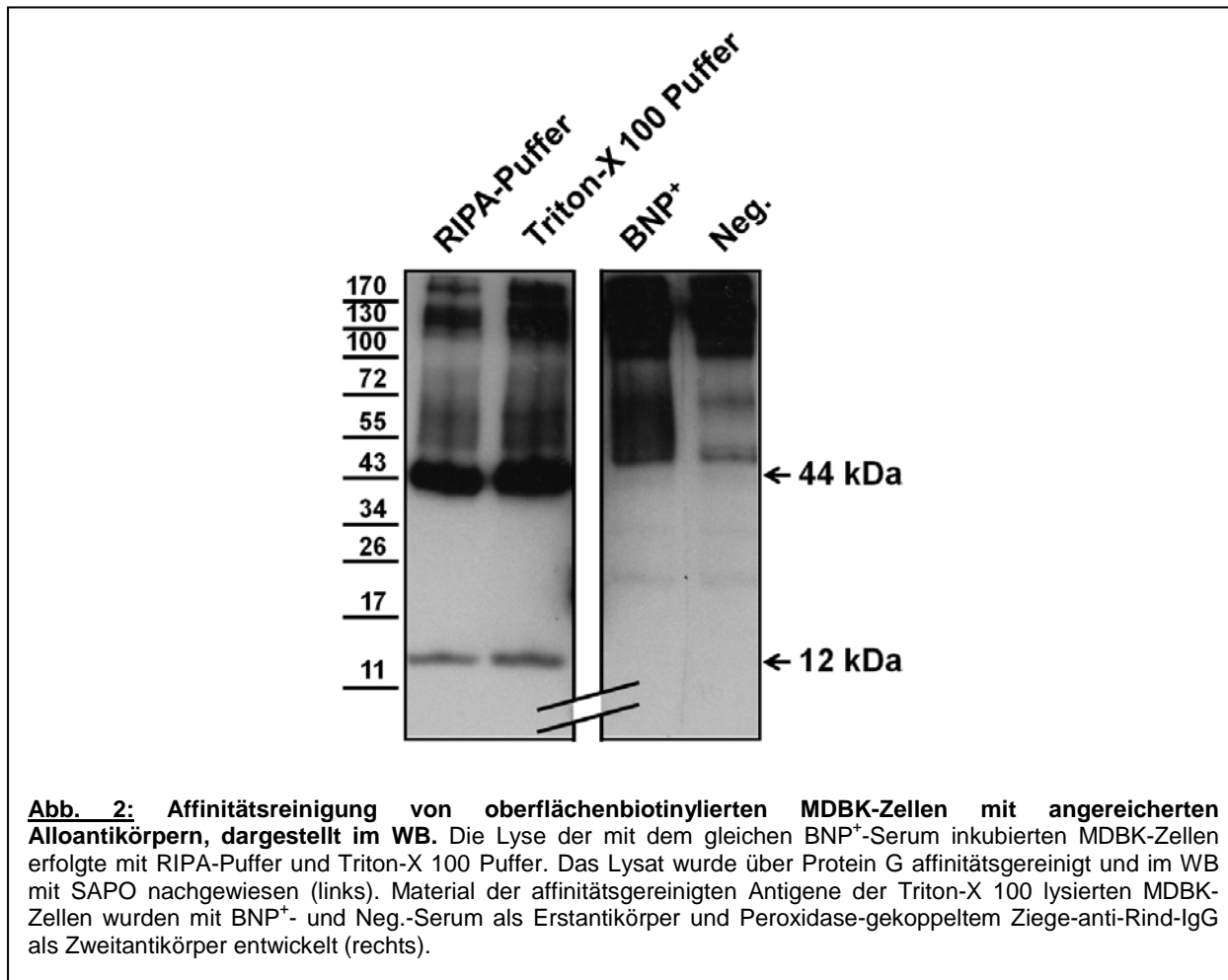
5.1.3 Optimierung der Affinitätsreinigung von oberflächenbiotinyliertem MDBK-Lysat mit Rinderserum

Allo-AK stellen nur einen kleinen Teil des IgG in BNP⁺-Serum dar. Um spezifisch Allo-AK an Protein G zu binden, wurden zunächst MDBK-Zellen biotinyliert und anschließend mit verdünntem BNP⁺-Serum inkubiert. Nicht gebundenen AK wurden durch Zentrifugation abgetrennt, die Zellen anschließend gewaschen, lysiert und die mit Antigenen assoziierten AK an Protein-G-aktivierte Sepharose gekoppelt. Testweise wurden Puffer mit zwei unterschiedlichen nichtionischen Detergentien zur Lyse der Zellen eingesetzt, die zuvor mit dem gleichen BNP⁺-Serum inkubiert worden waren. Zum einen handelt es sich dabei um einen Puffer mit Triton-X 100 (1 % (v/v) Triton-X 100; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA pH 7,4), zum anderen um RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl; pH 8,0). Biotinylierte Proteine wurden auf dem Blot in gleicher Weise wie zuvor beschrieben durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Die Banden bei 12 und 44 kDa, die zuvor schon bei der Affinitätsreinigung mit der Gesamt-IgG-Fraktion zu sehen waren (Abb. 1), konnten mit dem optimierten Versuchsaufbau wieder dargestellt werden (Abb. 2, links). Die Intensität der Banden erschien bei den Triton-X 100 lysierten Zellen geringfügig stärker als bei der Probe, bei der RIPA-Puffer verwendet wurde.

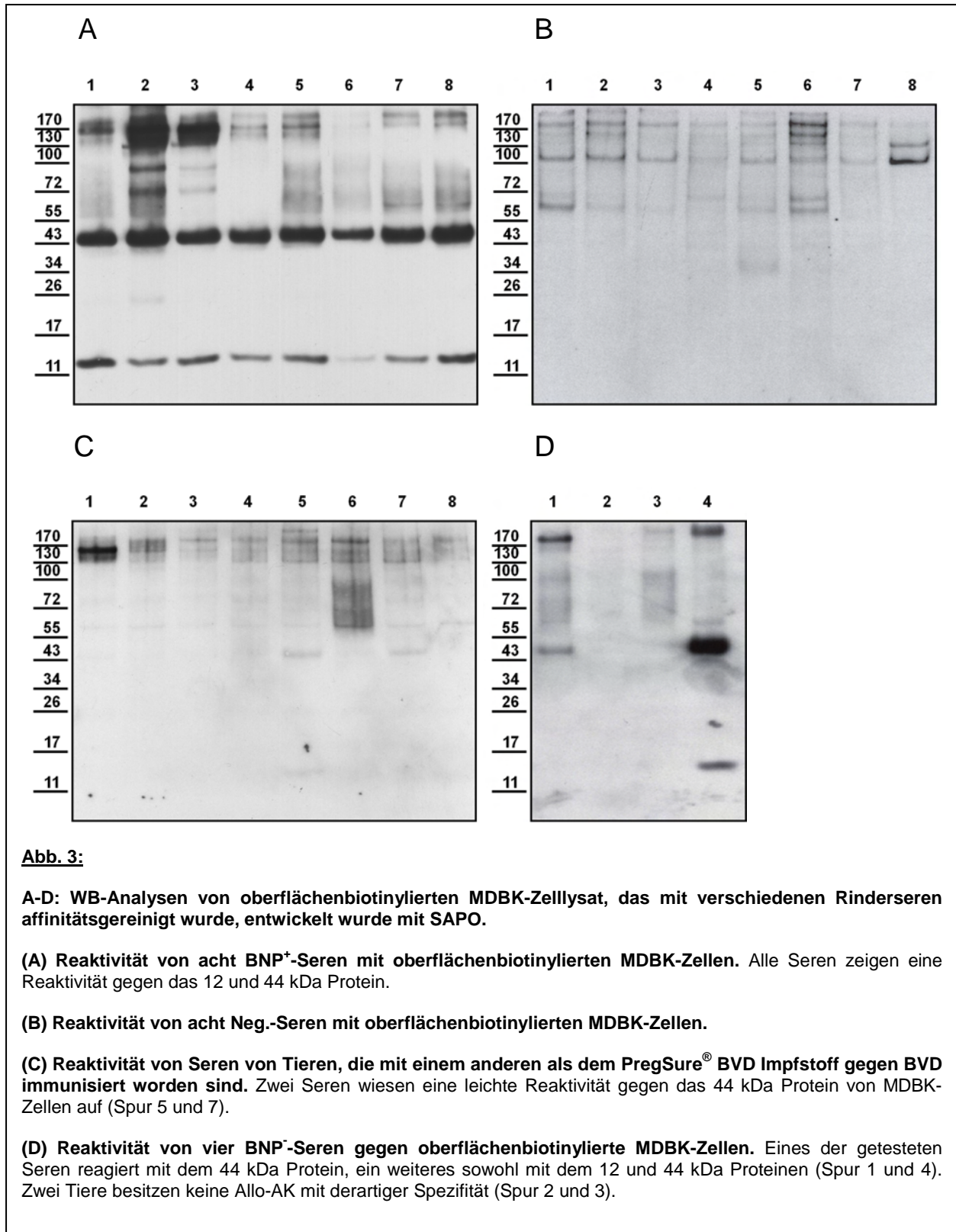
Material der Triton-X 100 lysierten Probe wurde in einem weiteren Western Blot (Abb. 2, rechts) mit BNP⁺- und Neg.-Serum als Erstantikörper inkubiert. Als Zweitantikörper diente Peroxidase-

gekoppeltes Ziege-anti-Rind-IgG. Der Blot wurde mit Chemilumineszenz auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die beiden Seren zeigten eine Reaktivität gegen verschiedene Antigene der MDBK-Zellen. Es konnte allerdings keine Bande bei 12 und 44 kDa beobachtet werden.



5.1.4 Nur Serum von PregSure[®] BVD geimpften Tieren zeigt eine Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein

Die Affinitätsreinigung mit angereicherten Allo-AK wurde als Standardversuch zum Nachweis von Reaktivitäten gegen oberflächenbiotinylierte MDBK-Zellen mit Seren von verschiedenen Spendertieren durchgeführt. Zwölf BNP⁺-Seren wurden getestet. Die Tiere stammten von zwei Betrieben, in denen BNP-Fälle registriert worden waren. Alle BNP⁺-Seren reagierten mit den beiden Antigenen von 12 und 44 kDa Masse.

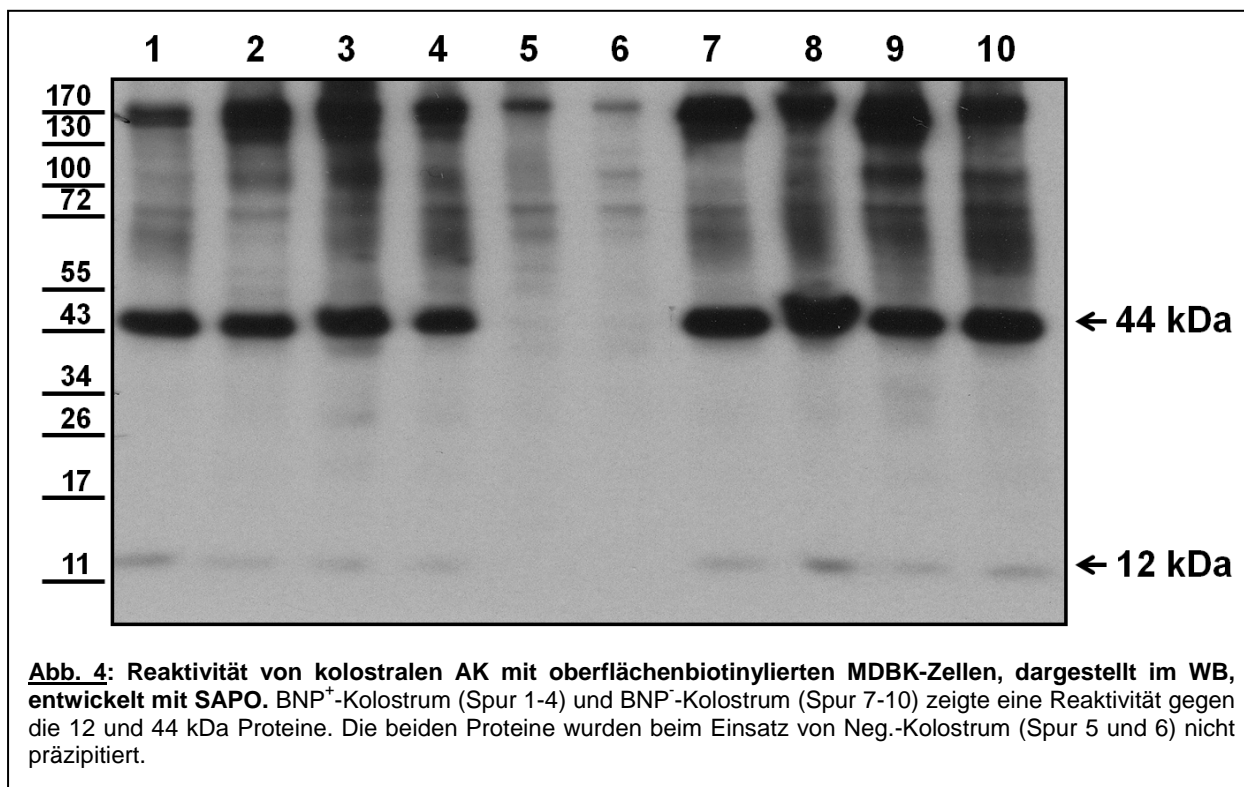


Individuell konnten geringe Unterschiede in der Signalintensität der beiden Banden zwischen verschiedenen Seren festgestellt werden, wobei die Signalintensitäten der beiden Proteine (12 und 44 kDa) korreliert zu sein schien (die Reaktivität von 8 Seren ist in Abb. 3A dargestellt). Individuell reagierten alle BNP⁺-Seren auch mit unterschiedlichen anderen Oberflächenantigenen der MDBK-Zellen. Die Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein stellte dabei die einzige Allo-Spezifität dar, die alle getesteten BNP⁺-Seren gemeinsam hatten. Viele der individuellen Spezifitäten traten auch beim Einsatz der Negativkontrollseren auf (s.u.), so dass es sich hierbei vermutlich nicht um die gesuchte Alloantikörperspezifität handelt. Keines der acht Seren aus der Negativkontrollgruppe (Neg.-Seren) zeigte eine Reaktivität gegen das 12 oder 44 kDa Protein von biotinylierten MDBK-Zellen (Abb. 3B). BNP wurde nur im Zusammenhang mit der PregSure[®] BVD-Impfung beobachtet. Daher wurden Seren von Tieren untersucht, die mit anderen BVD-Impfstoffen immunisiert worden sind. Für den Test standen Seren von acht Muttertieren ohne Fälle von BNP bei ihrer Nachkommenschaft zur Verfügung. Seren von sechs der Tiere wiesen keine Allo-AK gegen das 12 und 44 kDa Protein auf (Abb. 3C). Zwei der Seren zeigten eine sehr schwache Reaktivität mit dem 44 kDa Protein (Abb. 3C, Spuren 5 und 7). Eine vierte Gruppe bestand aus Seren von PregSure[®] BVD geimpften Muttertieren, deren Nachwuchs keine BNP-Symptome entwickelt hat (BNP⁻-Seren). Eines der getesteten Seren zeigte eine schwache Reaktivität mit dem 44 kDa Protein (Abb. 3D, Spur 1). Im Serum eines anderen Tieres waren Antikörper gegen das 12 kDa und das 44 kDa Protein nachweisbar (Abb. 3D, Spuren 4). Die Seren der beiden übrigen Tiere wiesen keine Reaktivität gegen diese Proteinspezies auf (Abb. 3D, Spuren 2 und 3).

5.1.5 Nachweis von Allo-AK gegen das 12 und 44 kDa Protein in Rinderkolostrum

Studien haben gezeigt, dass dem Kolostrum in der BNP-Pathogenese eine große Bedeutung zukommt (Friedrich et al., 2009b). Sollten Antikörper gegen das 12 und 44 kDa Protein in die BNP-Pathogenese involviert sein, so müssten diese Allo-AK auch im Kolostrum nachweisbar sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Affinitätsreinigung von oberflächenbiotinyliertem MDBK-Lysat mit Kolostrum verschiedener Muttertiere durchgeführt. Vier Kolostrumstammten von Muttertieren, die BNP-Kälber hervorgebracht hatten (BNP⁺-Kolostrum). Vier weitere Kolostrum wurden von PregSure[®] BVD geimpften Muttertieren gewonnen, bei deren Nachwuchs BNP nicht aufgetreten war (BNP⁻-Kolostrum). Als Kontrolle dienten Kolostrum von zwei nicht gegen BVD geimpften, BVDV-freien Tieren (Neg.-Kolostrum). Alle Kolostrumproben wurden den Tieren innerhalb von zwei h *post partum* entnommen.

Kolostrale Antikörper von PregSure® BVD geimpften Tieren zeigten eine Bindung an die 12 und 44 kDa Antigene (Abb. 4, Spur 1-4 und 7-10), während die beiden Neg.-Kolostrum keine diesbezügliche Spezifität aufwiesen (Abb. 4, Spur 5-6).



5.1.6 Allo-AK zeigen eine Reaktivität mit dem 12 und 44 kDa Protein von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)

Im Serum PregSure® BVD geimpfter Tiere wurden Allo-AK mit einer Reaktivität gegen ein 12 und 44 kDa Protein von MDBK-Zellen nachgewiesen. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass BNP-Muttertiere Allo-AK besitzen, die an primäre Leukozyten von Kälbern binden (Bridger et al., 2011). Deshalb wurde überprüft, ob Allo-AK aus BNP⁺-Serum auch an das 12 und 44 kDa von PBMCs binden. Zu diesem Zweck wurden PBMCs aus Natriumcitrat-stabilisiertem Rinder-Vollblut gewonnen. Bei PBMCs handelt es sich um „peripheral blood mononuclear cells“, eine Zellfraktion des Blutes, zu der Zellen des Immunsystems (Lymphocyten und Monocyten) gehören. Die PBMCs wurden oberflächenbiotinyliert und mit

einem BNP⁺-Serum affinitätsgereinigt. Bei den PBMC-Spendertieren handelte es sich um ein PregSure[®] BVD geimpftes Tier ohne Bluterkalb (PBMCs BNP⁻) und ein Kalb, das als empfänglich für BNP galt (PBMCs EK) (Bridger et al., 2011). Das BNP⁺-Serum besaß neben Allo-AK anderer Spezifität eine Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein von den PBMCs beider Spendertiere (Abb. 5). Um Autoantikörper auszuschließen, wurden PBMCs des Tieres gewonnen, von dem das in diesem Versuch eingesetzte BNP⁺-Serum stammte (PBMCs BNP⁺). Auch diese PBMCs wurden oberflächenbiotinyliert und mit dem eigenen BNP⁺-Serum affinitätsgereinigt. Es konnte keine Autoreaktivität des BNP⁺-Serums gegen Oberflächenproteine der eigenen PBMCs nachgewiesen werden.

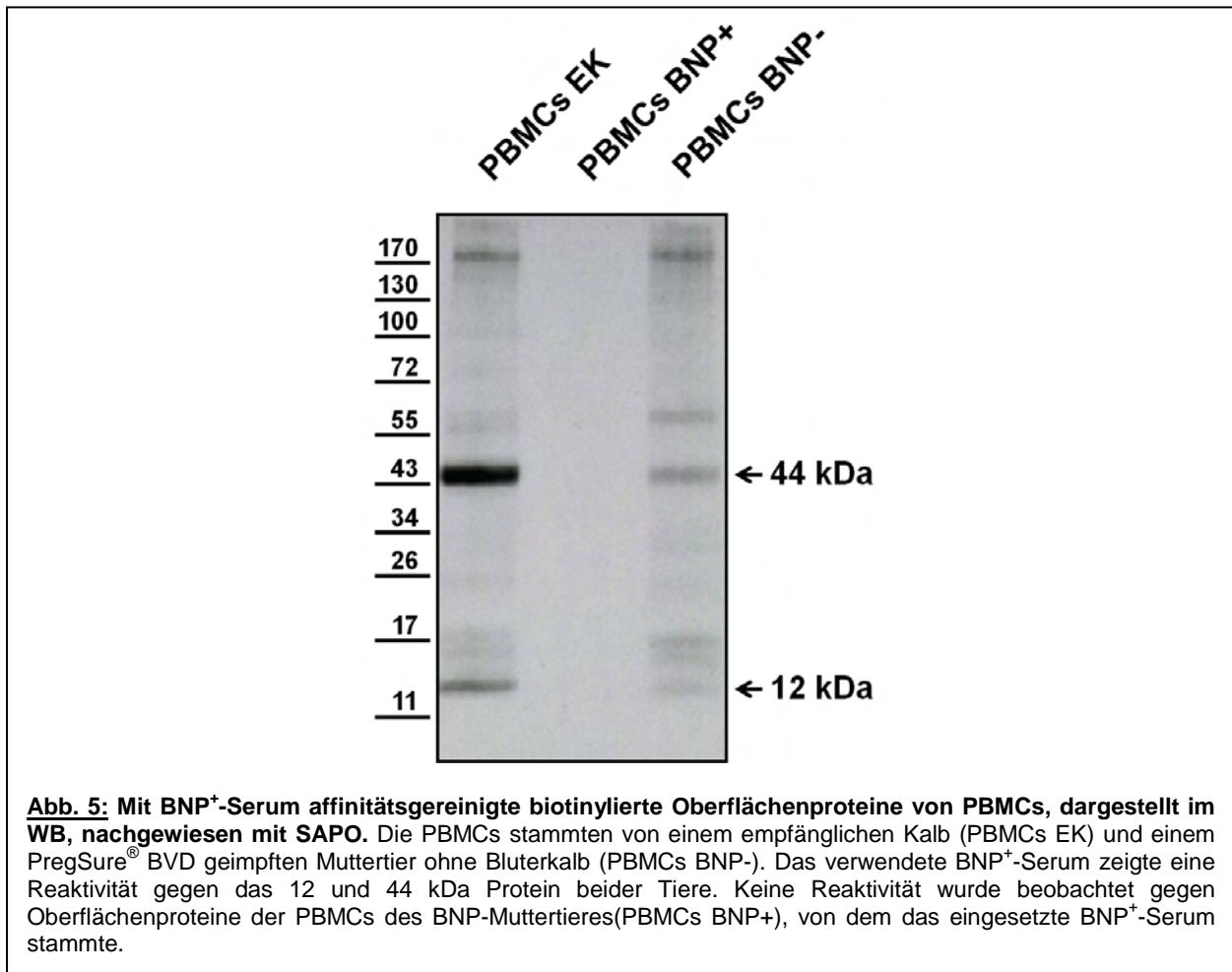


Abb. 5: Mit BNP⁺-Serum affinitätsgereinigte biotinylierte Oberflächenproteine von PBMCs, dargestellt im WB, nachgewiesen mit SAPO. Die PBMCs stammten von einem empfänglichen Kalb (PBMCs EK) und einem PregSure[®] BVD geimpften Muttertier ohne Bluterkalb (PBMCs BNP⁻). Das verwendete BNP⁺-Serum zeigte eine Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein beider Tiere. Keine Reaktivität wurde beobachtet gegen Oberflächenproteine der PBMCs des BNP⁺-Muttertieres (PBMCs BNP⁺), von dem das eingesetzte BNP⁺-Serum stammte.

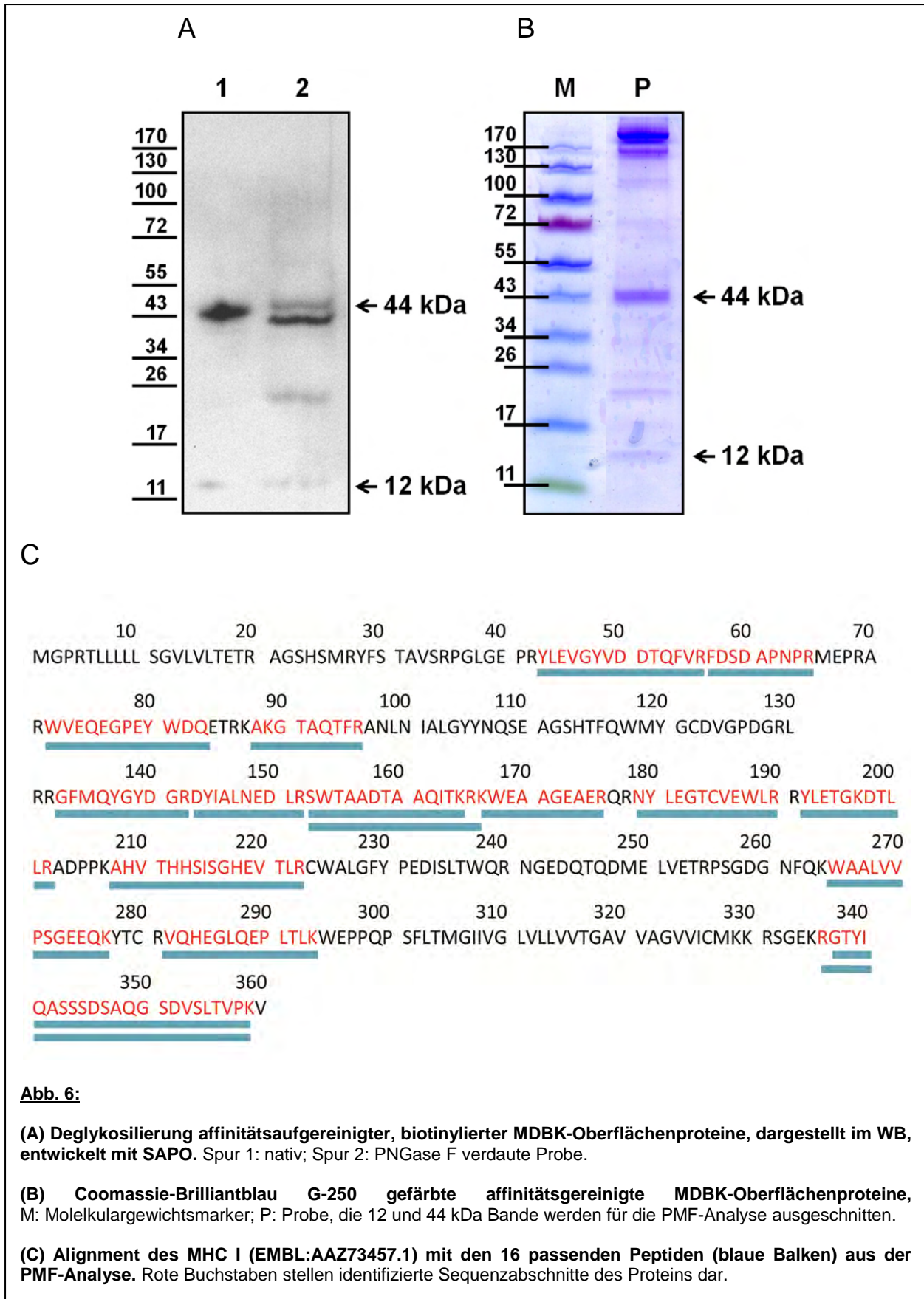
5.2 Identifizierung der Zielantigenen der BNP-Alloantikörpern

5.2.1 Deglykosilierung

Der Reaktivität von Allo-AK PregSure[®] BVD geimpfter Tiere mit den 12 und 44 kDa Proteinen könnte eine wichtige Rolle in der BNP-Entstehung zukommen. Daher war es wichtig die Identität dieser beiden Proteine herauszufinden. Um eine erste Idee zu erhalten, um welche Proteinspezies es sich handeln könnte, wurde eine Deglykosilierung durchgeführt. Die Glykosilierung stellt eine posttranslationale Modifikation von Proteinen dar. Am Häufigsten tritt die N-glykosidische Bindung auf. Bei dieser findet die Bindung des Glykans an die Säureamidgruppe von Asparagin (N) im rauhen endoplasmatischen Retikulum statt. PNGase F ist ein Enzym, das N-glykosidische Bindungen über Desaminierung des Asparagins spaltet (Plummer et al., 1991). Dieses Enzym wurde zu einer mit BNP⁺-Serum affinitätsgereinigten, biotinylierten Oberflächenpräparation von MDBK-Zellen gegeben. Das deglykosilierte Material wurde im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet und mit Chemilumineszenz sichtbar gemacht (Abb. 6A). Eine Verminderung der apparenten molekularen Masse des 44 kDa Proteins um ca. 4 kDa war zu beobachten. Es handelt sich folglich um ein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundenem Zuckeranteil. Das 12 kDa Protein zeigte keine Massenverschiebung nach PNGase F Verdau. Sowohl die apparente molekulare Masse sowie der Glykosylierungsstatus des 44 kDa Proteins als auch das gemeinsame Auftreten können als Indiz gewertet werden, dass es sich bei den beiden Proteinen um den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I (MHC I, 44 kDa) und β_2 -Mikroglobulin (β_2 M, 12 kDa) handelt.

5.2.2 Identifizierung von MHC I und β_2 M mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Zur Identifikation des 12 und 44 kDa Proteins wurden 3×10^7 biotinylierte MDBK-Zellen mit BNP⁺-Serum affinitätsgereinigt. Die aufgereinigten Antigene wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliantblau G-250 gefärbt, die 12 und 44 kDa Bande (Abb. 6B) ausgeschnitten und einem in-situ-Gelverdau mit Trypsin unterzogen. Die resultierenden Peptidmassen wurden am Institut für Biochemie, Fachbereich 11 der JLU Gießen ermittelt und eine Peptide-Mass-Fingerprinting-Analyse (PMF) durchgeführt. Mit PMF können an Hand der Peptidmassen nach dem Verdau mit einer Endoprotease Proteine identifiziert werden.



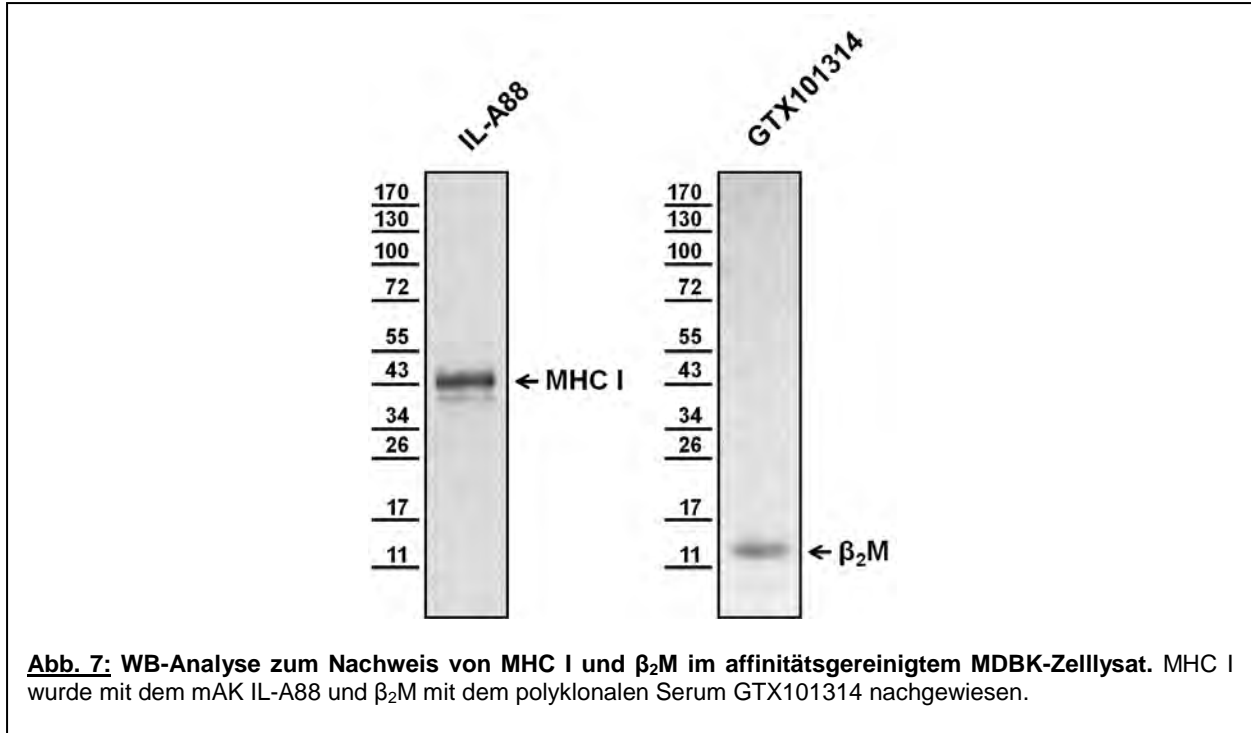
Dabei macht man sich zu Nutze, dass der Verdau eines bestimmten Proteins mit einer Endoprotease immer zu den gleichen Peptiden führt. Trypsin schneidet Proteinbindungen C-terminal von Lysin (K) und Arginin (R). Die Massen der entstehenden Peptide werden mit einem geeigneten Massenspektrometer ermittelt. So entsteht ein Peptid-Massenmuster, das spezifisch, wie ein Fingerabdruck, für jedes Protein ist. Das Massenmuster wird anschließend mit einer Datenbank verglichen. So können die Peptide den Proteinen aus denen sie hervorgegangen sind, zugeordnet werden (Dass, 2007).

Sechzehn Peptide aus der 44 kDa Bande passten mit einer Sequenzabdeckung von 49,2 % zu zwei Varianten des MHC I, der beim Rind auch als bovine leukocyte antigen class I (BoLA I) bezeichnet wird. Bei den beiden MHC-I-Molekülen handelt es sich um die sehr ähnlichen Varianten EMBL:AAZ73457 und AAZ73463.

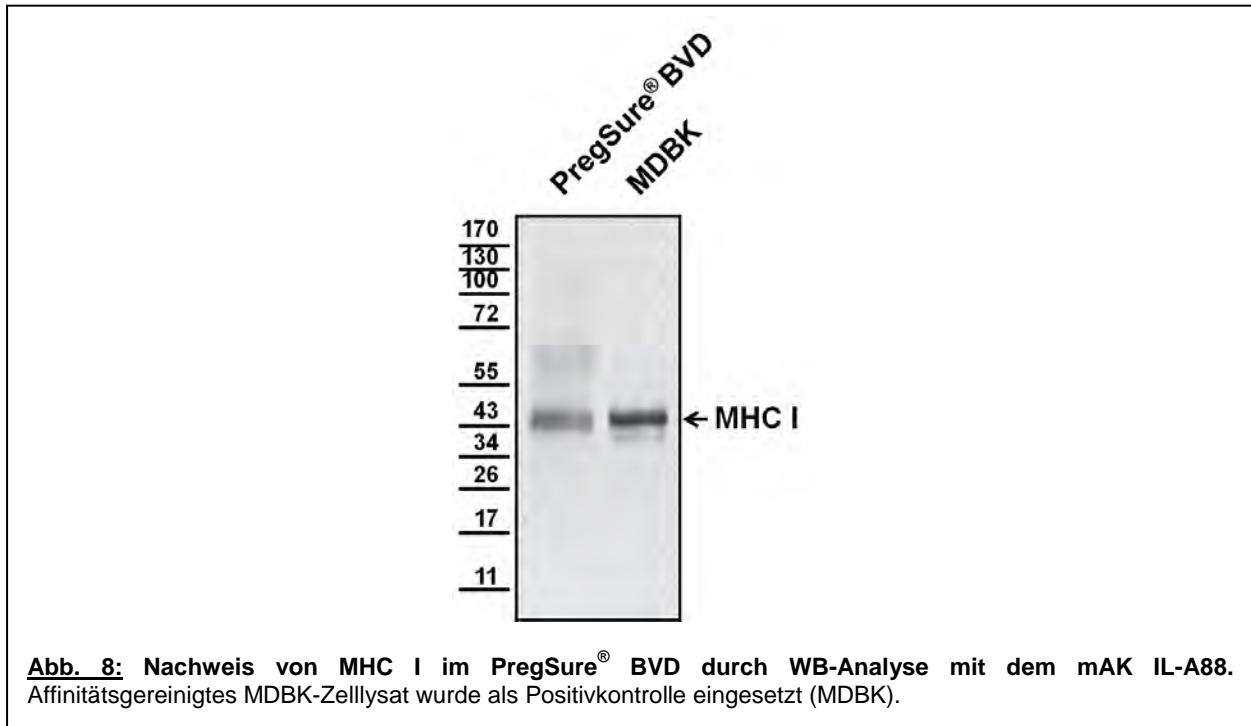
Durch die hohe Sequenzabdeckung lässt sich mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit sagen, dass es sich bei dem Protein um MHC I handelt (Abb. 6C). Zwei Peptide (997,6 Da; 1127,6 Da) der 12 kDa Bande (₆₈SEQSDLFSFSK und ₁₀₃HVTLEQPR) passten mit einer Sequenzabdeckung von 15,3 % zum bovinen β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) (EMBL:AAI18353). β_2 -Mikroglobulin ist stets mit dem MHC I assoziiert.

5.2.3 Serologische Bestätigung der Identifizierung von MHC I und β_2 M

Um die Ergebnisse der PMF-Analyse zu bestätigen, wurde untersucht, ob das affinitätsgereinigte Material mit MHC-I- bzw. β_2 M-spezifischen Antikörpern reagiert. Dazu wurde das Material durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Als Erstantikörper diente zum Nachweis von bovinem MHC I der murine mAK IL-A88 anti BoLA I (Toye et al., 1990). Der IL-A88 zeigte mit dem 44 kDa Protein aus affinitätsgereinigtem MDBK-Lysat eine deutliche Reaktivität, wodurch die Identität des Proteins serologisch bestätigt werden konnte (Abb. 7, links). Zur Verifizierung des β_2 M wurde das kommerzielle polyklonale Kaninchenserum GTX101314 (Fa. GeneTex) anti-humanem β_2 M und als Zweitantikörper Peroxidase-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG eingesetzt. Das GTX101314 wurde zuvor auf seine Kreuzreaktivität mit bovinem β_2 M im Western Blot mit rekombinant erzeugtem, reifem bovinem β_2 M (EMBL: AAI18353, AS 21-119) getestet (Groves et al., 1982). Das Serum reagierte in diesem Test positiv mit rekombinantem, bovinem β_2 M (Daten nicht gezeigt). Im affinitätsgereinigten MDBK-Lysat wurde ebenfalls β_2 M mit dem GTX101314 detektiert (Abb. 7, rechts).



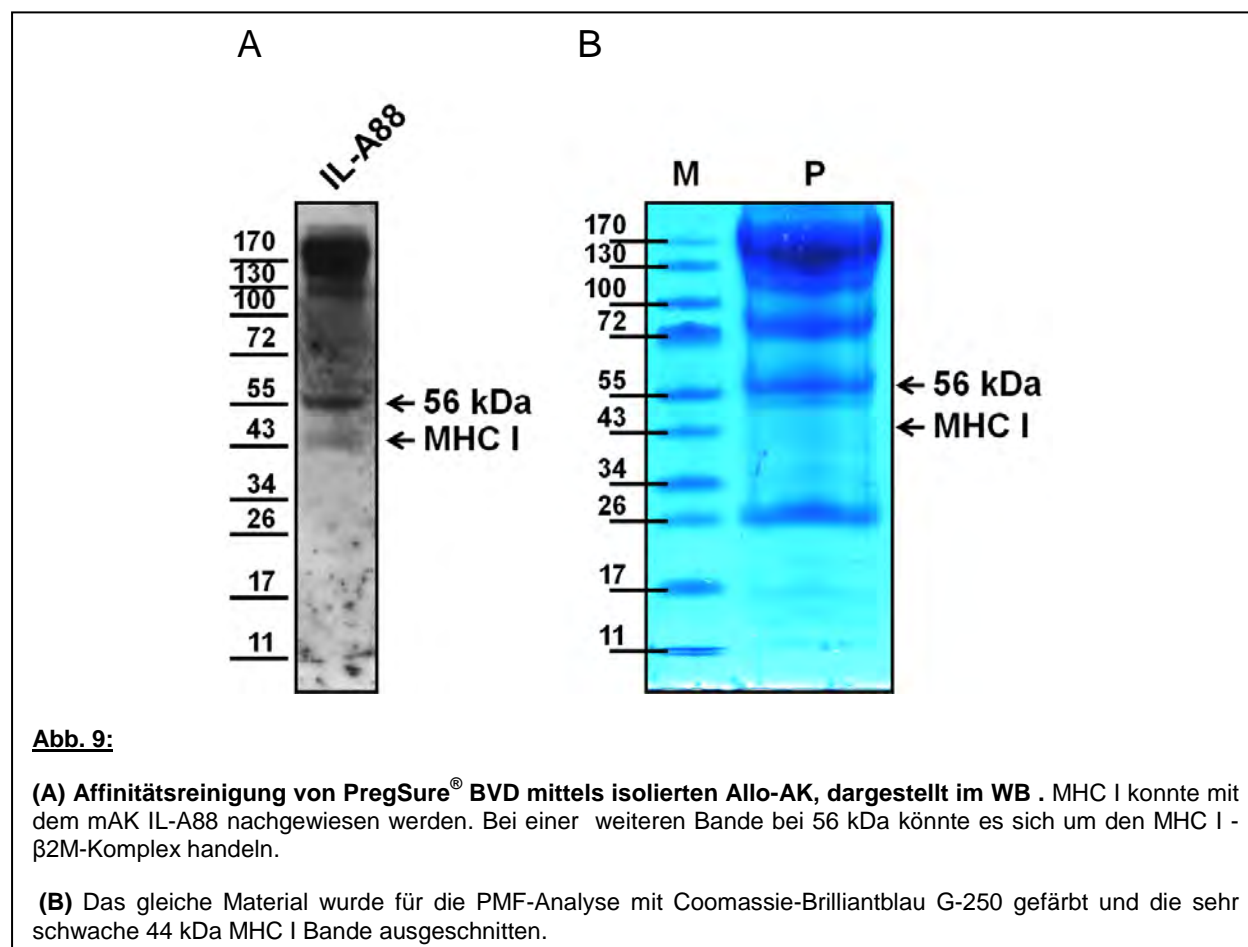
5.3 Charakterisierung des PregSure[®] BVD-Impfstoff



Bei der Mehrheit PregSure® BVD geimpfter Tiere konnten Allo-AK gefunden werden, die den MHC I erkennen. Sollte tatsächlich der Impfstoff für die MHC-I-spezifischen Allo-AK verantwortlich sein, so müsste PregSure® BVD nachweisbare Mengen von MHC I enthalten. Zum Nachweis wurde das in 1 ml PregSure® BVD enthaltene Protein im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Durch den mAK IL-A88 ließ sich eine MHC-I-spezifische Bande eindeutig nachweisen (Abb. 8).

5.3.1 Identifizierung im PregSure® BVD enthaltener MHC-I-Varianten

Zur Analyse der MHC-I-Varianten im PregSure® BVD durch PMF wurde Impfstoffprotein aus 50 ml Impfstoff mit Allo-AK affinitätsgereinigt. Zuvor waren die Allo-AK aus acht BNP⁺-Seren durch Bindung an MDBK-Zellen und Elution mit Natrium-Citrat-Puffer pH 3,5 angereichert und an Protein G gekoppelt worden.



Zur Kontrolle wurde im Western Blot mit dem mAK IL-A88 nachgewiesen, dass MHC I angereichert worden ist. Eine schwächere Bande wurde bei 44 kDa und eine stärkere bei 56 kDa beobachtet (Abb. 9A). Da der mAK IL-A88 eine Reaktivität mit dem 56 kDa Protein zeigt, scheint es sich um einen Komplex von MHC I zu handeln. Die apparente Masse ist ein Indiz dafür, dass es sich um den MHC I - β_2 M-Komplex (56 kDa) handelt. Man könnte spekulieren, dass die beiden Proteine während des Produktionsprozesses des Impfstoffs kovalent aneinander gebunden werden und deshalb im Gel nicht mehr getrennt dargestellt werden können. Das gleiche Material wurde für die PMF-Analyse im SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit einer sehr sensitiven kolloidalen Coomassie-Brilliantblau-G-250-Lösung gefärbt (Abb. 9B). Die sehr schwache 44 kDa Bande wurde ausgeschnitten und mit Trypsin behandelt. Mit der anschließenden PMF-Analyse konnten insgesamt zehn Peptide ermittelt werden, die zu 13 unterschiedlichen MHC-I-Varianten passten. Die erhaltenen MOWSE-Scores ließen keine signifikante Identifizierung einzelner MHC-I-Varianten zu.

5.4 Nachweis von MHC-I-Allo-AK korreliert nicht immer mit BNP

MHC-I-Allo-AK konnten auch bei Tieren nachgewiesen werden, die zwar PregSure[®] BVD geimpft waren, aber bislang noch kein an BNP erkranktes Kalb hervorgebracht haben (BNP⁻). Sollten die MHC-I-Allo-AK das BNP-Syndrom verursachen, so scheint es widersprüchlich, dass derartige AK auch bei BNP⁻ auftreten. Um Unterschiede zwischen BNP⁻ Tieren mit MHC-I-Allo-AK und BNP⁺ Tieren aufzudecken, wurde dieses Phänomen an einer Herde untersucht. Genetische Einflussfaktoren wurden weitestgehend dadurch ausgeschlossen, dass mit Proben von Vollgeschwistern gearbeitet wurde. Die beprobten Mutterkühe (Holstein-Friesian x Charolais) waren genetisch sehr homogen, da alle Tiere aus Embryotransfer stammten und auf dieselben Elterntiere zurückgingen. Das Probenmaterial für diesen Versuch stammte vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf. Vier der Tiere hatten BNP-Kälber hervorgebracht (BNP⁺), bei vier Tieren war bisher kein solcher Fall aufgetreten (BNP⁻). Alle Tiere des Bestandes waren grundimmunisiert mit PregSure[®] BVD. Die Impfung mit dieser Vakzine erfolgte einmal jährlich. Von jedem Tier lag eine gepaarte Serumprobe vor. Die eine Probe wurde zum Zeitpunkt einer Auffrischungsimpfung mit PregSure[®] BVD genommen, die andere in einem Abstand von 14 Tagen nach der Impfung. Die Anzahl der Auffrischungsimpfungen variierte in Abhängigkeit des Alters von Tier zu Tier.

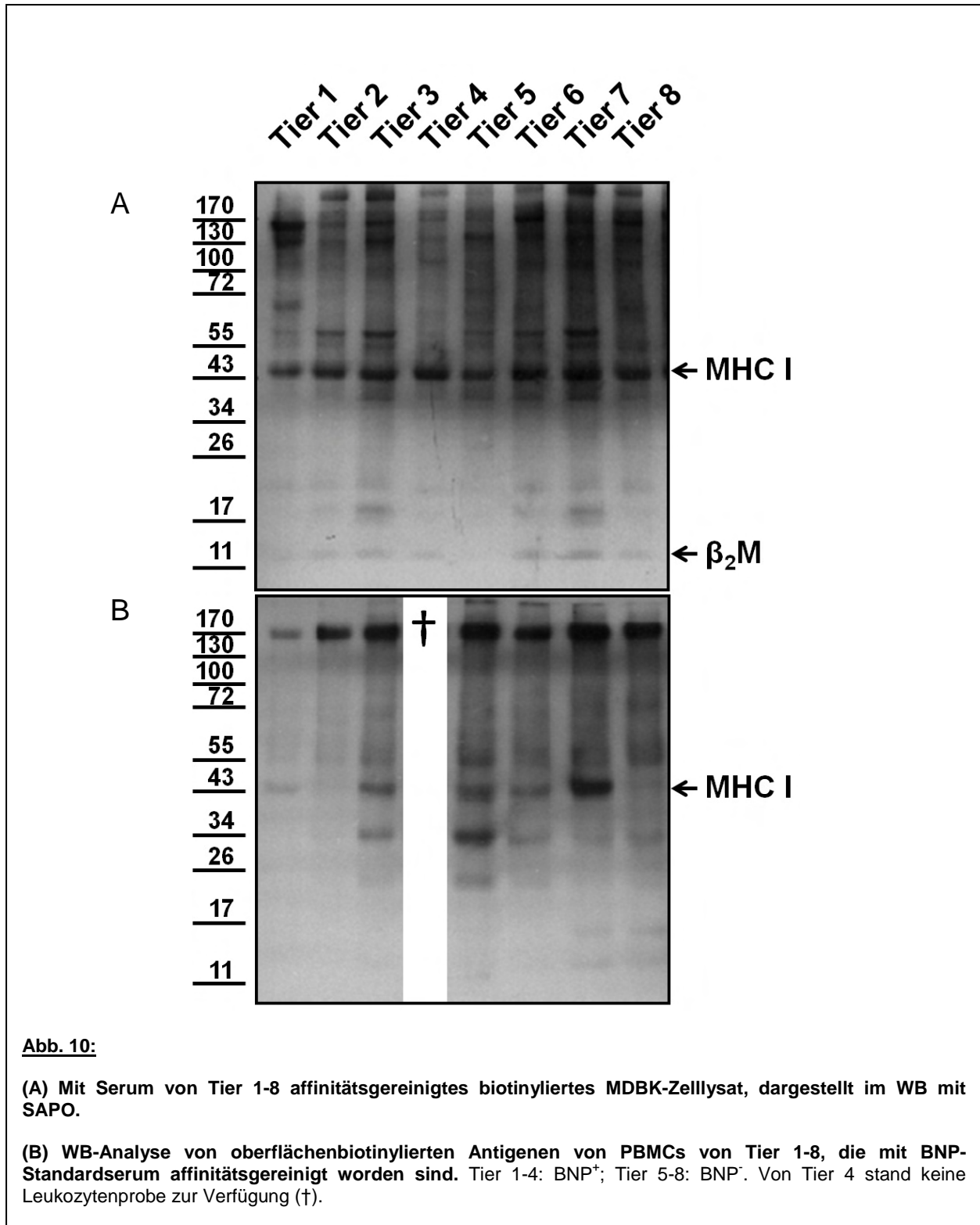


Abb. 10:

(A) Mit Serum von Tier 1-8 affinitätsgereinigtes biotinyliertes MDBK-Zelllysat, dargestellt im WB mit SAPO.

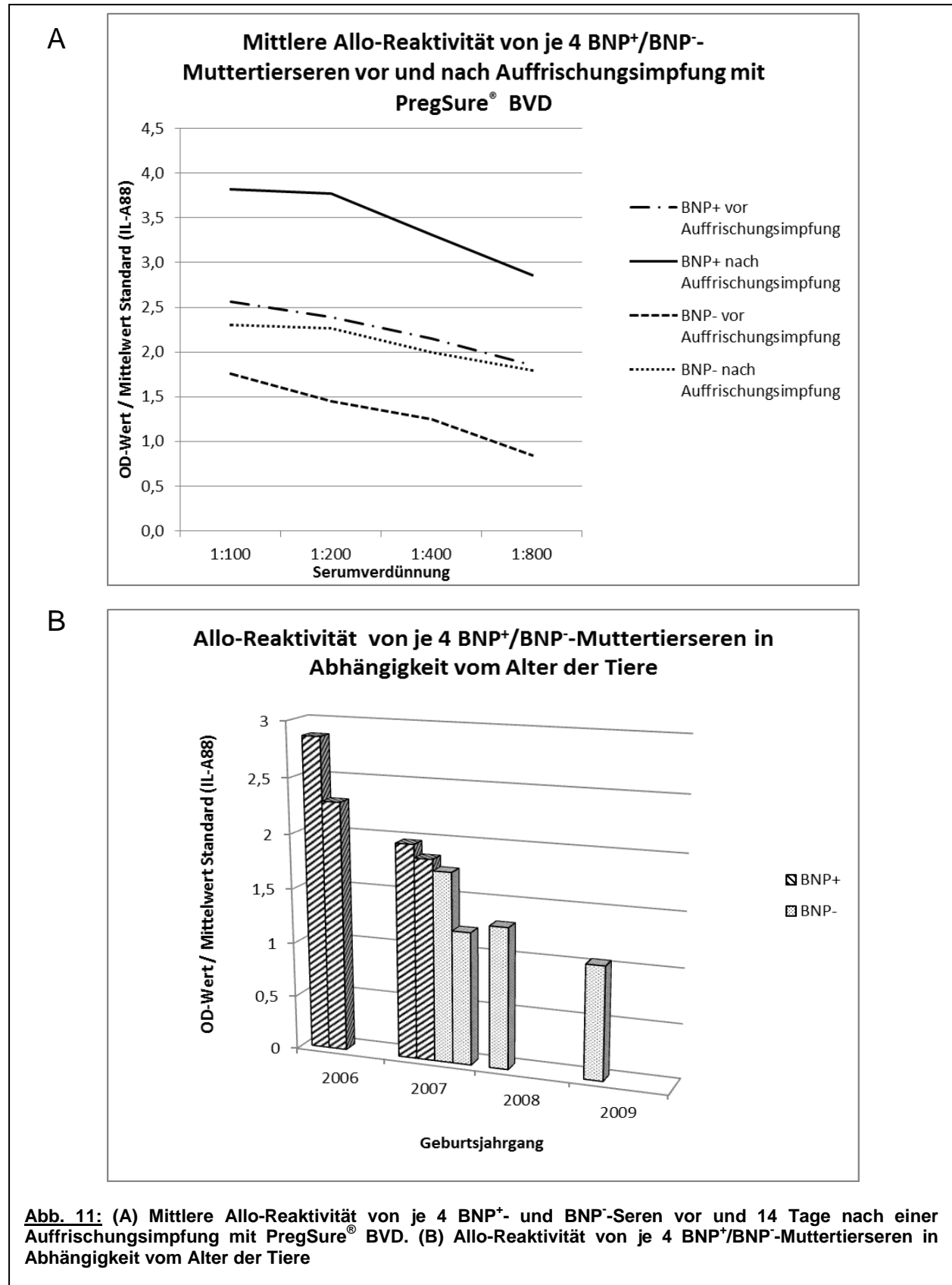
(B) WB-Analyse von oberflächenbiotinylierten Antigenen von PBMCs von Tier 1-8, die mit BNP-Standardserum affinitätsgereinigt worden sind. Tier 1-4: BNP⁺; Tier 5-8: BNP⁻. Von Tier 4 stand keine Leukozytenprobe zur Verfügung (†).

Zunächst wurde das Serum, das den Tieren vor der Auffrischungsimpfung entnommen worden ist, auf seine Reaktivität mit oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen getestet (vgl. Kap.: 5.1.3). Alle Tiere zeigten eine Reaktivität gegen MHC I der MDBK-Zellen (Abb. 10A). Aus Vollblut, das von sieben der Tiere zur Verfügung stand (Tier 4 war zum Zeitpunkt der Entnahme bereits abgegangen), wurden die PBMCs separiert und mit einem BNP-Standardserum affinitätsgereinigt. Bei dem BNP-Standardserum handelte es sich um gepooltes BNP⁺-Serum von acht Tieren mit starker MHC-I-Reaktivität.

Es zeigte sich, dass das BNP-Standardserum mit MHC-I-Varianten von zwei der drei BNP-Muttertiere und von drei der vier Muttertiere ohne BNP-Kalb reagiert hat. Keine Reaktion mit den MHC-I-Varianten wurde bei den beiden übrigen Tieren (Abb. 10B, Tier 2 und 8) gesehen.

5.4.1 Quantifizierung von BNP-Alloantikörpern

Die in Kap. 5.4 dargestellten Ergebnisse warfen die Frage nach dem Unterschied der BNP-Muttertiere (BNP⁺) und der Muttertiere ohne BNP-Kalb (BNP⁻) auf, da alle Tiere Allo-AK gegen MHC I besaßen. Es wurde vermutet, dass eine gewisse Menge an MHC-I-Allo-AK im Serum der Muttertiere vorhanden sein muss, damit es zur Auslösung des BNP-Syndroms bei ihrem Nachwuchs kommt. Dieser Theorie zur Folge sollten die vier BNP⁻-Tiere geringere MHC-I-Alloantikörpertiter aufweisen als die vier BNP⁺-Tiere. Um diesen quantitativen Effekt zu überprüfen, wurde ein ELISA-System entwickelt. Da isoliertes Antigen nicht zur Verfügung stand, wurden MDBK-Zellen zur Etablierung eines semiquantitativen Zell-ELISA (CELISA) genutzt. Der Gebrauch von intakten Zellen in ELISA-Systemen wurde zuvor bereits beschrieben (Arunachalam et al., 1990; Bishop et al., 1992; Effros et al., 1985; Wewetzer et al., 1996). Für den CELISA wurden MDBK-Zellen bis zu einer 90 % Konfluenz auf 96-well Platten herangezogen. Da für den Versuch allein die Oberflächenproteine der MDBK-Zellen von Interesse waren, wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit einer Verdünnungsreihe von Rinderserum verdünnt in PBS_{Tween} (1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1000) inkubiert. Bei den Seren handelte es sich um fünf BNP⁺-Seren und vier Neg.-Seren. Als Standard diente eine unverdünntes Aliquot des mAK IL-A88. Die Antikörperbindung wurde mit den speziesspezifischen Sekundärantikörpern und TMB-Medium dargestellt und im ELISA-Reader quantifiziert.



Optimal für die Auswertung erwies sich eine Serumverdünnung von 1:200. In dieser Verdünnungsstufe variierten die OD-Werte der Neg.-Seren zwischen 0,51 und 0,81. Die OD-Werte der fünf BNP⁺-Seren lagen zwischen 1,84 und 2,58. Der höchste Wert wurde mit 2,87 erzielt, wenn die 5 BNP⁺-Seren gepoolt eingesetzt wurden. Um die Werte zu standardisieren, wurden diese als Quotient aus dem ermittelten OD-Wert und dem OD-Mittelwert des Standards angegeben. Der Mittelwert der OD-Werte des IL-A88 lag bei 0,51. Daraus ergeben sich für die Neg.-Seren Werte zwischen 1 und 1,59, die der BNP⁺-Seren lagen zwischen 3,61 und 5,06, der Wert des gepoolten BNP⁺-Serums lag bei 5,63. Es war offensichtlich, dass mit dem CELISA ein deutlicher Unterschied zwischen der Reaktivität von BNP-Muttertierseren und der Kontrollgruppe detektiert werden konnte.

Dieser CELISA wurde mit den Seren durchgeführt, die den acht Tieren aus Dummerstorf vor und 14 Tage nach einer Auffrischungsimpfung mit dem PregSure[®] BVD entnommen worden waren. Die Proben der BNP-Muttertiere erreichten vor der Auffrischungsimpfung Werte zwischen 2,02 und 3,2, wohingegen die Werte der Muttertiere ohne BNP-Syndrom bei ihrem Nachwuchs deutlich niedriger bei Werten von 1,13 bis 1,78 lagen (Abb. 11A). Vierzehn Tage nach der Auffrischungsimpfung war bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg der Reaktivität feststellbar. Dabei stiegen die Werte der BNP⁺-Muttertiere im Mittel um einen Wert von 1,2, die der BNP⁻ Muttertiere um 0,76. In jeder Gruppe kam es nach der Auffrischungsimpfung zu einer Reaktivitätszunahme von etwa 55 % (Abb. 11A). Die Höhe der Werte schien mit dem Alter der Tiere korreliert zu sein. So waren die Muttertiere ohne BNP-Kalb ausnahmslos jünger (Geburtsjahrgang 2009-2007) als die BNP-Muttertiere (Geburtsjahrgang 2007-2006) (Abb. 11B).

5.5 Vergleich des PregSure[®] BVD mit anderen inaktivierten BVD-Impfstoffen

BNP-Kälber traten bis auf wenige Ausnahmen nur bei Muttertieren auf, die mit dem PregSure[®] BVD gegen BVDV immunisiert worden sind. Kein BNP-Fall ist bekannt, bei dem ein anderer BVD-Impfstoff zur Immunisierung der Muttertiere genutzt worden ist. Wie gezeigt wurde induziert der PregSure[®] BVD-Impfstoff MHC-I-Allo-AK im Impfling. Durch die vergleichende Analyse anderer BVD-Impfstoffe sollte überprüft werden, ob diese ebenfalls Allo-AK induzieren. Des Weiteren sollte durch den Vergleich der BVD-Impfstoffe mögliche Ursachen ermittelt werden, warum BNP nur in Assoziation mit dem PregSure[®] BVD-Impfstoff aufgetreten ist.

5.5.1 Induktion von Alloantikörper auch durch andere BVD-Impfstoffe?

Vorversuche hatten gezeigt, dass in den drei getesteten BVD-Impfstoffen (Bovidec[®], Bovilis[®] BVD/MD und PregSure[®] BVD) eine Vielzahl von zellulären Proteinen (CD46, Calcitriol und β -Aktin) vorhanden sind. Um der Frage nachzugehen, ob neben dem PregSure[®] BVD auch andere BVD-Impfstoffe in der Lage sind Allo-AK zu induzieren, wurde Serum von Tieren untersucht, die ausschließlich mit diesen Impfstoffen geimpft worden sind.

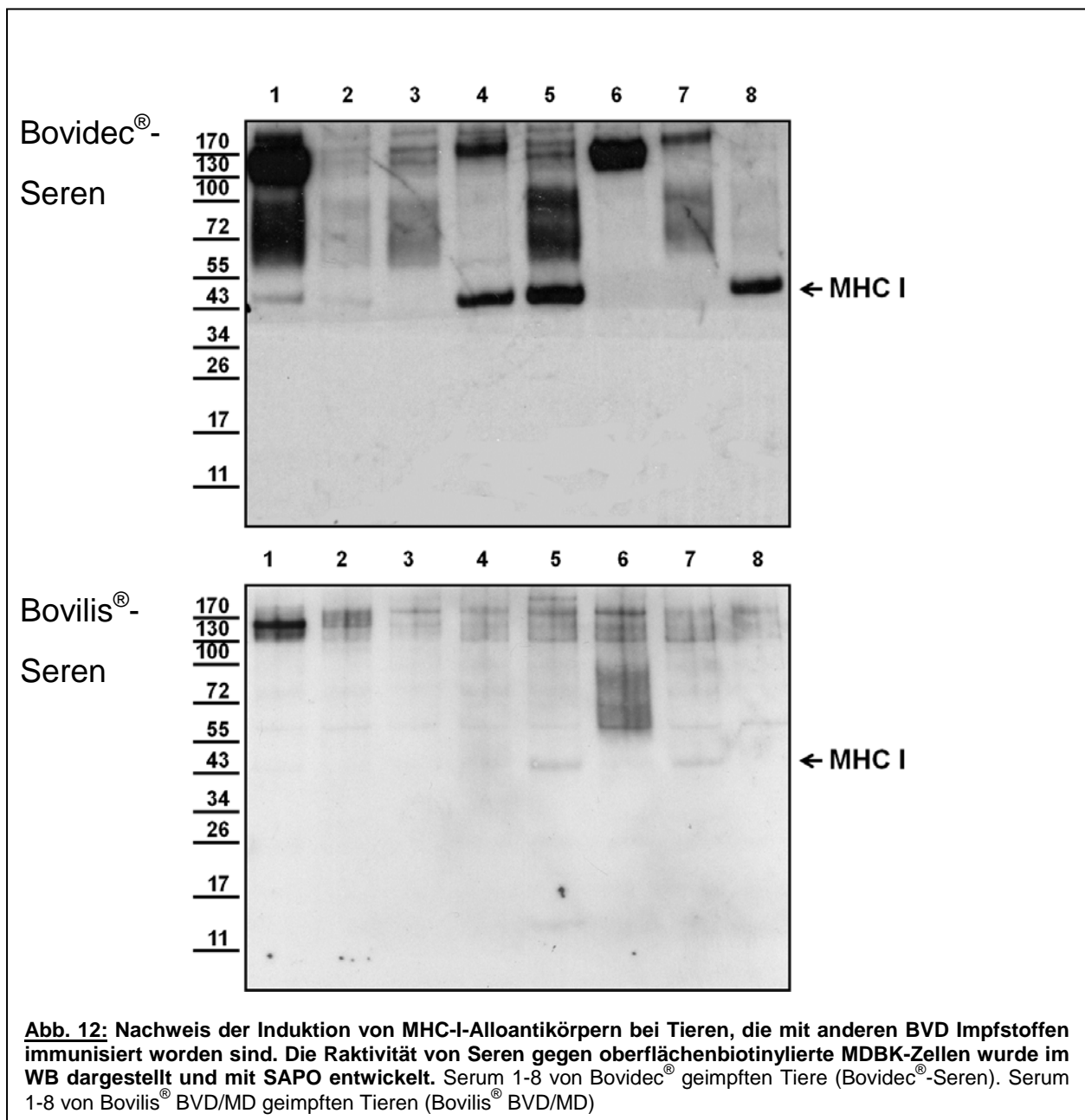


Abb. 12: Nachweis der Induktion von MHC-I-Alloantikörpern bei Tieren, die mit anderen BVD Impfstoffen immunisiert worden sind. Die Raktivität von Seren gegen oberflächenbiotinylierte MDBK-Zellen wurde im WB dargestellt und mit SAPO entwickelt. Serum 1-8 von Bovidec[®] geimpften Tiere (Bovidec[®]-Serum). Serum 1-8 von Bovilis[®] BVD/MD geimpften Tieren (Bovilis[®] BVD/MD)

Acht Seren von Tieren eines Betriebes, der zur Immunisierung gegen BVD ausschließlich Bovidec[®] verwendete (Bovidec[®]-Seren), wurden auf das Vorhandensein von Allo-AK getestet. Des Weiteren wurden acht Seren von Tieren eines Betriebes, der zur Immunisierung gegen BVD ausschließlich Bovilis[®] BVD/MD einsetzte (Bovilis[®]-Seren), getestet. Die Serumproben wurden dankenswerter Weise vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen zur Verfügung gestellt. Mit den Seren wurde eine Affinitätsreinigung von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen vorgenommen (vgl. Kap. 5.1.3). Die Bovidec[®]-Seren zeigten neben individuellen Banden in fünf Fällen eine Reaktivität gegen MHC I (Abb. 12A, Spur 1, 2, 4, 5 und 8). Die Signalintensität der MHC-I-Bande variierte von schwach angedeutet bei zwei Seren, über mittelstark bei zwei Seren bis hin zu stark bei einem Serum. Trotzdem war die Signalstärke nicht mit dem Signal, das bei den Affinitätsreinigungen mit BNP⁺-Serum zu sehen war zu vergleichen. Im Test der Bovilis[®]-Seren war eine schwache Reaktivität gegen MHC I in zwei Seren nachweisbar (Abb. 12B, Spur 5 und 7). In keinem der beiden Immunoblots ist die bei Affinitätsreinigungen mit BNP⁺-Serum beobachtete β_2 M-Bande erkennbar. Die Signalintensität der β_2 M-Bande ist generell schwächer als die MHC I Bande. Da die Signalintensität aber mit der MHC-I-Bande korreliert ist und diese hier auch nur eine relativ schwache Signalintensität aufweist, liegt die β_2 M-Menge in diesen Blots wahrscheinlich unterhalb der Sensitivitätsgrenze.

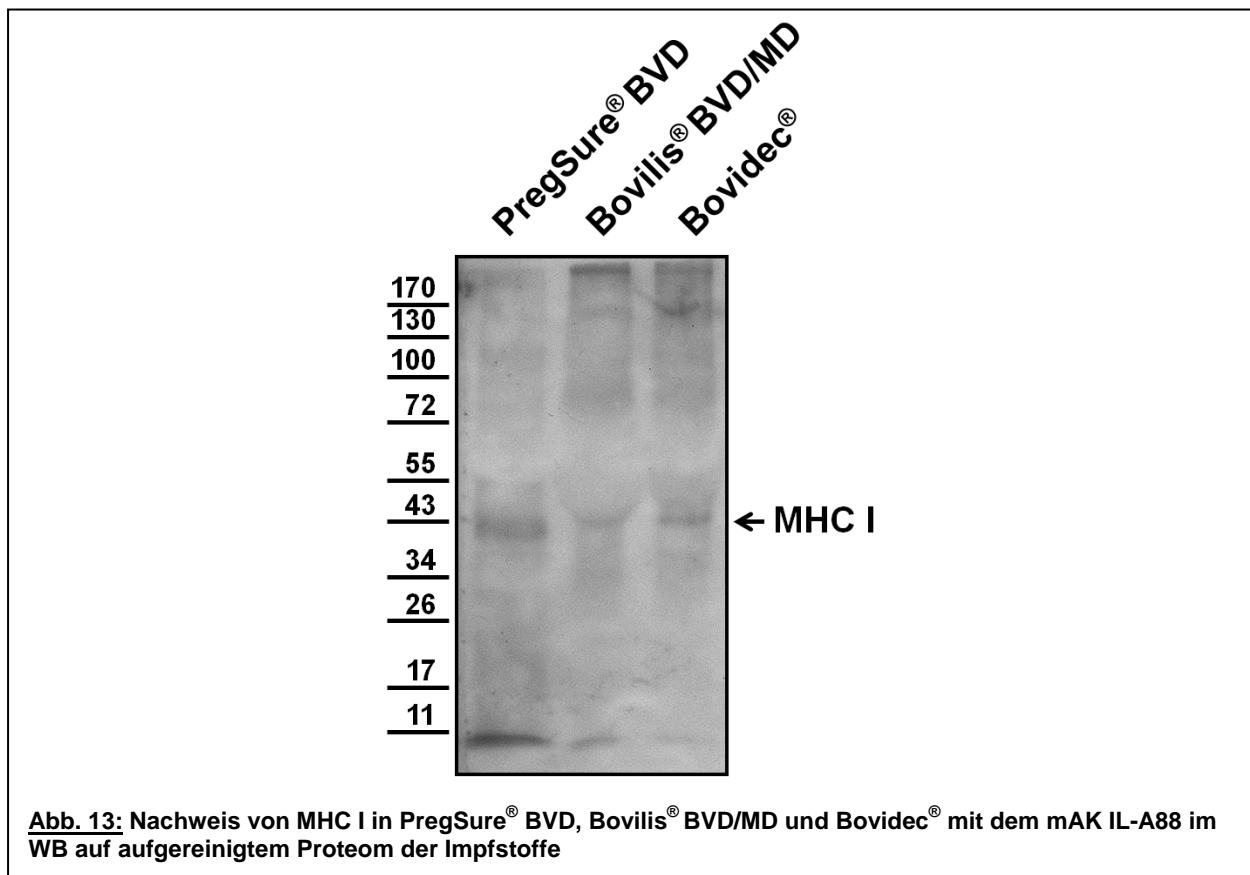
5.5.2 Quantifizierung von Alloantikörpern in Bovilis[®]- und Bovidec[®]-Seren

Die Alloreaktivität der Bovidec[®]- und Bovilis[®]-Seren wurde im CELISA quantifiziert (vgl. Kap. 5.5.1). Obwohl eine MHC-I-Alloreaktivität im WB nachgewiesen werden konnte, unterschieden sich die Bovidec[®]- und Bovilis[®]-Seren in ihrer Reaktivität gegen MDBK-Oberflächenproteine nicht von derjenigen von Neg.-Seren. Somit ist der MHC-I-Alloantikörpertiter von den Bovidec[®]- und Bovilis[®]-Seren wesentlich geringer als derjenige von BNP⁺-Seren.

5.5.3 Nachweis von MHC I in anderen BVD-Impfstoffen

Sollten die MHC-I-Allo-AK durch die Impfung mit dem jeweiligen BVD-Impfstoff (Bovilis[®] BVD/MD, Bovidec[®]) induziert werden, so müsste MHC-I-Antigen in diesen Impfstoffen nachweisbar sein. Deshalb wurde ein Immunoblot durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit wurde jeweils Protein aus 1 ml PregSure[®] BVD, Bovilis[®] BVD/MD und Bovidec[®] eingesetzt. Die

erzeugte MHC-I-Bande war in der Spur des PregSure® BVD-Impfstoffes am stärksten (Abb. 13). Doch auch in den anderen Impfstoffen war eine schwache MHC-I-Bande nachweisbar. Die schwächste Bande zeigte sich im Bovilis®-Proteom. Allerdings zeigt der IL-A88 bei Bovilis® BVD/MD und Bovidec® eine Affinität zu höhermolekularen Komplexen jenseits der 200 kDa. Diese Komplexe könnten durch die Inaktivierung und Denaturierung beim Produktionsprozess entstanden sein und MHC I enthalten oder sie stellen Artefakte dar.



5.5.4 Gesamtproteinkonzentrationen verschiedener BVD-Impfstoffe

Eine mögliche Ursache für die stärkere Allo-AK-Induktion könnte eine höhere Gesamtproteinkonzentration des PregSure® BVD-Impfstoff sein. Diese würde im Impfling unter Umständen zu einer besonders starken immunologischen Antwort führen. Die Immunantwort könnte sich nicht nur gegen die Impfantigene, sondern möglicher Weise auch gegen im Impfstoff enthaltene spezieseigene Proteine richten. Um dieser Theorie nachzugehen, wurde

die Gesamteprotein­konzentration der Impfstoffe Bovidec[®], Bovilis[®] BVD/MD und PregSure[®] BVD untersucht. Ein weiterer in Deutschland zugelassener BVD-Impfstoff (Mucobovin[®], Merial), war zum Zeitpunkt des Tests nicht im Handel erhältlich. Die Proteinkonzentrationen wurden mit BCA-Assay (Smith et al., 1985) sowie mit dem Ninhydrin-Nachweis der Aminosäuren nach saurer Hydrolyse der Proteine (Starcher, 2001) ermittelt. Mit den angewendeten Verfahren lagen die Proteinkonzentration bei allen Impfstoffen zwischen 0,4 und 0,9 mg/ml (Tabelle 2). Bei Bovidec[®] und Bovilis[®] BVD/MD wichen die ermittelten Werte der beiden Bestimmungsmethoden voneinander ab. Die angewendeten Assays sind relativ störungsanfällig. Außerdem wurde das Protein der Impfstoffe vor der Analyse mit Aceton gefällt. Das könnte die Abweichung der Werte erklären. Insofern sind die ermittelten Werte nur als Anhaltspunkte zu sehen.

	Bovidec [®]	Bovilis [®] BVD/MD	PregSure [®] BVD
Proteinkonzentration BCA Assay	714,9	395,6	676,8
Proteinkonzentration nach Starcher et. al.	878,9	563,5	682,9

Tabelle 2: Ermittelte Proteinkonzentration (µg/ml) verschiedener inaktivierter BVDV-Impfstoffe

6 Diskussion

6.1 Reaktivität von BNP⁺-Serum gegen MDBK-Zellen

Ausgangslage für diese Arbeit war die Hypothese, dass Allo-AK im Kolostrum PregSure[®] BVD geimpfter Muttertiere die BNP-Symptomatik auslösen (Bridger et al., 2011; Friedrich et al., 2009b). Um diese Hypothese zu bestätigen, sollten Antigene identifiziert werden, die für die Bildung der Allo-AK verantwortlich sind. Unsere Annahme war, dass die Allo-AK vor allem gegen Zellbestandteile gerichtet sein müssten, die vom Zellkultursystem stammen, auf dem das Impfvirus bzw. Antigen des PregSure[®] BVD produziert wurde. Herstellerangaben verrieten, dass bovine Nierenzellen als Kultursystem verwendet worden sind. Es lag nahe, dass diese Zellen mit den üblichen MDBK-Zellen Ähnlichkeit haben. Durch spätere Arbeiten konnte die Bindung von BNP-Allo-AK an die Produktionszelllinie des PregSure[®] BVD nachgewiesen werden (Bastian et al., 2011). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit durch einen indirekten Immunperoxidase-Test gezeigt werden, dass Allo-AK aus BNP⁺-Serum spezifisch eine Reaktivität gegen Oberflächenantigene von MDBK-Zellen aufweisen. Schlüsselexperiment für die Identifizierung der Allo-AK-induzierenden Antigene war die Oberflächenbiotinylierung von MDBK-Zellen gefolgt von einer Immunpräzipitation mit Rinderseren. Die Biotinylierung wurde durchgeführt, um selektiv membranständige Proteine zu detektieren und ein sensibles Nachweisverfahren zu schaffen. Zunächst wurde die Immunpräzipitation mit der gesamten aufgereinigten IgG-Fraktion aus Rinderserum durchgeführt. Der Nachteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass Allo-AK nur einen geringen Teil der Gesamt-IgG-Fraktion ausmachen, denn die meisten an NHS-Beads immobilisierten Antikörper sind keine Allo-AK. Um die Effizienz zu steigern, wurde die Methode optimiert (Heinold et al., 2010). Für diese Methode wurden zunächst oberflächenbiotinylierte MDBK-Zellen mit Rinderserum inkubiert. Vorhandene Allo-AK binden an die entsprechenden Antigene, IgG ohne Alloreaktivität bindet nicht und kann über Waschschriffe aus der Reaktion entfernt werden. Die MDBK-Zellen wurden lysiert und die Antigen-Antikörper-Komplexe an Protein G immobilisiert. Auf diese Weise war sichergestellt, dass nur alloreaktive AK in Assoziation mit dem entsprechenden Antigen immobilisiert wurden. Alle BNP⁺-Seren zeigten eine spezifische Reaktivität gegen zwei Antigene (12 und 44 kDa) aus den MDBK-Oberflächenproteinen. Die Signalintensität der beiden Banden zeigte beim einzelnen Tier eine Korrelation. Individuell zeigten BNP⁺-Seren eine Alloreaktivität gegen andere Oberflächenantigene von MDBK-Zellen. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass diese Alloreaktivitäten in die BNP-Pathogenese involviert sind. Die Oberflächenbiotinylierung von Zellen mit anschließender Immunpräzipitation stellte sich als

essentiell für den Nachweis der Alloreaktivität heraus. Die 12 und 44 kDa Proteine konnten im WB mit der Streptavidin-Peroxidase-Reaktion nach Immunpräzipitation mit BNP⁺-Serum stets dargestellt werden. Streptavidin bindet dabei an das Biotin, mit dem zuvor die Oberflächenproteine der MDBK-Zellen markiert worden sind. Wurde das gleiche Material im WB mit BNP⁺-Serum als Primär- und Peroxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Rind-IgG als Sekundärantikörper verwendet, so waren die 12 und die 44 kDa Bande nicht darstellbar. Diese Beobachtung ist eine Evidenz dafür, dass die Allo-AK an konformationelle Epitope binden, die durch die denaturierende Probenaufbereitung für die WB-Analyse verloren gehen.

6.1.1 Identifizierung der 44 und 12 kDa Proteine als MHC I und β 2M

Auf MDBK-Zellen zeigen Seren von PregSure[®] BVD geimpften Tieren eine Reaktivität mit zwei Zielantigenen mit einer Masse von 12 und 44 kDa. Um die Identität dieser beiden Proteine herauszufinden, wurde die massenspektrometrische Methode des Peptidmassen-Fingerabdrucks (PMF) gewählt. Bei dieser Methode macht man sich die Spezifität einer Endoprotease - üblicher Weise Trypsin - zu Nutze. Bei dem Verdau eines Proteins entstehen so stets die gleichen Peptide, die spezifisch für das verdaute Protein sind. Die Massen dieser Peptide werden im Massenspektrometer bestimmt. Die ermittelten Massen werden dann mit einer Datenbank verglichen, in der die theoretischen Peptidmassen aller bekannten Proteine nach einem Verdau mit Trypsin hinterlegt sind. Durch den Verdau von unterschiedlichen Proteinen mit Trypsin können Peptide gleicher Masse entstehen. Daher werden für eine eindeutige Identifizierung immer mehrere Peptide eines Proteins benötigt. Die Signifikanz einer Identifizierung wird bei der verwendeten Mascot-Datenbank durch den so genannten „MOWSE-Score“ ausgedrückt (vgl. 4.2.6.2). Der Erfolg einer Identifizierung ist von der Quantität und der Reinheit eines Proteins abhängig. Für die Analyse wurde eine Immunpräzipitation von MDBK-Zellen mit einem BNP⁺-Serum mit starker Reaktivität gegen das 12 und 44 kDa Protein durchgeführt. 3×10^7 biotinylierte MDBK-Zellen wurden mit 3 ml Serum affinitätsgereinigt und die Probe über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Aus dem Coomassie-Brilliantblau gefärbten Gel wurden die 12 und 44 kDa Bande ausgeschnitten und das Gelstück mit Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptidmassen wurden dann mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight (MALDI-ToF) ermittelt. Es konnten 16 Peptide aus der 44 kDa Bande detektiert werden, die mit einer Sequenzabdeckung von 49,2 % zum MHC I, beim Rind auch als „bovine leukocyte antigen I“ (BoLA I) bezeichnet, passten. Die große Anzahl von Peptiden und die hohe Sequenzabdeckung lassen keinen Zweifel, dass es sich bei dem Protein um MHC I handelt. Der

MHC I ist ein hochpolymorphes Protein, von dem beim Rind eine Vielzahl an Varianten vorkommt. Es wurden über den MOWSE-Score zwei Varianten des MHC I ermittelt, zu denen die detektierten Peptide mit der höchsten Signifikanz passen (EMBL:AAZ73457 und AAZ73463). Da aber mit PMF keine 100 % Sequenzabdeckung erreicht wird, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Allo-AK tatsächlich eine Reaktivität mit diesen beiden Varianten zeigen. Darüber hinaus kann mit PMF ebenso wenig die Anzahl an MHC-I-Varianten, gegen die Allo-AK eine Reaktivität zeigen, ermittelt werden. Bei der PMF-Analyse der 12 kDa Bande wurden zwei Peptide detektiert, die mit einer Sequenzabdeckung von 15,3 % zum bovinen β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) (EMBL:AAI18353) passen. Bei β_2 M handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein, das stets mit dem MHC I nicht kovalent assoziiert ist. Beim Rind ist nur eine Variante von β_2 M bekannt (Groves et al., 1982). Dies schließt aus, dass Allo-AK von BNP-Muttertieren eine Reaktivität gegen dieses Protein aufweisen. Es ist davon auszugehen, dass β_2 M in der Immunpräzipitation mit dem MHC I, gegen den sich die Allo-AK richten, kopräzipitiert wird. Durch die Probenaufbereitung dissoziieren MHC I und β_2 M voneinander, weshalb β_2 M im WB als eigenständige Bande bei 12 kDa erscheint. Zur Verifizierung der Ergebnisse der PMF-Analyse wurden serologische Methoden angewendet. MDBK-Zelllysate wurde mit BNP-Muttertierserum affinitätsgereinigt und im WB eingesetzt. Mit dem murinen mAK IL-A88 anti MHC I (Toye et al., 1990) wurde der MHC I nachgewiesen. β_2 M wurde mit dem polyklonalen Kaninchenserum anti-humanem β_2 M (GTX101314, Fa. GeneTex), das zuvor auf seine Kreuzreaktivität mit rekombinant erzeugtem bovinem β_2 M getestet wurde, nachgewiesen. Andere Studien konnten später die Reaktivität der Allo-AK gegen MHC I bestätigen (Foucras et al., 2011). Darüber hinaus gelang in diesen Studien der Nachweis, dass die Reaktivität von BNP⁺-Seren gegen Zellen, bei denen die MHC-I-Expression über die Downregulation von β_2 M gehemmt wird, in gleicher Weise nachlässt wie die eines mAK gegen MHC I.

6.1.2 Reaktivität von Allo-AK gegen MHC I von Rinder-PBMCs

Bridger et al. hatten gezeigt, dass die Allo-AK im Serum von BNP Muttertieren sehr effizient an die Leukozyten- und Monozyten- und etwas weniger effizient an die Granulozytensubpopulation von Kälbern binden (Bridger et al., 2011). Diese Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Bastian et al., 2011; Pardon et al., 2011). Die Beobachtung stimmt mit dem klinischen Bild der BNP überein, bei dem es zu einer Lymphopenie, Neutropenie und Monozytopenie kommt (Friedrich et al., 2009c). Auf MDBK-Zellen haben Allo-AK aus BNP-Muttertierseren eine Reaktivität gegen MHC I gezeigt. Sollte MHC I in die Ätiologie der BNP

involviert sein, so sollte dieser mit Allo-AK aus BNP⁺-Serum auch von PBMCs präzipitierbar sein. Um dieses zu testen, wurden biotinylierte PBMCs eines BNP⁺-Tieres ohne MHC I Reaktivität und eines Kalbes untersucht. Die PBMCs des Kalbes wurden zuvor auf die Bindungsfähigkeit von Allo-AK getestet (Bridger et al., 2011). Von den PBMCs der Spendertiere wurde MHC I (und β_2M) präzipitiert. In der Kombination von PBMCs des BNP-Muttertieres mit seinem eigenen Serum konnte keine Reaktivität gegen MHC I dargestellt werden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um Allo-AK und nicht um autoreaktive AK handelt. Ein BNP-Standardserum (aus acht BNP⁺-Serum) zeigte allerdings eine Reaktivität gegen PBMC-Proben bei drei von vier anderen getesteten BNP-Muttertieren. Durch das individuelle BNP⁺-Serum wird zwar nicht MHC I auf den eigenen PBMCs erkannt, aber eine Reaktivität gegen MHC I von PBMCs anderer BNP-Muttertiere konnte nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Allo-AK-Spezifitäten gegen unterschiedliche MHC-I-Varianten in unterschiedlichen Tieren aufweisen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch mit BNP-Standardserum MHC I nicht von PBMCs aller Tiere präzipitierbar ist. Gegen MHC-I-Varianten von zwei PBMC-Spendertieren lagen keine Allo-AK-Spezifitäten im BNP-Standardserum vor.

6.1.3 MHC I ist eine Kontaminante des PregSure[®] BVD-Impfstoff

Ein Zusammenhang zwischen BNP und der Vakzinierung mit PregSure[®] BVD wurde vermutet, da BNP-Kälber - bis auf wenige Ausnahmen - nur bei Muttertieren aufgetreten sind, die mit diesem Impfstoff gegen BVD immunisiert worden waren (Bridger et al., 2011). Jüngste epidemiologische Studien konnten den Zusammenhang bestätigen (Sauter-Louis et al., 2012). Im Gegensatz zu Lebendimpfstoffen mit attenuierten Erregerstämmen gelten inaktivierte Vakzine wie PregSure[®] BVD in der Regel als sicherer, aber weniger effektiv. Abgesehen von der Induktion von blutgruppenspezifischen Allo-AK (Osterhoff et al., 1977; Stormont, 1975) sind bei geimpften Tieren Alloimmunisierungen nicht im größeren Maßstab aufgetreten. Beim Menschen sind impfungsassoziierte autoimmune Reaktionen beschrieben und werden auch bei Tieren diskutiert (Salemi et al., 2010). Ein Zusammenhang zwischen der PregSure[®] BVD-Vakzine und den nachgewiesenen Allo-AK gegen MHC I in PregSure[®] BVD geimpften Rindern setzt die Anwesenheit dieses Antigens im Impfstoff voraus. Tatsächlich ist MHC I im Proteom dieses Impfstoffes in WB-Analysen mit dem MHC-I-spezifischen mAK IL-A88 nachweisbar. In der PMF-Analyse konnten ebenfalls MHC-I-Peptide detektiert werden. Durch eine andere Arbeit

wurde zu einem späteren Zeitpunkt die Konzentration von MHC I im Impfstoff mit 0,5-1 ng/ml quantifiziert (Foucras et al., 2011).

Auch in anderen BVD-Impfstoffen (Bovilis[®] BVD/MD und Bovidec[®]), konnte MHC I in einer geringeren Menge als im PregSure[®] BVD nachgewiesen werden. Seren von Tieren, die ausschließlich mit Bovilis[®] BVD/MD oder Bovidec[®] gegen BVD immunisiert worden sind, weisen zum Teil auch Allo-AK gegen MHC I auf, wenn auch in einer wesentlich geringeren Konzentration als PregSure[®] BVD immunisierte Tiere. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, warum BNP nur im Zusammenhang mit der Vakzinierung mit PregSure[®] BVD auftritt und nicht bei Nachkommen von Tieren, die mit einem der anderen getesteten BVD-Impfstoffe geimpft worden sind. Alle getesteten Impfstoffe weisen eine ähnliche Proteinkonzentration auf, so dass nicht von einem Einfluss der Proteinkonzentration auf die Allo-AK Induktion ausgegangen werden kann. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, muss die Rolle des im PregSure[®] BVD eingesetzten Adjuvans bewertet werden. PregSure[®] BVD führte zu einer robusten Immunität gegen BVD, was sich in hohen kreuzneutralisierenden Antikörpertitern im Impfling widerspiegelt (Bastian et al., 2011; König et al., 2006; Salt et al., 2004). Diese neutralisierenden Antikörpertiter übersteigen durch andere BVD-Impfstoffe induzierte Titer und sogar Titer nach natürlichen Infektionen bei weitem (Bastian et al., 2011). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass das Adjuvans nicht nur eine derartig starke Immunantwort gegen virale, sondern auch gegen zelluläre Antigene stimuliert. Quil A ist allerdings kein Alleinstellungsmerkmal des PregSure[®] BVD. Auch der Bovidec[®] Impfstoff greift auf dieses Adjuvans sogar in einer höheren Konzentration zurück. Der Unterschied des PregSure[®] BVD im Vergleich zum Bovidec[®] Impfstoff liegt einerseits in der Formulierung mit Cholesterin und Amphigen[®], andererseits in der Behandlung durch Mikrofluidisierung. Diese führt nach technischer Prozessierung zur Bildung von Quil-A-Cholesterin-Antigen-Nanokomplexen (Pfizer, 2004), was möglicherweise nicht nur die Immunogenität von Virusantigenen, sondern auch von zellulären Kontaminanten steigert.

Für die Produktion inaktivierter Vakzine bedeuten diese Ergebnisse generell, dass es ein potentiell Risiko birgt, Impfstoffe auf einer Zelllinie homolog zu der Tierart zu produzieren, in der der Impfstoff angewendet werden soll.

6.2 Passt MHC I zur Pathogenese der BNP?

6.2.1 MHC I

MHC I ist ein Transmembran-Glykoprotein, das kontinuierlich auf Zellen exprimiert wird. Der MHC I dient der Präsentation endogener Peptide von acht bis zehn Aminosäuren Länge an CD8⁺ Zellen sowie der Interaktion mit Rezeptoren natürlicher Killerzellen, was zu deren Aktivierung bzw. Inaktivierung führt. MHC I ist ein Heterodimer aus der IgG-Superfamilie, bestehend aus der schweren Alpha-Kette, die einen zytosolischen Anteil, einen Transmembrananteil und drei extrazelluläre Domänen (α 1-3) aufweist und einer leichten, nicht kovalent gebundenen Kette, dem β ₂M (Bjorkman et al., 1987; Flutter et al., 2004). Die α 3 Domäne und β ₂M sind homolog zum konstanten Fragment von Antikörpern aufgebaut, α 1- und α 2- Domäne bilden die Peptidbindungstasche.

Beim Rind liegen die Genorte für MHC I auf einer Region des Chromosoms 23 (Fries et al., 1986). Alle auf einem Chromosom vorkommenden MHC-I-Gene werden zu einem Haplotyp zusammengefasst, die Haplotypen der beiden Chromosomen bilden den Genotyp. Bisher ist umstritten, wie viele Genorte das Rind für den MHC I besitzt. Evidenzen sprechen für 6 Genloci pro Haplotyp, von denen 1-3 Gene pro Haplotyp exprimiert werden, was in einem Maximum von 6 exprimierten MHC-I-Varianten pro Individuum resultiert (Ellis et al., 1999; Ellis et al., 2005; Holmes et al., 2003). Etwa 80 Allele, also Varianten des MHC I sind beim Rind bekannt und in der IPD Database zusammengefasst (Robinson et al., 2010). Die hohe Anzahl an Varianten ist eine mögliche Erklärung für die niedrige Prävalenz der BNP. Nach dieser Theorie würde BNP-Allo-AK nur eine Spezifität gegen ein oder wenige MHC-I-Varianten aufweisen. BNP tritt dann nur in einer bestimmten Konstellation an MHC-I-Haplotypen von Muttertier und Kalb auf. Auch wenn die Dunkelziffer in Europa aufgetretener Fälle höher sein mag, als die ca. 5000 gemeldeten Fälle, so ist diese Zahl immer noch äußerst gering verglichen mit 14 Millionen verkauften Impfdosen des PregSure[®] BVD-Impfstoffs in Europa (Bastian et al., 2011).

Es ist postuliert worden, dass MHC I auf jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert wird. Studien an humanen Geweben konnten jedoch nicht in allen Geweben MHC I nachweisen. Mit Immunfluoreszenstechniken am Gewebsschnitt war MHC I nur auf lymphoiden Zellen, einigen Epithelzellen und Endothelzellen nachweisbar (Fleming et al., 1981). Neuere Studien an Rattengewebe konnten diese Erkenntnisse bestätigen und präzisieren (Metzger et al., 2000). Darüber hinaus variieren unterschiedliche Gewebsarten deutlich in der Zahl exprimierter MHC-I-Moleküle. Knochenmarkszellen zeigen eine starke Expression von MHC I, wobei diese auf die

Zellen der lymphoiden und myeloiden Reihe beschränkt ist, Erythrozytenvorläuferzellen weisen nur eine geringe MHC-I-Expression auf (Brown et al., 1979). Eine starke Bindung von BNP-Alloantikörpern bei BNP-Kälbern konnte an Knochenmarksausstrichen nachgewiesen werden (Pardon et al., 2011). Im peripheren Blut wird MHC I stark auf Lymphozyten und Thrombozyten exprimiert, weniger stark auf polymorphkernigen Zellen. Auf Erythrozyten ist kein MHC I nachweisbar (Brown et al., 1979). Diese Verteilung entspricht der Bindungseffektivität der BNP-Alloantikörper an verschiedene Blutzellfraktionen (Bridger et al., 2011; Foucras et al., 2011). Da Erythrozyten keinen MHC I exprimieren, werden diese Zellen nicht durch Antikörperbindung geschädigt. Die im Verlauf der BNP beobachteten normozytäre, normochrome Anämie tritt sekundär auf Grund des massiven Blutverlust auf (Bell et al., 2009a; Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c). Humane Thrombozyten weisen etwa $0,81 \pm 0,2 \times 10^5$ MHC-I-Moleküle auf (Kao et al., 1986). Auf bovinen Lymphozyten konnte eine MHC-I-Menge von 3×10^5 Molekülen pro Zelle festgestellt werden (Smith et al., 1999). Diese Verteilungs- und Expressionsmuster von MHC I spiegeln zwar die bei BNP betroffenen Zellpopulationen in Knochenmark und Blut wieder. Fraglich bleibt aber, warum keine Veränderungen an anderen MHC-I-exprimierenden Zellen, wie zum Beispiel den Endothelien, zu finden sind. In diesem Punkt besteht weiterer Forschungsbedarf, um die gewebspezifische MHC-I-Expression beim Rind zu charakterisieren. Möglich wäre eine Heterogenität der MHC-I-Expression in unterschiedlichen Zellen, wie sie kürzlich für bestimmte Primaten nachgewiesen werden konnte. Die Expression unterschiedlicher MHC-I-Varianten weicht bei diesen Primaten in unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen stark voneinander ab (Greene et al., 2011).

MHC I ist beim Menschen für eine Alloimmunisierung nach Schwangerschaft, Transfusion von Vollblut oder Organtransplantation bekannt (Clatworthy et al., 2010). Speziell ein durch Alloimmunisierung induziertes Syndrom, die Fetale/Neonatale Alloimmune Thrombozytopenie (Kaplan, 2006), ein Krankheitsbild bei humanen Neugeborenen, weist große Ähnlichkeit mit BNP auf. Diese Krankheit wird ausgelöst durch diaplazentar übertragene, maternale Allo-AK gegen paternale Antigene auf hämatopoetischen Zellen. Die Allo-AK richten sich in den meisten Fällen gegen das humane Plättchenantigen (HPA). Es sind aber auch Fälle beschrieben, bei denen Allo-AK gegen das humane Leukozytenantigen, den MHC I des Menschen, nachgewiesen werden konnten (De Tar et al., 2002; Grainger et al., 2002; Gramatges et al., 2009; Moncharmont et al., 2004; Starcevic et al., 2010; Thude et al., 2006). Bezüglich des Aufbaus der Plazenta besteht ein Unterschied zwischen Mensch und Wiederkäuer. Die humane *Placenta haemochorialis* kann von Antikörpern frei passiert werden. Die *Placenta*

epitheliochorialis der Rinder ist für Antikörper impermeabel (Kruse, 1983). Bei Wiederkäuern ist Kolostrum daher essentiell für die Versorgung des Neugeborenen mit AK. Bis dessen eigenes Immunsystem ausgereift ist, wird es passiv von maternalen Antikörpern (einem Auszug der Serum IgG-Fraktion) geschützt, die mit dem Kolostrum übertragen werden. Das Kolostrum ist reich an IgG. Die Konzentrationen liegen rasseabhängig zwischen 32-212 mg/ml (IgG₁: 20-200 mg/ml) (Gapper et al., 2007). Diese Antikörper können die Darmschranke innerhalb der ersten 36 Lebensstunden passieren und gelangen so ins Blut des Kalbes. 48 Stunden nach der Geburt können daher im Serum von Kälbern hohe IgG Konzentrationen nachgewiesen werden. Damit kommt es durch die unterschiedlichen Plazentationstypen zur AK-Übertragung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Das könnte erklären, warum BNP meist in der zweiten bis dritten Lebenswoche auftritt, FAIT/NAIT hingegen schon *in utero* oder unmittelbar nach Geburt besteht. Die Übertragung von Allo-AK mit dem Kolostrum vom Muttertier auf das Kalb ist Schlüsselereignis in der BNP-Induktion. Das konnte durch Kolostrumfütterungsversuche gezeigt (Friedrich et al., 2011; Schröter et al., 2011) und *in vitro* bestätigt werden (Bridger et al., 2011). In dieser Arbeit konnte durch Immunpräzipitation von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen mit kolostralen Antikörpern bewiesen werden, dass MHC-I-Allo-AK im Kolostrum von PregSure[®] BVD immunisierten Tieren vorhanden sind.

6.2.2 Einfluss des Allo-AK-Titers auf die BNP-Manifestation

Die Diversität und zellspezifische Verteilung machen MHC I zu einem plausiblen Kandidatenantigen von Allo-AK bei der Ätiologie der BNP. In diesem Zusammenhang erscheint es allerdings widersprüchlich, dass neben BNP-Muttertieren, PregSure[®] BVD geimpfte Tiere vorkommen, die zwar Allo-AK gegen MHC I besitzen, bei deren Nachkommen aber keine BNP auftritt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die Kälber dieser Tiere nicht empfänglich sind, da sie keine Allo-AK bindenden MHC-I-Varianten haben. Demnach würden zwar MHC-I-Allo-AK vom Muttertier auf das Kalb übertragen, da aber im Kalb Zielantigene fehlen, käme es nicht zur Bindung an die Zellen und damit nicht zur BNP. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, in denen eine Heterogenität der Affinität eines BNP-Muttertierserums mit Leukozyten von unterschiedlichen Kälbern beschrieben wird (Bastian et al., 2011). Diese Theorie würde auch erklären, warum nicht jedes Kalb eines BNP-Muttertieres an BNP erkrankt. Die große Zahl an MHC-I-Allo-AK positiven PregSure[®] BVD geimpften Muttertieren wirft allerdings die Frage auf, ob diese Erklärung alleine ausreichend ist. Auch ist das klinische Bild von BNP sehr heterogen, von subklinischen Fällen bis hin zur perakuten Ausprägung des

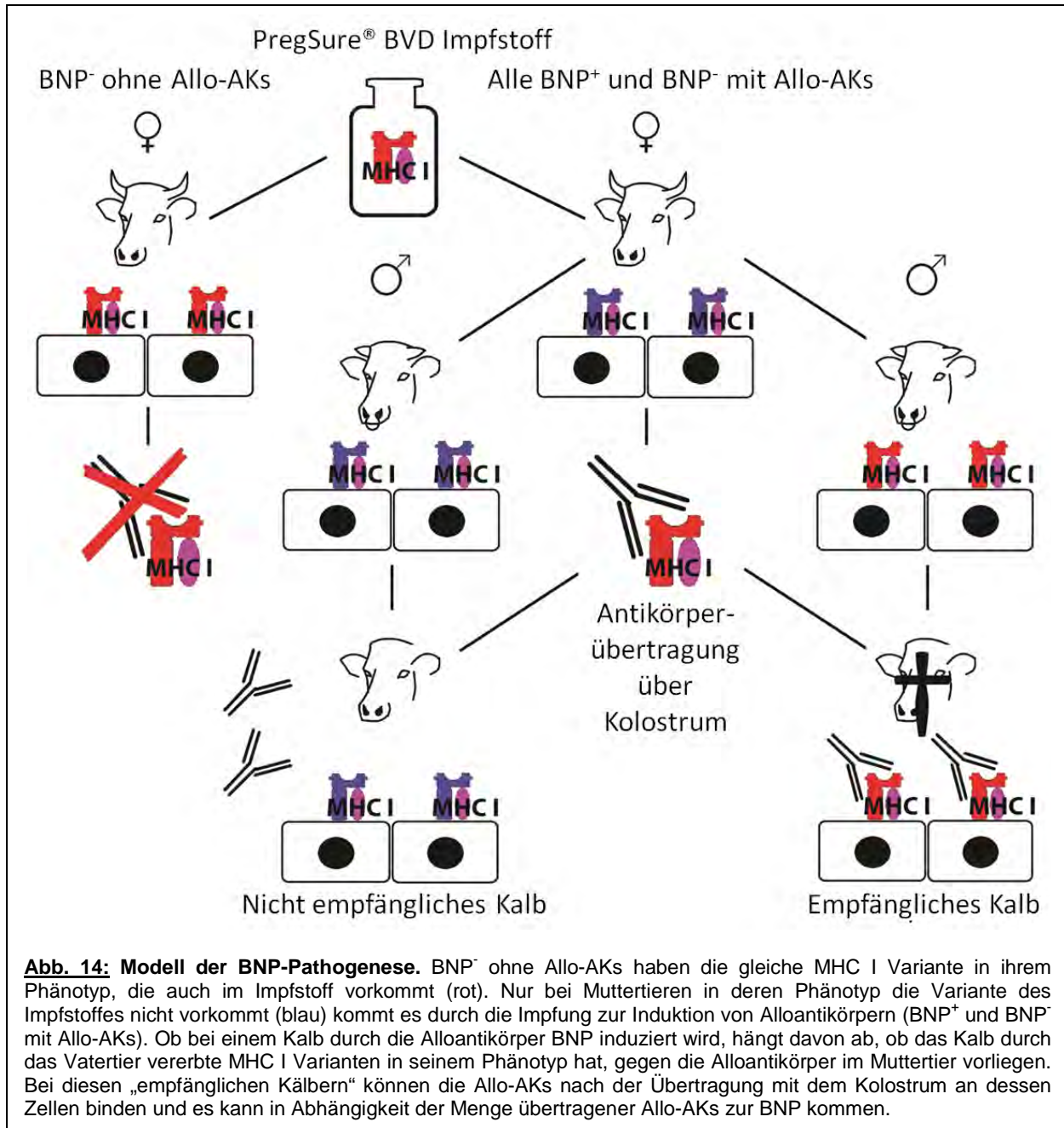
Syndroms. Ein quantitativer Effekt von Allo-AK wäre dafür eine mögliche Erklärung. Untersuchungen konnten zeigen, dass der Prozentsatz von Leukozyten, die Allo-AK gebunden haben, mit der klinische Ausprägung von BNP korreliert ist (Bridger et al., 2011). Vermutlich, stammen Kälber mit den klassischen BNP-Symptomen von Muttertieren mit hohen Allo-AK-Titern. Subklinische Fälle treten demnach beim Nachwuchs von Muttertieren auf, die einen geringeren Alloantikörpertiter aufweisen. Bei einer dritten Gruppe von Muttertieren sind Alloantikörpertiter so niedrig, dass im Kalb keine nachweisbaren Veränderungen auftreten. Vermutlich liegen derart niedrige MHC-I-Allo-AK-Titer bei den Tieren vor, die mit anderen BVD-Impfstoffen immunisiert worden sind. Bei den Nachkommen dieser Tiere konnten keine Veränderungen, die auf BNP hinweisen, beobachtet werden. Um einen quantitativen Effekt nachzuweisen wurde ein Zell-basierter ELISA (CELISA) entwickelt, mit dem die Alloreaktivität von Seren gegen MDBK-Zellen quantifiziert werden konnte. Dazu wurden Paraformaldehyd fixierte MDBK-Zellen auf Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen von Rinderseren inkubiert. Allo-AK binden an die Zellen und können indirekt über einen Peroxidase-gekoppelten Ziegenanti-Rind-IgG und der Reaktion der Peroxidase mit TMB quantifiziert werden. Für diesen Versuch wurde Serum von genetisch eng miteinander verwandten Muttertieren, die alle mit PregSure® BVD geimpft waren, verwendet. Diese Tiere stammten aus Embryotransfer; Mutter und Vater waren bei allen Tieren identisch. Vier dieser Tiere hatten Kälber bei denen das BNP-Syndrom aufgetreten ist, die anderen vier Tiere nicht. Alle Tiere zeigten eine Reaktivität mit MHC I von MDBK-Zellen. Die Quantifizierung der Allo-AK ergab, dass die Titer alloreaktiver Antikörper bei den vier BNP-Muttertieren wesentlich höher waren als die ihrer Schwestern, bei deren Kälbern BNP nicht aufgetreten ist. Nicht ermittelt werden konnte dabei, wodurch es zu diesen Unterschieden der Titer kommt. Bei den acht getesteten Tieren schien eine Altersabhängigkeit der Titer nachweisbar zu sein. Danach waren die BNP-Muttertiere mit den höheren Allo-AK-Titern älter als ihre Schwestern, bei deren Nachkommen kein BNP-Syndrom auftrat. Man könnte nun davon ausgehen, dass die Allo-AK-Titer nur von der Anzahl der Auffrischungsimpfungen mit der PregSure® BVD-Vakzine abhängen. Dafür spräche auch, dass erste Fälle von BNP jeweils erst drei Jahre nach der Markteinführung des Impfstoffes beobachtet worden sind. Dieser wurde in Europa 2004 auf den Markt gebracht und (2006)-2007 traten die ersten Fälle auf. Dieses stellt eine Parallele zu Neuseeland dar, wo der Impfstoff 2008 auf dem Markt eingeführt wurde und 2011 die ersten Fälle auftraten. Dem widerspricht allerdings die Beobachtung, dass auch ein Großteil von Erstkalbinnen, die dementsprechend nur eine Grundimmunisierung oder eine geringe Anzahl an Auffrischungsimpfungen erhalten haben, BNP-Kälber hervorbringt (Pardon et al., 2009a). Spekuliert werden kann auch über

einen möglichen additiven Effekt von Alloantikörperspezifitäten. Im CELISA konnte gezeigt werden, dass gepooltes Serum eine höhere Alloreaktivität aufweist als die Einzeltierseren aus denen es besteht. Darüber hinaus konnte in Kolostrumfütterungsversuchen gezeigt werden, dass Mischkolostrum potenter in der Induktion des BNP-Syndroms ist als das Kolostrum von Einzeltieren (Schröter et al., 2011). Scheinbar weisen Allo-AK unterschiedlicher BNP-Muttertiere Spezifitäten gegen unterschiedliche Epitope auf dem MHC I oder gegen verschiedene Varianten von MHC I auf. Der Alloantikörpertiter eines Einzeltieres könnte damit von der Anzahl erkannter Epitope abhängig sein. Deren Anzahl ist wiederum abhängig von der Genetik des Muttertieres, da nur Antikörper gegen solche Epitope gebildet werden können, die auf den eigenen, exprimierten MHC-I-Varianten nicht vorkommen. Andernfalls würden diese Epitope als „Selbst“ identifiziert und auf Grund der Selbsttoleranz des Immunsystems keine Antikörper induziert. Da die Quantität aufgenommener Antikörper eine Rolle spielt, ist ein weiterer Faktor, der die BNP-Ausprägung beeinflusst, die Menge des aufgenommenen Kolostrums und damit indirekt die Menge an aufgenommenen Allo-AK. Studien haben gezeigt, dass die Kolostrumaufnahme in den ersten 36 Lebensstunden von Kalb zu Kalb große Unterschiede aufweist (Vasseur et al., 2009).

6.2.3 MHC-I-Allo-AK basiertes Modell der BNP-Pathogenese

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurde ein Modell der BNP-Pathogenese entworfen. Dem lag die Überlegung zu Grunde, dass der PregSure[®] BVD MHC-I-Antigen enthält. Dabei sind weder Anzahl noch Identität der Varianten von MHC I bekannt. Im Modell wird der Einfachheit halber von einem Epitop auf einer MHC-I-Variante ausgegangen, obwohl Evidenzen vorliegen, dass mehrere Epitope einer oder mehrerer MHC-I-Varianten betroffen sind. Wird nun ein Tier mit dieser Vakzine geimpft, so ist die Allo-AK Induktion im individuellen Impfling abhängig von dessen MHC-I-Phänotyp und damit indirekt vom Genotyp. Kommt die MHC-I-Variante des Impfstoffs (Abb. 14, rot) im Phänotyp des Impflings vor, kommt es auf Grund der Selbsttoleranz nicht zu einer Allo-AK-Induktion und folglich tritt bei Nachkommen dieses Tieres BNP nicht auf (Abb. 14, links). Dieser Teil des Modells betrifft den Anteil der BNP⁻-Tiere, in deren Serum keine Reaktivität gegen den MHC I von MDBK-Zellen nachgewiesen wurde. Kommt die entsprechende MHC-I-Variante des Impfstoffs nicht im Phänotyp des Muttertieres vor, wird diese Variante als fremd erkannt und Allo-AK dagegen induziert (Abb. 14, rechts, blau). Dieser Teil des Modells betrifft alle PregSure[®] BVD geimpften Tiere, bei denen MHC-I-Allo-AK nachgewiesen werden konnten (BNP⁺-Tiere und ein Teil der

BNP⁻-Tiere). Die Entwicklung von BNP-Symptomen beim Kalb ist davon abhängig, ob es Träger der entsprechenden MHC-I-Variante ist. Das Gen für die entsprechende MHC I Variante, das ein Kalb empfänglich für BNP macht, muss väterlichen Ursprungs sein. Wäre das Muttertier Anlagenträger, so würde es aufgrund der Selbsttoleranz des Immunsystems keine Allo-AK bilden.



Dieser Teil des Modells wird gestützt durch die Beobachtung, dass bestimmte Bullen signifikant häufiger als Vatertiere von BNP-Kälbern auftreten als andere (Ballingall et al., 2011). Wenn vom Vatertier das Gen für die determinierende MHC-I-Variante nicht an das Kalb vererbt wird, so können übertragene Allo-AK nicht an ihr Zielantigen binden und folglich entwickelt das Kalb trotz übertragener Allo-AK keine BNP. Dieses Phänomen würde auch erklären, warum es Fälle von Zwillingssäubern gibt, von denen das eine BNP entwickelt, das andere aber gesund bleibt (Friedrich et al., 2011), obwohl beide das gleiche Muttertier besitzen. Diese Kälber würden sich demnach im vom Vater vererbten MHC-I-Haplotyp unterscheiden.

Ein weiterer Faktor, der das Auftreten der BNP-Symptomatik beeinflusst wurde durch diese Arbeit nachgewiesen. Dabei handelt es sich um den Allo-AK-Titer des Muttertieres. Bei den meisten Tieren werden nach PregSure[®] BVD-Immunsierung MHC-I-Allo-AK induziert. BNP-Symptome treten bei empfänglichen Kälbern aber nur auf, wenn die Menge übertragener Allo-AK einen bestimmten kritischen Wert überschreitet. Hierdurch wird erklärt, weshalb es durchaus BNP⁻-Tiere gibt, die MHC-I-Allo-AK im Serum aufweisen.

6.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Allo-AK gegen MHC I nach Impfung mit PregSure[®] BVD entstehen. Ob jedoch ein kausaler Zusammenhang zwischen MHC-I-Allo-AK und dem BNP-Syndrom besteht, ist noch nicht bewiesen. Zur Bestätigung der Hypothese, dass MHC-I-Allo-AK das BNP-Syndrom auslösen, sind weitere Experimente geplant. Ein Fokus liegt dabei auf den MHC-I-Varianten von MDBK-Zellen. Quelle des MHC I im PregSure[®] BVD-Impfstoff ist die MDBK-ähnliche Produktionszelllinie. Auf MDBK-Zellen sollten demnach die gleichen MHC-I-Varianten vorhanden sein, wie auf der Produktionszelllinie. Diese Varianten sind es, die in geimpften Tieren Allo-AK induzieren. In Vorversuchen konnten über reverse Transkription drei MHC-I-Varianten aus MDBK-Zell-mRNS gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Varianten sollen rekombinant in Bakterien oder in transfizierten eukaryotischen nicht-Rinderzellen exprimiert werden. Einerseits könnten Epitope der Allo-AK mit diesem Material determiniert werden. Sind die genauen Epitope bekannt, kann eine Aussage über alle MHC-I-Varianten getroffen werden, zu denen MHC-I-Allo-AK eine Kreuzreaktivität aufweisen. Zum anderen könnten die rekombinant erzeugten MHC-I-Varianten zur Depletion von Allo-AK aus BNP⁺-Seren verwendet werden. Die MHC-I-Alloantikörper-depletierten Seren könnten in einem Tierversuch BNP-empfindlichen Kälbern injiziert werden. Sollten nur MHC-I-Allo-AK das BNP-

Syndrom induzieren, so sollten diese Kälber keine BNP entwickeln. Umgekehrt sollte bei Kälbern, die über rekombinant erzeugte MHC-I-Varianten aufgereinigte Allo-AK injiziert bekommen, das BNP-Syndrom reproduziert werden können. Allo-AK gegen verschiedene MHC-I-Varianten könnten auch in der Immunhistochemie an Gewebsschnitten verwendet werden und so Aufschluss über eine gewebsspezifische Expression von MHC-I-Varianten geben. Möglicherweise könnte so eine Erklärung dafür gefunden werden, warum in BNP-betroffenen Kälbern nur Knochenmarks- und Blutzellen zerstört werden.

7 Zusammenfassung

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine mit hämorrhagischen Diathesen bei Kälbern einhergehende Krankheit, die seit 2007 in Europa auftritt. Die Ätiologie dieser Erkrankung wurde hinsichtlich eines immunpathologischen Geschehens und einem Zusammenhang mit dem Einsatz der Vakzine PregSure® BVD bei Muttertieren erkrankter Kälber (BNP-Muttertier) untersucht. Die folgenden Resultate wurden erzielt:

1. Sowohl BNP-Muttertiere als auch ein Großteil PregSure® BVD geimpfter Muttertiere ohne Bluterkalb haben Allo-AK im Serum, die sich im indirekten Immunfluoreszenz-Test gegen Oberflächenproteine von bovinen Kulturzelllinien (MDBK- und BL-3-Zellen) richten.
2. Mit den Allo-AK PregSure® BVD immunisierter Tiere wurden aus einem Lysat von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen zwei Proteinspezies mit einer apparenten molekularen Masse von 12 und 44 kDa präzipitiert. Serum BVDV-freier, nicht gegen BVD geimpfter Tiere zeigte keine Reaktivität gegen diese beiden Antigene. Eine schwache Bindung an das 44 kDa Protein wurde bei einigen Tieren nachgewiesen, bei denen andere BVD-Impfstoffe eingesetzt worden waren. Die Allo-AK gegen die 12 und 44 kDa Proteine waren auch im Kolostrum der Tiere nachweisbar. Das 44 kDa Protein wurde durch PMF- und Immunoblotanalysen als Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I (MHC I), das 12 kDa Protein als β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) identifiziert.
3. BNP-Muttertierserum zeigte eine Reaktivität gegen MHC I und β_2 M von PBMCs von empfänglichen Kälbern und von den meisten anderen Muttertieren. Keine Bindung von Allo-AK aus BNP-Muttertierseren erfolgt an die eigenen PBMCs des Muttertieres. Eine Reaktivität von Allo-AK gegen β_2 M kann ausgeschlossen werden, da es sich um ein hochkonserviertes Protein handelt, von dem beim Rind nur eine Variante bekannt ist. Es handelt sich bei β_2 M um ein Kopräzipitat mit dem MHC I, das durch die Probenaufbereitung als eigenständige Bande im WB erscheint.
4. PregSure® BVD enthält nachweisbare Mengen MHC I. Durch eine Auffrischungsimpfung konnte gezeigt werden, dass Allo-AK-Titer nach Vakzinierung mit diesem Impfstoff ansteigen. MHC-I-Allo-AK werden durch die Immunisierung mit PregSure® BVD ausgelöst.
5. Das Auftreten von BNP beim Kalb ist abhängig vom Allo-AK-Titer des Muttertieres. Die Allo-AK-Titer wurden im CELISA quantifiziert. Alle BNP-Muttertiere wiesen höhere Allo-AK-Titer auf als PregSure® BVD geimpfte Tiere, bei deren Kälbern BNP nicht aufgetreten ist.

8 Summary

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is a disease leading to hemorrhagic diathesis in calves, which emerged in Europe in 2007. Aim of this thesis was to investigate the etiology of the disease with respect to an immunopathological cause and a linkage to immunisation of dams of affected calves (BNP-dams) with the vaccine PregSure® BVD. The following results were collected:

1. Both dams of BNP affected calves and dams vaccinated with PregSure® BVD without a case of BNP within their offspring harbour alloantibodies in their serum. An indirect immunofluorescence test showed that these alloantibodies are directed against cell surface proteins of bovine cell lines (MDBK- und BL-3-cells).
2. The alloantibodies in serum of PregSure® BVD vaccinated dams precipitated two proteins with an apparent molecular mass of 12 and 44 kDa from the lysate of surface biotin-labeled MDBK-cells. Sera of animals free of BVD and not vaccinated against BVDV did not show reactivity with those antigens. A weak reactivity against the 44 kDa protein was observed in sera of animals immunised with different BVD vaccines. Alloantibodies against the 12 and 44 kDa protein were also present in colostrum of PregSure® BVD vaccinated animals. Via peptide mass fingerprinting analysis and immunoblot analysis the 44 kDa protein was identified as major histocompatibility complex class I (MHC I), the 12 kDa protein as β_2 -microglobulin (β_2 M).
3. Sera of BNP-dams showed a reactivity with MHC I and β_2 M from PBMCs of susceptible calves and of most other dams. Alloantibodies in serum from a BNP-dam showed no binding to PBMCs of the same dam. A reactivity of alloantibodies against β_2 M is most unlikely as β_2 M is a highly conserved protein and only one variant of this protein exists in cattle. Therefore β_2 M is co-precipitated together with the MHC I and appears due to the sample preparation as an individual band in WB.
4. PregSure® BVD contains a detectable amount of MHC I. Alloantibody titers increase in vaccinated animals after immunisation with PregSure® BVD. Thus it was demonstrated that PregSure® BVD immunisation induces alloantibodies against MHC I.
5. The appearance of BNP in a calf is dependent on alloantibody titer of the dam. Alloantibody titers were quantified in a CELISA. All BNP-dams exhibited higher alloantibody titers than PregSure® BVD immunised dams whose offspring was unaffected by BNP.

9 Literaturverzeichnis

- Alonso-Amelot, M.E., U. Castillo, B.L. Smith, und D.R. Lauren (1996) Bracken ptaquiloside in milk. *Nature* 382, 587.
- Ammann, V.J., G. Fecteau, P. Helie, M. Desnoyer, P. Hebert, und M. Babkine (1996) Pancytopenia associated with bone marrow aplasia in a Holstein heifer. *Can Vet J* 37, 493-5.
- Anjos, B., L. Irigoyen, J. Piazer, J. Brum, R. Figuera, und C. Barros (2009) Experimental acute poisoning by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29, 753-66.
- Aradaib, I.E., M.M. Sawyer, und B.I. Osburn (1994) Experimental epizootic hemorrhagic disease virus infection in calves: virologic and serologic studies. *J Vet Diagn Invest* 6, 489-92.
- Armengol, R., D. Ponté, A. de Prado, M. Sierra, M. Casa, M. de las Heras, A. Uixera, und J. García-Jalón (2010) Síndrome dela diátesis hemorrágica del ternero (pancitopenia neonatal bovina) en Espana. *boletín de anembe* 85, 28-31.
- Arunachalam, B., G.P. Talwar, und R. Raghupathy (1990) A simplified cellular ELISA (CELISA) for the detection of antibodies reacting with cell-surface antigens. *J Immunol Methods* 135, 181-9.
- Ballingall, K.T., M. Nath, A. Holliman, E. Laming, P. Steele, und K. Willoughby (2011) Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 128-32.
- Bastian, M., M. Holsteg, H. Hanke-Robinson, K. Duchow, und K. Cussler (2011) Bovine Neonatal Pancytopenia: Is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29, 5267-75.
- Batten, C.A., L. Edwards, A. Bin-Tarif, M.R. Henstock, und C.A. Oura (2011) Infection kinetics of Epizootic Haemorrhagic Disease virus serotype 6 in Holstein-Friesian cattle. *Vet Microbiol* 154, 23-8.
- Beavis, R., T. Chaudhary, und B. Chait (1992) alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom.* 27, 156-58.
- Beavis, R.C., und B.T. Chait (1989) Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 3, 432-5.
- Bell, C. (2011) Bovine Neonatal Pancytopenia or bleeding calf syndrome. *Livestock* 16, 24–28.
- Bell, C., P. Scott, und C. Penny (2009a) Ten cases of “Bleeding Calf Syndrome” in a Scottish beef herd: Clinical signs, haematology and attempted treatment. In *Proceedings of the Satellite Symposium “Haemorrhagic Diathesis in Calves”*; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Francaise de Buiatrie 17.
- Bell, C., P. Scott, und C. Penny (2009b) Ten cases of “Bleeding Calf Syndrome” in a Scottish beef herd: Post-mortem findings. In *Proceedings of the Satellite Symposium “Haemorrhagic Diathesis in Calves”*; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Francaise de Buiatrie 21.

- Bell, C.R., P.R. Scott, N.D. Sargison, D.J. Wilson, L. Morrison, F. Howie, K. Willoughby, und C.D. Penny (2010) Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec* 167, 938-40.
- Bishop, G.A., und J. Hwang (1992) Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens. *Biotechniques* 12, 326-30.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, und D.C. Wiley (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-12.
- Bolin, S.R. (1995) Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 615-25.
- Bridger, P.S., R. Bauerfeind, L. Wenzel, N. Bauer, C. Menge, H.J. Thiel, M. Reinacher, und K. Doll (2011) Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 1-10.
- Brown, G., P. Biberfeld, B. Christensson, und D.Y. Mason (1979) The distribution of HLA on human lymphoid, bone marrow and peripheral blood cells. *Eur J Immunol* 9, 272-5.
- Brüggemann, J., K. Bronsch, K. Karg, und E. Dahme (1958) Pathophysiologische Studien und klinische Beobachtungen zur Dürener Krankheit. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 5, 634-64.
- Buck, B.C., R. Ulrich, H. Kuiper, M. Reinacher, M. Peters, P. Heimberg, M. Holsteg, C. Puff, L. Haas, M. Ganter, und O. Distl (2011) Bovine neonatal pancytopenia in German Holstein calves. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124, 329-36.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, und P.G. Righetti (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-33.
- Clatworthy, M.R., M. Espeli, N. Torpey, und K.G.C. Smith (2010) The generation and maintenance of serum alloantibody. *Current Opinion in Immunology* 22, 669-81.
- Coppock, R.W., W.E. Hoffmann, H.B. Gelberg, D. Bass, und W.B. Buck (1989) Hematologic changes induced by intravenous administration of diacetoxyscirpenol in pigs, dogs, and calves. *Am J Vet Res* 50, 411-5.
- Corapi, W.V., T.W. French, und E.J. Dubovi (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytotoxic bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 63, 3934-43.
- Corbiere, F., G. Foucras, C. Lacroux, G. Meyer, und F. Schelcher (2009) Haemorrhagic diathesis syndrome: clinical and epidemiological findings of 48 suspected cases in France, 2007-2009. In *Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"*; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W.: Société Française de Buiatrie 11-13.
- Daniels, G.M., und S.G. Amara (1998) Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface. *Methods Enzymol* 296, 307-18.

- Dass, C. (2007) Proteins and Peptides: Structure determination. In: Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons: 289-336
- De Tar, M.W., E. Klohe, A. Grosset, and T. Rau (2002) Neonatal alloimmune thrombocytopenia with HLA alloimmunization: case report with immunohematologic and placental findings. *Pediatr Dev Pathol* 5, 200-5.
- Doll, K., L. Wenzel, and M. König (2010) Krankheitsverlauf bei Kälbern mit hämorrhagischer Diathese. In: Congr. Proc. 2nd Meeting of the "Deutsche Buiatrische Gesellschaft", Berlin 20–23.
- Dubay, S.A., J.C. deVos, Jr., T.H. Noon, and S. Boe (2004) Epizootiology of hemorrhagic disease in mule deer in central Arizona. *J Wildl Dis* 40, 119-24.
- Effros, R.B., E. Zeller, L. Dillard, and R.L. Walford (1985) Detection of antibodies to cell surface antigens by a simplified cellular ELISA (CELISA). *Tissue Antigens* 25, 204-11.
- Ellis-Iversen, J., and A. Colloff (2009) Epidemiological analysis of GB cases. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Buiatrie 5.
- Ellis, S.A., E.C. Holmes, K.A. Staines, K.B. Smith, M.J. Stear, D.J. McKeever, N.D. MacHugh, and W.I. Morrison (1999) Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics* 50, 319-28.
- Ellis, S.A., W.I. Morrison, N.D. MacHugh, J. Birch, A. Burrells, and M.J. Stear (2005) Serological and molecular diversity in the cattle MHC class I region. *Immunogenetics* 57, 601-6.
- Engvall, E., and P. Perlmann (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-4.
- Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Fenwick, G. (1989) Bracken (*Pteridium aquilinum*) - toxic effects and toxic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 46, 147–73.
- Fischer, J.R., L.P. Hansen, J.R. Turk, M.A. Miller, W.H. Fales, and H.S. Gosser (1995) An epizootic of hemorrhagic disease in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri: necropsy findings and population impact. *J Wildl Dis* 31, 30-6.
- Fleming, K.A., A. McMichael, J.A. Morton, J. Woods, and J.O. McGee (1981) Distribution of HLA class 1 antigens in normal human tissue and in mammary cancer. *J Clin Pathol* 34, 779-84.
- Flutter, B., and B. Gao (2004) MHC class I antigen presentation-recently trimmed and well presented. *Cell Mol Immunol* 1, 22-30.

- Foucras, G., F. Corbiere, C. Tasca, C. Pichereaux, C. Caubet, C. Trumel, C. Lacroux, C. Franchi, O. Burlet-Schiltz, und F. Schelcher (2011) Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol* 187, 6564-70.
- Frey, H., und K. Eicken (1995) Untersuchungen über die Wirksamkeit einer inaktivierten BVD-Vakzine zur Erhöhung der Sicherheit einer BVD-Lebendvakzine. *Tierärztl Umsch* 50, 86–93.
- Friedrich, A., A. Aryan, A. Carlin, C. Sauter-Louis, G. Rademacher, und W. Klee (2009a) Disorder of differential diagnostic interest. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Médecine Vétérinaire 20.
- Friedrich, A., M. Büttner, G. Rademacher, W. Klee, B.K. Weber, M. Müller, A. Carlin, A. Assad, A. Hafner-Marx, und C.M. Sauter-Louis (2011) Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res* 7, 10.
- Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, M. Büttner, G. Rademacher, C. Sauter-Louis, und W. Klee (2009b) Experimental production of the syndrome. In: Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W.: Société Française de Médecine Vétérinaire 27.
- Friedrich, A., G. Rademacher, B. Weber, E. Kappe, A. Carlin, A. Assad, C. Sauter-Louis, A. Hafner-Marx, M. Büttner, J. Böttcher, und W. Klee (2009c) Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztl Umsch* 64, 423–31.
- Fries, R., R. Hediger, und G. Stranzinger (1986) Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. *Anim Genet* 17, 287-94.
- Gapper, L.W., D.E. Copestake, D.E. Otter, und H.E. Indyk (2007) Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem* 389, 93-109.
- Gentile, A., C. Rosignoli, D. Pravettoni, S. Testoni, G. Bettini, und A. Belloli (2009) Pancytopenia and haemorrhagic diathesis in calves: Italian experience. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Médecine Vétérinaire 14.
- Grainger, J.D., G. Morrell, J. Yates, und D. Deleacy (2002) Neonatal alloimmune thrombocytopenia with significant HLA antibodies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 86, 200-1.
- Gramatges, M.M., P. Fani, K. Nadeau, S. Pereira, und M.R. Jeng (2009) Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr Blood Cancer* 53, 97-9.
- Greene, J.M., R.W. Wiseman, S.M. Lank, B.N. Bimber, J.A. Karl, B.J. Burwitz, J.J. Lhost, O.E. Hawkins, K.J. Kunstman, K.W. Broman, S.M. Wolinsky, W.H. Hildebrand, und D.H. O'Connor (2011) Differential MHC class I expression in distinct leukocyte subsets. *BMC Immunol* 12, 39.

- Groves, M.L., und R. Greenberg (1982) Complete amino acid sequence of bovine beta 2-microglobulin. *J Biol Chem* 257, 2619-26.
- Heinold, A., B. Kuehl, G. Brenner-Weiss, G. Opelz, und T.H. Tran (2010) Sequential analysis by immunoprecipitation-MALDI-TOF: a novel method for detection and identification of alloantibody specificities. *Hum Immunol* 71, 462-7.
- Hoffmann-Fezer, G., R. Hoffmann, und W. Hofmann (1974) Untersuchungen über die chronische Furazolidon-Vergiftung beim Kalb. 2. Verlaufuntersuchung am Knochenmark. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 81, 59-63.
- Hofmann, W., R. Hoffmann, und G. Hoffmann-Fezer (1974) Untersuchungen über die chronische Furazolidon-Vergiftung beim Kalb. 1. Klinische, hämatologische und morphologische Untersuchungen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 81, 53-8.
- Holmes, E.C., A.F. Roberts, K.A. Staines, und S.A. Ellis (2003) Evolution of major histocompatibility complex class I genes in Cetartiodactyls. *Immunogenetics* 55, 193-202.
- Jones, R.H., R.D. Roughton, N.M. Foster, und B.M. Bando (1977) Culicoides, the vector of epizootic hemorrhagic disease in white-tailed deer in Kentucky in 1971. *J Wildl Dis* 13, 2-8.
- Kao, K.J., D.J. Cook, und J.C. Scornik (1986) Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68, 627-32.
- Kaplan, C. (2006) Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Orphanet J Rare Dis* 1, 39.
- Kappe, E.C., M.Y. Halami, B. Schade, M. Alex, D. Hoffmann, A. Gangl, K. Meyer, W. Dekant, B.A. Schwarz, R. Johne, J. Buitkamp, J. Böttcher, und H. Müller (2010) Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* 123, 31-41.
- Karas, M., M. Glückmann, und J. Schäfer (2000) Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 35, 1-12.
- Karas, M., und F. Hillenkamp (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-301.
- Kaske, M., C. Kellers, und B. Jacobsen (2009) Haemorrhagic diathesis in a BVD-negative calf from Northern Germany. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee W. Toulouse: Société Française de Buiatrie 19.
- Keller, S.L., B.J. Jefferson, R.M. Jacobs, und R.D. Wood (2006) Effects of noncytopathic type 2 bovine viral diarrhoea virus on the proliferation of bone marrow progenitor cells. *Can J Vet Res* 70, 20-7.
- Khalaj, M., A.R. Abbasi, K. Shimojo, Y. Moritomo, K. Yoneda, und T. Kunieda (2009) A missense mutation (p.Leu2153His) of the factor VIII gene causes cattle haemophilia A. *Anim Genet* 40, 763-5.

- Knowles, T.G., J.E. Edwards, K.J. Bazeley, S.N. Brown, A. Butterworth, und P.D. Warriss (2000) Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec* 147, 593-8.
- König, M., L. Jöns-Anders, C. Förster, K. Failing, H.-P. Heckert, und H.-J. Thiel (2006) Impfung gegen BVD/MD: direkter Vergleich verschiedener Impfstoffe und Impfreime. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 5, 281-88.
- Krappmann, K., R. Weikard, S. Gerst, C. Wolf, und C. Kuhn (2011) A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J* 190, 225-9.
- Kruse, P.E. (1983) The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Ann Rech Vet* 14, 349-53.
- Lendemans, D.G., J. Myschik, S. Hook, und T. Rades (2005) Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid. *J Pharm Sci* 94, 1794-807.
- Lindberg, A., J. Brownlie, G.J. Gunn, H. Houe, V. Moennig, H.W. Saatkamp, T. Sandvik, und P.S. Valle (2006) The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech* 25, 961-79.
- Lock, E.A., Y. Sani, R.B. Moore, M.B. Finkelstein, M.W. Anders, und A.A. Seawright (1996) Bone marrow and renal injury associated with haloalkene cysteine conjugates in calves. *Arch Toxicol* 70, 607-19.
- Macaulay, D. (1954) Thrombocytopenia following sulphadimidine. *Br Med J* 2, 1269-70.
- Mamyrin, B., V. Karataev, D. Shmikk, und V. Zagulin (1973) The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution *Sov Phys JETP* 37, 45.
- Marron, B.M., J.L. Robinson, P.A. Gentry, und J.E. Beever (2004) Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Anim Genet* 35, 454-6.
- McKinney, L., F. Weakley, E. Eldridge, R. Campbell, J. Cowan, J. Picken, und H. Biester (1957) S-(dichlorovinyl)-L-cysteine: an agent causing fatal aplastic anaemia in calves. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3932-33.
- Metzger, R., T. Mempel, I. Joppich, und H. Till (2000) Organ-specific distribution of major histocompatibility antigens in rats. *Pediatr Surg Int* 16, 285-92.
- Mizuno, N.S., V. Perman, F.W. Bates, J.H. Sautter, und M.O. Schultze (1959) Life span of thrombocytes and erythrocytes in normal and thrombocytopenic calves. *Blood* 14, 708-19.
- Mohri, M., K. Sharifi, und S. Eidi (2007) Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res Vet Sci* 83, 30-9.
- Moncharmont, P., V. Dubois, C. Obegi, M. Vignal, Y. Merieux, L. Gebuhrer, und D. Rigal (2004) HLA antibodies and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Acta Haematol* 111, 215-20.

- Nayar, G.P., A.L. Hamel, L. Lin, C. Sachvie, E. Grudeski, und G. Spearman (1999) Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J* 40, 277-8.
- Nol, P., C. Kato, W.K. Reeves, J. Rhyan, T. Spraker, T. Gidlewski, K. VerCauteren, und M. Salman (2010) Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*), cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado, U.S.A. *J Zoo Wildl Med* 41, 510-5.
- Osterhoff, D.R., und A.J. de Vos (1977) Isoimmune blood group antibodies in cattle after the use of a blood vaccine. *J S Afr Vet Assoc* 48, 137-9.
- Pappin, D.J., P. Hojrup, und A.J. Bleasby (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3, 327-32.
- Pardon, B., K. De Bleecker, L. Steukers, J. Dierick, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle, und P. Deprez (2009a) Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Epidemiology. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Buiatrie 8.
- Pardon, B., V. Saey, J. Dierick, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle, L. Steukers, K. De Bleecker, und P. Deprez (2009b) Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Gross pathology and cytology of blood and the haematopoietic system. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Buiatrie 23-24.
- Pardon, B., L. Steukers, J. Dierick, R. Ducatelle, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, J. Callens, K. De Bleecker, und P. Deprez (2010) Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis* 57, 135-46.
- Pardon, B., E. Stuyven, S. Stuyvaert, M. Hostens, J. Dewulf, B.M. Goddeeris, E. Cox, und P. Deprez (2011) Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 293-300.
- Parent-Massin, D. (2004) Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicol Lett* 153, 75-81.
- Patel, J.R., R.W. Shilleto, J. Williams, und D.C. Alexander (2002) Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Arch Virol* 147, 2453-63.
- Paton, D.J., G. Sharp, und G. Ibata (1999) Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. *Vet Microbiol* 64, 185-96.
- Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte, und P. Tussen (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-8.
- Peltz, G.A., B. Gallis, und B.M. Peterlin (1987) Monoclonal antibody immunoprecipitation of cell membrane glycoproteins. *Anal Biochem* 167, 239-44.

- Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, und J.S. Cottrell (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-67.
- Pfizer Animal Health Technical Bulletin: Next generation PreZent-A adjuvant system: Key to enhanced protection conferred by BVDV (Types 1 and 2) components of CattleMaster®GOLD™*
- Pfizer (2010) Pfizer animal health stops sale of cattle BVD vaccine in the EU.
http://www.pfizerah.co.uk/sites/sante-animale/UKEnglish/News/Pages/Pregsure_BVD_press_release.aspx.
- Pham, H.L., B.P. Ross, R.P. McGeary, P.N. Shaw, A.K. Hewavitharana, und N.M. Davies (2006) Saponins from *Quillaja saponaria* Molina: isolation, characterization and ability to form immunostimulatory complexes (ISCOMs). *Curr Drug Deliv* 3, 389-97.
- Platt, R., C. Coutu, T. Meinert, und J.A. Roth (2008) Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhoea virus vaccine in beef cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 8-15.
- Plummer, T.H., Jr., und A.L. Tarentino (1991) Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* 1, 257-63.
- Raue, R., S.S. Harmeyer, und I.A. Nanjiani (2011) Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *Vet J* 187, 330-4.
- Ridpath, J.F., J.D. Neill, M. Frey, und J.G. Landgraf (2000) Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77, 145-55.
- Robinson, J., K. Mistry, H. McWilliam, R. Lopez, und S.G. Marsh (2010) IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* 38, 863-9.
- Salemi, S., und R. D'Amelio (2010) Could autoimmunity be induced by vaccination? *Int Rev Immunol* 29, 247-69.
- Salt, S., A. Antonis, A. Peters, A. Brune, S. Jahnecke, und W. Traeder (2004) PregSure® BVD - eine neue inaktivierte BVD-Vakzine. Breite Kreuzneutralisation von europäischen BVDV-Typ-1-und-Typ-2-Stämmen und signifikante Verbesserung der Fertilität nach Testinfektionen. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 32(4), 191-5.
- Sanchez-Miguel, C., M. McElroy, und E. Walsh (2010) Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland. *Vet Rec* 166, 664.
- Sauter-Louis, C., A. Carlin, A. Friedrich, A. Assad, F. Reichmann, G. Rademacher, C. Heuer, und W. Klee (2012) Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany. *Prev Vet Med*.

- Savini, G., A. Afonso, P. Mellor, I. Aradaib, H. Yadin, M. Sanaa, W. Wilson, F. Monaco, und M. Domingo (2011) Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 91, 1-17.
- Schägger, H., und G. von Jagow (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79.
- Scholes, S. (2009) Haemopoietic cell depletion and regeneration in calves with idiopathic haemorrhagic diathesis syndrome. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Médecine Vétérinaire 22.
- Schröter, P., H. Kuiper, M. Holsteg, C. Puff, L. Haas, W. Baumgartner, M. Ganter, und O. Distl (2011) Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124, 390-400.
- Schultze, M.O., P. Klubes, V. Perman, N.S. Mizuno, F.W. Bates, und J.H. Sautter (1959) Blood dyscrasia in calves induced by S-(dichlorovinyl)-L-cysteine. *Blood* 14, 1015-25.
- Scott, A.M., und L.B. Jeffcott (1978) Haemolytic disease of the newborn foal. *Vet Rec* 103, 71-4.
- Segales, J., G.M. Allan, und M. Domingo (2005) Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, 119-42.
- Shimada, A., T. Onozato, E. Hoshi, Y. Togashi, M. Matsui, Y. Miyake, Y. Kobayashi, H. Furuoka, T. Matsui, N. Sasaki, M. Ishii, und H. Inokuma (2007) Pancytopenia with bleeding tendency associated with bone marrow aplasia in a Holstein calf. *J Vet Med Sci* 69, 1317-9.
- Shope, R.E., L.G. Macnamara, und R. Mangold (1960) A virus-induced epizootic hemorrhagic disease of virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Exp Med* 111, 155-70.
- Singh, M., und D.T. O'Hagan (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 33, 469-78.
- Sjolander, A., B. van't Land, und K. Lovgren Bengtsson (1997) Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177, 69-76.
- Smith, K.B., und S.A. Ellis (1999) Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *J Immunol Methods* 228, 29-36.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, und D.C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Smolenaars, A., und M. Mars (2009) Epidemiologic and diagnostic results of haemorrhagic disease syndrome in calves in The Netherlands. In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Médecine Vétérinaire 6 6-7.

- Spagnuolo, M., S. Kennedy, J.C. Foster, D.A. Moffett, und B.M. Adair (1997) Bovine viral diarrhoea virus infection in bone marrow of experimentally infected calves. *J Comp Pathol* 116, 97-100.
- Starcevic, M., M. Tomicic, M. Malenica, und V. Zah-Matakovic (2010) Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA-A24 alloantibodies. *Acta Paediatr* 99, 630-2.
- Starcher, B. (2001) A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal Biochem* 292, 125-9.
- Stöber, M. (2007) Hämorrhagische Diathesen. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, eds. Berlin: Parey. Reprint: 247-53
- Stockman, S. (1916) Cases of poisoning in cattle feeding on meal from soya bean after extraction of the oil. *Journal of Comparative Pathology* 29, 95-107.
- Stormont, C. (1975) Neonatal isoerythrolysis in domestic animals: a comparative review. *Adv Vet Sci Comp Med* 19, 23-45.
- Strupat, K., M. Karas, und F. Hillenkamp (1992) 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 111, 89-102.
- Sutor, A. (2000) Abklärung einer Blutungsneigung. *Hämostaseologie* 20, 1-7.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, und T. Matsuo (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100.000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151-53.
- Temizel, E.M., K. Yesilbag, C. Batten, S. Senturk, N.S. Maan, P.P. Clement-Mertens, und H. Batmaz (2009) Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerg Infect Dis* 15, 317-9.
- Tennant, B., D. Harrold, M. Reina-Guerra, J.W. Kendrick, und R.C. Laben (1974) Hematology of the neonatal calf: erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Vet* 64, 516-32.
- Terracini, B., und V. Parker (1965) A pathological study on the toxicity of S-dichlorovinyl-l-cysteine. *Food and Cosmetics Toxicology* 3, 67-74.
- Thude, H., U. Schorner, C. Helfricht, M. Loth, B. Maak, und D. Barz (2006) Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by human leucocyte antigen-B27 antibody. *Transfus Med* 16, 143-9.
- Toye, P.G., N.D. MacHugh, A.M. Bensaid, S. Alberti, A.J. Teale, und W.I. Morrison (1990) Transfection into mouse L cells of genes encoding two serologically and functionally distinct bovine class I MHC molecules from a MHC-homozygous animal: evidence for a second class I locus in cattle. *Immunology* 70, 20-6.
- Trepanier, L.A. (2004) Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *J Vet Pharmacol Ther* 27, 129-38.

- Valli, V. (2007) Hematopoietic system. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals, 5. Auflage Elsevier, Amsterdam, 107-324
- Vasseur, E., J. Rushen, und A.M. de Passille (2009) Does a calf's motivation to ingest colostrum depend on time since birth, calf vigor, or provision of heat? *J Dairy Sci* 92, 3915-21.
- Walz, P.H., T.G. Bell, B.A. Steficek, L. Kaiser, R.K. Maes, und J.C. Baker (1999) Experimental model of type II bovine viral diarrhea virus-induced thrombocytopenia in neonatal calves. *J Vet Diagn Invest* 11, 505-14.
- Weiss, D.J., und L.G. Adams (1987) Aplastic anemia associated with trimethoprim-sulfadiazine and fenbendazole administration in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 191, 1119-20.
- Weiss, D.J., und D.C. Miller (1985) Bone marrow necrosis associated with pancytopenia in a cow. *Vet Pathol* 22, 90-2.
- Wewetzer, K., C. Heiniger, und B. Seilheimer (1996) An improved cell-ELISA for the differential screening of antibodies against cell surface molecules of viable adherent Schwann cells. *J Immunol Methods* 191, 171-8.
- Willoughby, K., J. Gilray, M. Maley, A. Dastjerdi, F. Steinbach, M. Banks, S. Scholes, F. Howie, A. Holliman, P. Baird, und J. McKillen (2010) Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 166, 436-7.
- Willoughby, K., J. Gilray, M. Maley, D. Everest, A. Gurralla, A. Dastjerdi, und M. Banks (2009) Bleeding Disorders of Calves: Virological investigations in the UK. In: Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009; Marseille. Edited by: Klee, W. Toulouse: Société Française de Médecine Vétérinaire 26.
- Witt, K., C.N. Weber, J. Meyer, S. Buchheit-Renko, und K.E. Müller (2011) Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 169, 228.
- Yadin, H., J. Brenner, V. Bumbrov, Z. Oved, Y. Stram, E. Klement, S. Perl, S. Anthony, S. Maan, C. Batten, und P.P. Mertens (2008) Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Vet Rec* 162, 53-6.
- Yamada, K., M. Ojika, und H. Kigoshi (2007) Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat Prod Rep* 24, 798-813.
- Yeruham, I., Y. Avidar, S. Harrus, L. Fishman, und I. Aroch (2003) Immune-mediated thrombocytopenia and putative haemolytic anaemia associated with a polyvalent botulism vaccination in a cow. *Vet Rec* 153, 502-4.
- Zimmer, G.M., G.H. Wentink, C. Brusckhe, F.J. Westenbrink, J. Brinkhof, und I. de Goey (2002) Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhea virus. *Vet Microbiol* 89, 255-65.

10 Danksagung

Besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Tillmann Rümenapf für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung. Durch die vielen angeregten Diskussionen und Hilfestellungen beim Design von Experimenten hat er maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei:

- Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel und Herrn Prof. Dr. Klaus Doll für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.
- Meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Rümenapf, Zwaantje Andreoli, Manuela Heimann, Dr. Angelika Irmeler, Dr. Christiane Riedel und Eveline Wentz für das angenehme Arbeitsklima und die technische Unterstützung. Besonders gilt mein Dank meinem Kollegen, Dr. Benjamin Lamp, der mir diverse Labortechniken gezeigt und sich durch kreative Ratschläge in das Projekt eingebracht hat.
- Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind, Dr. Simone Schillinger und Monika Beyer vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen für das zur Verfügung gestellte Material (Serumproben, IL-A88 Hybridom) und Frau Prof. Dr. Christa Kühn vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf (Serum- und Blutproben).
- Prof. Dr. Günter Lochnit vom Institut für Biochemie (FB11) der JLU Gießen für die massenspektrometrischen Analysen, die zur Proteinidentifizierung beigetragen haben
- Julia Franke von der Klinik für Wiederkäuer der JLU Gießen für die Hilfestellungen bei der Gewinnung und Aufarbeitung von Rindervollblut.
- den Mitgliedern des Verbundprojekts „Ursachenermittlung der bei Kälbern auftretenden Hämorrhagischen Diathese (Bovine Neonatale Panzytopenie)“.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin, Dr. Stefanie Bohle, meiner Familie und Freunden, die entweder durch Hilfe bei der Erstellung der Arbeit oder durch die Wiederherstellung meiner Moral maßgeblichen Anteil an dieser Arbeit hatten.

Für die finanzielle Förderung des Projektes möchte ich mich beim Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV, Förderungsnummer: 2809HS025) und bei der Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann bedanken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5922-4



9 783835 1959224

Cover photos: Joe Michl Studio (cow) + Recorridos Virtuales (blood)