

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Immunpathogenese
der Bovinen Neonatalen Panzytopenie

von
Kristina Johanna Hildegard Kleinwort, geb. Fröhlich
aus
Nürnberg

München 2015

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. C. A. Deeg

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Cornelia Deeg

Korreferent/en: Prof. Dr. Armin Scholz
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meinen Lieben

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	3
2.1 Erscheinungsbild der BNP	3
2.1.1 Klinische Symptome.....	3
2.1.2 Hämatologische Befunde	4
2.1.3 Veränderungen des Knochenmarks	4
2.2 Ätiologie der BNP	5
2.3 Pathogenese der BNP	7
2.4 Untersuchungen zum BNP-auslösenden Alloantigen	14
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Puffer und Lösungen	22
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenaufbereitung	22
3.1.2 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung.....	23
3.1.3 Puffer und Lösungen für die 1D Gelelektrophorese.....	23
3.1.4 Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	26
3.1.5 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	28
3.1.6 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	29
3.1.7 Lösungen für die Zellstimulierung.....	29
3.1.8 Puffer und Lösungen zur Anreicherung von Oberflächenproteinen und zur Zellfraktionierung	30
3.1.9 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau	33
3.1.10 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse	35
3.2 Probenmaterial	36
3.2.1 Gewinnung der Blutproben.....	37
3.2.2 Gewinnung von Serum.....	37
3.2.3 Gewinnung der peripheren Blutleukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation .	38
3.2.4 Zählung der gewonnenen Zellen	38
3.2.5 Stimulation von Zellen für Western Blots.....	39
3.2.6 Aufbewahrung und Aufbereitung von PBL für Western Blots.....	39
3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate	39
3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.1 1D Gelelektrophorese	40

3.4.2 Western Blot	41
3.4.3 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung	41
3.4.4 Immunoblot	42
3.4.5 Statistische Auswertung	43
3.5 Durchflusszytometrie	43
3.5.1 FITC-Labeln der Antikörper	44
3.5.2 Fluoreszenzfärbung von Leukozyten für die Durchflusszytometrie	44
3.5.3 Detektion der Zellen mit dem Durchflusszytometer	45
3.5.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	46
3.5.5 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	46
3.6 Immunzytochemie	47
3.7 Zellproliferationsassay.....	47
3.7.1 <i>In vitro</i> Stimulation und radioaktive Markierung von Lymphozyten	47
3.7.2 Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten	48
3.8 Stimulation und Fraktionierung von Zellen für die differenzielle Proteomanalyse	49
3.8.1 Stimulation von Zellen für die Proteomanalyse.....	49
3.8.2 Fraktionierung der stimulierten Zellen für die Proteomanalyse	49
3.8.2.1 Biotinylierung der Plasmazellmembranproteine.....	49
3.8.2.2 Anreicherung der Plasmazellmembranproteine und Gewinnung der zytosolischen Fraktion.....	50
3.8.2.3 Extraktion der Proteine von den Beads und Verdau der Plasmazellmembran- Fraktion.....	51
3.8.2.4 Aufbereitung der Zellkern-Fraktion	51
3.9 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen	52
3.9.1 FASP-Verdau der Fraktionen Zytosol und Nukleus	52
3.9.2 LC-MS/MS	53
3.9.3 Quantitative Auswertung mit Progenesis.....	54
3.9.4 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierten Peptide	54
3.9.5 Suche von Orthologen und Paralogen.....	55
3.9.6 Auswertung der Proteinabundanzen	56
4 ERGEBNISSE	57
4.1 BNP-Alloantigenkandidaten konnten nicht verifiziert werden.....	57

4.2 BNP-Immunglobuline binden gleichmäßig an Lymphozyten von Kontroll- und BNP-Überträgerkühen.....	58
4.3 Differenziell exprimierte Proteine auf der Zelloberfläche von PBL weisen auf ein unterschiedliches Immunrepertoire der Kühe hin	63
4.3.1 Die differenzielle Oberflächenexpression von CD61, CD43, CD29 und CD5 kann mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden.....	63
4.3.2 Differenzielle Gesamtexpression von CD5 kann mittels Western Blot bestätigt werden	65
4.4 Abweichende Reaktion von BNP-Lymphozyten auf polyklonale Stimulation	66
4.4.1 Lymphozyten von Überträgerkühen zeigen hyperproliferativen Phänotyp auf polyklonale Stimulation	66
4.4.2 Proteine von Kontroll- und Überträgerlymphozyten werden nach Stimulation mit PWM sehr deutlich differenziell reguliert	68
4.4.2.1 Auf der Plasmazellmembranoberfläche von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine.....	69
4.4.2.2 Auf der Plasmazellmembranoberfläche von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine.....	72
4.4.2.3 Im Zytosol von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine	74
4.4.2.4 Im Zytosol von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine	78
4.4.2.5 Im Zellkern von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine	81
4.4.2.6 Im Zellkern von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine	84
4.4.2.7 Unterschiedliche molekulare Funktionsbereiche von nach PWM-Stimulation höher exprimierten Plasmazellmembranproteinen bei Kontroll- und Überträgerlymphozyten	89
4.4.3 Verifikation nach PWM-Stimulation hochregulierter Proteine mittels Western Blot .	90
4.4.3.1 Kontrolllymphozyten regulieren TLR2 nach PWM-Stimulation hoch	91
4.4.3.2 Überträgerkühe regulieren Galectin 3 nach PWM-Stimulation hoch	92
4.4.4 Lymphozyten von Kontroll- und Überträgerkühen proliferieren nicht unterschiedlich nach <i>in vitro</i> Stimulation mit Agonisten von TLR3, TLR4, TLR9 und PregSure BVD	93

4.4.5 Die für Th1- und Th2-Immunantworten spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 werden nach PWM-Stimulation differenziell reguliert	95
4.4.5.1 Kontrollkühe regulieren T-bet nach PWM-Stimulation hoch.....	96
4.4.5.2 Überträgerkühe regulieren GATA3 nach PWM-Stimulation hoch.....	97
5 DISKUSSION	99
6 ZUSAMMENFASSUNG	125
7 SUMMARY	127
8 LITERATURVERZEICHNIS	129
DANKSAGUNG	139

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mykrogramm
μl	Mykroliter
μm	Mykrometer
μM	Mykromolar
1D	Eindimensional
A	Ampère
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCR	B-Zellrezeptor (<i>engl.</i> B-cell receptor)
BK-KL3A	Bovine Nierenzelllinie
BLV	Bovines Leukose Virus
BNP	Bovine Neonatale Panzytopenie
BoLA	Bovines Leukozyten-Antigen
Breg	Regulatorische B-Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
BVD(V)	Bovine Virus Diarrhoe (Virus)
CaCl_2	Kalziumchlorid
CD	Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen (<i>engl.</i> Cluster of Differentiation)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
ConA	Concanavalin A
CpG-ODN	Cytosin Phosphat Guanin - Oligodesoxynukleotid
cpm	Einheit für die $[^3\text{H}]$ -Aktivität (<i>engl.</i> counts per minute)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DIIHA	Medikamenten-induzierte immunhämolytische Anämie (<i>engl.</i> Drug-induced immune hemolytic anemia)
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced-Chemilumineszenz
Engl.	Englisch
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> Fluorescence activated cell sorting)
FASP	Art der Proteinaufbereitung für die Massenspektrometrie (<i>engl.</i> Filter-aided sample preparation)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)
FDR	Falschpositivrate (<i>engl.</i> False discovery rate)
FilA	Filamin A
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo-Puffer	Fluoreszenzpuffer
GATA3	Th2-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor (<i>engl.</i> Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HNA	Humanes neutrophiles Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> High-performance liquid chromatography)
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISCOM	Immunstimulatorische Komplexe
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Flüssigchromatografie (<i>engl.</i> Liquid chromatography)
l	Liter
LILRA2	Leukozyten immunglobulinähnlicher Rezeptor Unterfamilie A, Mitglied 2 (<i>engl.</i> Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2)
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar
mA	Milliampère
MAP	Mycobacterium avium paratuberculosis
mCi	Millicurie
MDBK	Bovine Nierenzelllinie (<i>engl.</i> Madin darby bovine kidney)
MFI	Bindungsintensität (<i>engl.</i> Mean fluorescence intensity)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mgf	Dateiformat (<i>engl.</i> Mascot generic file)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> Major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millilolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
p	Signifikanzwert (<i>engl.</i> probability-value)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam3CSK	Pam3CysSerLys
Pam3Cys	Tri-palmitoyl-S-glyceryl cysteine
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (<i>engl.</i> Pathogen-associated molecular patterns)
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PCV	Porcines Circovirus
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

Abkürzungsverzeichnis

PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMT	Photodetektor (<i>engl.</i> Photomultiplier Tube)
PNGase F	Peptide-N-Glycosidase F
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
POD	Peroxidase
Poly i:c	Polyinosin:polycytidylsäure (<i>engl.</i> Polyinosinic:polycytidylic acid)
PS	PregSure BVD
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP(-T)	Polyvinylpyrrolidone (-Tween) Lösung
PWM	Lektin aus <i>Phytolacca americana</i> (<i>engl.</i> Pokeweed Mitogen)
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> Relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
RPMI	Zellkulturmedium (<i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
T-bet	Th1-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor (<i>engl.</i> T-box transcription factor TBX21)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Tris-buffered saline)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>engl.</i> T-cell receptor)
tDC	Tolerogene dendritische Zellen
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>engl.</i> Trifluoroacetic acid)
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> Transforming growth factor beta)
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>engl.</i> Toll-like receptor)
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungenschädigung
Treg	Regulatorische T-Zellen
TSP1	Thrombospondin-1

1 EINLEITUNG

Die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine Krankheit, die erstmals im Jahr 2005 in Deutschland auftrat und in den folgenden Jahren auch in weiteren europäischen Ländern zu Symptomen von hämorrhagischer Diathese bei unter vier Wochen alten Kälbern führte (Bastian et al. 2011, Friedrich et al. 2009). Die erkrankten Kälber zeigten Petechien, blutigen Durchfall sowie weitere multiple Hämorrhagien und es kam zu einer starken Thrombo- und Leukozytopenie sowie zur Knochenmarksdepletion (Jones et al. 2013). Neunzig Prozent der symptomatischen Kälber starben oder mussten euthanasiert werden (Bastian et al. 2011). Epidemiologische Studien ergaben als Ursache der Erkrankung eine Immunreaktion auf eine Mutterkuhimpfung mit dem inaktivierten Impfstoff PregSure BVD (Jones et al. 2013). Zur Herstellung des Impfstoffs wurde ein neues, hochpotentes Adjuvans verwendet und Untersuchungen zeigten, dass der Impfstoff stark mit Bestandteilen der zur Impfstoffherstellung verwendeten bovinen Nierenzelllinie (Madin darby bovine kidney, MDBK) verunreinigt war (Bastian et al. 2011). 5 – 10% der PregSure BVD-geimpften Kühe bildeten nach der Impfung pathogene Antikörper gegen diese Verunreinigungen aus, die sie dann über das Kolostrum an ihre Kälber weitergaben (Bastian et al. 2011). Die Antikörper führten bei den Kälbern innerhalb weniger Stunden zur Zerstörung von Thrombozyten und Leukozyten sowie von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark (Bell et al. 2013). Die experimentelle Verabreichung von BNP-Kolostrum, die bei Kälbern von Kontrollkühen ebenfalls zur Auslösung der BNP-Symptomatik führte, erbrachte den Beweis, dass BNP durch die Kolostrumantikörper ausgelöst wird (Friedrich et al. 2009). Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zeigen, dass für die Pathogenese der BNP Antikörper verantwortlich sind, die möglicherweise durch zelluläre Verunreinigungen im Impfstoff entstanden. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde MHCI als auslösendes Alloantigen postuliert, da BNP-Überträgerseren in Versuchen spezifisch an MHCI von MDBK-Zellen und Rinderleukozyten gebunden hatten (Deutskens et al. 2011, Foucras et al. 2011). Weitere Versuche zeigten jedoch, dass Kontrollseren und Seren von mit einem anderen Impfstoff als PregSure BVD-geimpften Rindern ebenso an MHCI banden wie BNP-Seren (Deutskens 2012). Auch die Daten anderer Arbeitsgruppen zum Bindungsmuster der BNP-Antikörper sprechen gegen MHCI als auslösendes Antigen, da sie nicht zum Expressionsmuster

von MHCII passen (Assad et al. 2012, Schumann 2011). Die exakte Pathogenese dieser wichtigen Krankheit ist somit nach wie vor ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Immunkapazitäten von geimpften Kontroll- und BNP-Kühen zu charakterisieren. Damit sollten Unterschiede aufgedeckt werden, die eine abweichende Reaktion der BNP-Kühe auf die Impfung mit PregSure BVD erklären können und somit ein Beitrag zur Aufklärung dieser schweren, Impf-assoziierten Erkrankung geleistet werden.

2 LITERATUR

2.1 Erscheinungsbild der BNP

2.1.1 Klinische Symptome

Im Jahr 2005 traten erste Fälle von hämorrhagischer Diathese bei unter vier Wochen alten Kälbern in Bayern auf, die sich im Jahr 2006 zusehends häuften (Bastian et al. 2011, Friedrich et al. 2009). Kurz darauf wurden weitere BNP-Fallberichte aus ganz Deutschland und vielen weiteren europäischen Staaten wie Großbritannien, Irland, den Niederlanden, Belgien, Luxemburg, Frankreich, Italien, Spanien, Portugal, Ungarn und Polen gemeldet (Bell et al. 2010b, Friedrich et al. 2009, Jaskowski et al. 2012, Jones et al. 2013, Sanchez-Miguel et al. 2010, Sauter-Louis et al. 2012). 2011 wurden dann erste Fälle aus Neuseeland bekannt (Jones et al. 2013, Laming et al. 2012). Charakteristische Symptome dieser Erkrankung waren das plötzliche Auftreten von multiplen äußeren und inneren Blutungen, Thrombo- und Leukozytopenie sowie Knochenmarksdepletion bei unter vier Wochen alten Kälbern (Euler et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Penny et al. 2009). Dabei zeichnete sich die BNP vor allem durch ihren dramatischen Verlauf und eine hohe Letalitätsrate von circa 90% aus (Deuskens et al. 2011, Pardon et al. 2010). Als erste klinische Symptome wiesen die erkrankten Kälber häufig blasse Schleimhäute mit petechialen Einblutungen auf, die vor allem in Sklera, Konjunktiva und Maulschleimhaut sichtbar waren (Laming et al. 2012, Pardon et al. 2010, Penny et al. 2009, Sanchez-Miguel et al. 2010). Epistaxis, das Bluten aus der Maulhöhle und blutiger Durchfall waren weitere Symptome (Jones et al. 2013, Pardon et al. 2010). Es kam zu kaum stillbaren Hautblutungen aus Injektionsstellen, Ohrmarkeneinzugsstellen oder Insektenstichwunden (Bell et al. 2010b, Laming et al. 2012, Pardon et al. 2010). Circa die Hälfte der betroffenen Kälber entwickelte hohes, therapieresistentes Fieber, einige auch Dyspnoe (Kappe et al. 2010, Pardon et al. 2010). Das Allgemeinbefinden der Tiere verschlechterte sich im Verlauf der Erkrankung zunehmend und die Kälber wurden apathisch (Pardon et al. 2010). Erkrankte Tiere starben meist innerhalb weniger Tage oder wurden aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert (Demasius et al. 2014, Euler et al. 2013). Nur etwa zehn Prozent der betroffenen Kälber überlebten die Erkrankung, erholten sich dann aber vollständig (Pardon et al. 2010). Des Weiteren geht man davon aus, dass es auch subklinische

Verlaufsformen von BNP gab, da einige Tiere aus betroffenen Betrieben ähnliche Veränderungen des Blutbilds aufwiesen, jedoch keinerlei klinische Symptome zeigten (Pardon et al. 2010).

2.1.2 Hämatologische Befunde

Im Blutbild von an BNP erkrankten Kälbern ließen sich charakteristische Veränderungen erkennen. Zwar schwankten die genauen Werte zwischen den einzelnen erkrankten Kälbern sowie im Verlauf der Erkrankung, jedoch waren generell deutliche Abweichungen von einem physiologischen Blutbild zu erkennen. Nur wenige Stunden nach Kolostrumaufnahme entwickelten die Tiere eine hochgradige Thrombozytopenie (Bell et al. 2010b, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012, Pardon et al. 2010). Im weiteren Verlauf der Erkrankung waren bei manchen Kälbern sogar keinerlei Thrombozyten mehr nachweisbar (Bell et al. 2010b, Pardon et al. 2010). Zusätzlich zum Abfall der Thrombozyten kam es gleichzeitig zu einer starken Leukozytopenie, die Granulozyten, Monozyten und vor allem Lymphozyten betraf (Bell et al. 2010b, Laming et al. 2012, Pardon et al. 2010). Nach diesem ersten Abfall stiegen die Leukozytenzahlen meist innerhalb weniger Stunden wieder an, blieben jedoch im weiteren Verlauf der Erkrankung immer nur knapp oberhalb der unteren Grenze des Referenzbereichs oder darunter (Bell et al. 2010b, Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010). Ein Teil der erkrankten Kälber zeigte zusätzlich eine aregenerative Anämie (Bell et al. 2010b). Auch durch den starken Blutverlust sank der Hämatokrit im Verlauf der Erkrankung bei einigen Tieren auf Werte unterhalb des Referenzbereiches ab (Friedrich et al. 2009).

2.1.3 Veränderungen des Knochenmarks

Im Verlauf der BNP kam es innerhalb weniger Tage zu einer drastisch fortschreitenden Degeneration des Knochenmarks (Kappe et al. 2010, Pardon et al. 2010). Mit Einsetzen der äußeren Blutungen konnte bereits eine deutliche Hypoplasie des Knochenmarks festgestellt werden (Pardon et al. 2010). In dieser Phase waren meist noch Vorläuferzellen der verschiedenen Zelllinien und Megakaryozyten auffindbar, jedoch in reduzierter Zahl (Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010). Von den myeloiden und erythroiden Zelllinien waren fast nur noch ausgereifte Zellstadien nachweisbar (Laming et al. 2012). Teilweise kam es zum Auftreten von Makrophagen in der Nähe von Lymphozyten und zur Hämophagozytose von Knochenmarkszellen (Pardon et al. 2010). Im weiteren

Krankheitsverlauf degenerierte das Knochenmark immer mehr bis hin zur vollkommenen Knochenmarksaplasie (Kappe et al. 2010, Pardon et al. 2010). In dieser terminalen Phase waren bei wenigen Kälbern noch vereinzelt Vorläuferzellen und Makrophagen sichtbar, die meisten Tiere wiesen jedoch keinerlei Megakaryozyten und Vorläuferzellen der lymphoiden, myeloiden und erythroiden Zelllinien im Knochenmark mehr auf (Pardon et al. 2010). Die hämatopoetischen Zellen werden fast vollständig durch Erythrozyten, proteinhaltige Flüssigkeit und Fettgewebe ersetzt (Bell et al. 2010b).

2.2 Ätiologie der BNP

Als Ursache für die BNP wurden zunächst viele Möglichkeiten in Betracht gezogen. Eine Vergiftung mit Medikamenten (zum Beispiel Sulfadoxin-Trimethoprim oder Chloramphenicol) oder mit anderen toxischen Substanzen (zum Beispiel Trichothecene, Dichlorvinyl Cystein oder Adlerfarn), die Symptome von hämorrhagischer Diathese und Knochenmarksdepression auslösen können, konnte relativ schnell ausgeschlossen werden (Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010). Auch radioaktive Strahlung wurde als Ursache für die Knochenmarksschädigung in Betracht gezogen, konnte jedoch ebenfalls nicht bestätigt werden (Pardon et al. 2010). Infektionen mit dem *bovinen Virus Diarrhoe Virus* (BVDV), dem *Blauzungenvirus* oder dem *enzootischen Hämorrhagie Virus*, die BNP-ähnliche Symptome hervorrufen können, konnten auch ausgeschlossen werden (Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010). Eine Forschungsgruppe postulierte eine Infektion der Kälber mit porcinem Circovirus (PCV) Typ 2b als Ursache für die Krankheit, da sie mittels PCR bei einem Fünftel der von ihnen untersuchten BNP-Kälber virale DNA nachweisen konnten, deren Sequenz zu 99% mit der von PCV2 übereinstimmte (Kappe et al. 2010). In mehreren voneinander unabhängigen Untersuchungen mit insgesamt 61 Kälbern konnte diese Theorie jedoch weder mittels PCR, Immunhistochemie, Virusisolation oder Elektronenmikroskopie noch mit Hilfe einer Mikroarray-Analyse bestätigt werden (Willoughby et al. 2010). Mehrere Arbeitsgruppen vermuteten ein immunmediertes Geschehen als Ursache für die BNP (Bridger et al. 2011, Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010, Penny et al. 2009). Es war auffällig, dass die Betriebe, in denen Fälle von BNP auftraten, alle den inaktivierten Impfstoff PregSure BVD der Firma Pfizer Animal Health angewandt hatten (Friedrich et al. 2009, Jones et al. 2013, Kasonta et al. 2012, Lambton et al.

2012, Sauter-Louis et al. 2012). Hinzu kam, dass Länder, in denen dieser Impfstoff nicht auf dem Markt war (Schweiz, Österreich, Skandinavien), keine BNP-Fälle meldeten (Friedrich et al. 2009, Kasonta et al. 2012). Ein Zusammenhang zwischen der Mutterkuhimpfung mit PregSure BVD und dem Auftreten von BNP bei deren Kälbern konnte dann durch verschiedene epidemiologische Studien bestätigt werden (Jones et al. 2013, Kasonta et al. 2012, Sauter-Louis et al. 2012). Untersuchungen zeigten, dass der Impfstoff stark mit Bestandteilen der bovinen Nierenzelllinie (MDBK) verunreinigt war, die zur Virusvermehrung bei der Impfstoffherstellung verwendet wurde (Euler et al. 2013). Des Weiteren wurde bei diesem Impfstoff erstmals ein neues, hochpotentes Adjuvans, Procision-A, bestehend aus Quil-A, Cholesterol, Amphigen Base und Drakeol verwendet, um starke Immunreaktionen gegen BVDV zu erzeugen (Bastian et al. 2011, Kasonta et al. 2012). Zusammen mit dem BVD-Antigen und den anderen Komponenten des Adjuvans formt Quil-A immunstimulatorische Nanokomplexe, die eine effektive Produktion Antigen-spezifischer Antikörper (IgG₁ und IgG₂) sowie eine T-Zellantwort induzieren (Deutskens et al. 2011). PregSure BVD kam im Jahr 2004 auf den deutschen Markt (Kasonta et al. 2012). Bis Ende August 2012 wurden 6913 BNP-Verdachtsfälle aus ganz Europa gemeldet (Jones et al. 2013). Die Inzidenz von BNP lag damit unter 0,3% (Bastian et al. 2011). Dabei ist vor allem interessant, dass längst nicht alle, sondern nur 5 - 10% der mit PregSure BVD geimpften Kühe BNP-Kälber hervorgebracht haben (Bastian et al. 2011). Die restlichen Kühe wurden zwar simultan zu den BNP-Kühen geimpft, ihr Kolostrum hat bei ihren Kälbern jedoch keine BNP induziert (geimpfte Kontrollkühe) (Bastian et al. 2011).

Innerhalb Deutschlands und anderer europäischer Länder schwankte die Inzidenz stark. Wie eine Studie zeigte, war dies abhängig vom regional angewandten Impfschema (Kasonta et al. 2012). In Niedersachsen beispielsweise, wo nur sehr wenige BNP-Fälle auftraten, wurde zur Bekämpfung von BVD ein Impfschema angewandt, das nach einer initialen Impfung mit PregSure BVD zwei Boosterimpfungen mit einer BVD-Lebendvakzine vorsah (Kasonta et al. 2012). Die Inzidenz lag hier bei sechs erkrankten BNP-Kälbern pro 100.000 verkaufter PregSure BVD-Impfdosen (Kasonta et al. 2012). In Bayern dagegen erfolgte eine Grundimmunisierung nach Herstellerangaben mit zwei Dosen PregSure BVD im Abstand von drei Wochen, gefolgt von weiteren Boosterungen, ebenfalls mit PregSure BVD, nach je zwölf Monaten (Kasonta et al. 2012). Die Inzidenz von BNP

lag hier mit 99 BNP-Fällen pro 100.000 verkaufter PregSure BVD Impfdosen viel höher als in Regionen mit nur einmaliger Verabreichung von PregSure BVD (Kasonta et al. 2012). Diese Tatsache zeigt auf, dass zwar schon eine einmalige Verabreichung von PregSure BVD zur Bildung der tödlichen BNP-Antikörper führen konnte, durch wiederholte Verabreichung der Antikörpertiter jedoch stärker anstieg (Kasonta et al. 2012). Dieser Sachverhalt erklärt auch das zeitlich versetzte Auftreten der Krankheit. In Deutschland wurden vermehrte Fälle erst im Jahr 2006 beobachtet, zwei Jahre nachdem der Impfstoff auf den Markt kam (Friedrich et al. 2009). Erste Fälle traten schon 2005 auf, konnten allerdings erst später mit BNP in Verbindung gebracht werden (Bastian et al. 2011). Zu einer Häufung des Krankheitsbildes kam es meist aber erst drei Jahre nach Produkteinführung (Kasonta et al. 2012). Dies war auch in Neuseeland der Fall, wo im August 2011 erste BNP-Fälle publik wurden, drei Jahre nachdem der Impfstoff dort 2008 auf den Markt gekommen war (Kasonta et al. 2012). Pfizer Animal Health nahm den Impfstoff 2010 freiwillig vom europäischen Markt und nach dem Auftreten erster BNP-Fälle in Neuseeland im August 2011 auch dort (Bastian et al. 2011, Jones et al. 2013). Auf Empfehlung der europäischen Arzneimittelagentur für Tierarzneimittel wurden die Zulassungen für PregSure BVD in allen EU-Mitgliedstaaten im August 2010 aufgehoben (Jones et al. 2013).

2.3 Pathogenese der BNP

Nachdem als Ursache der BNP eine Antikörperbildung der Mutterkühe nach PregSure BVD-Impfung feststand, stellte sich als nächstes die Frage nach der Pathogenese. Da Kühe eine Placenta epitheliochorialis haben, die für Antikörper während der Trächtigkeit undurchlässig ist, werden maternale Antikörper bei Kühen allein in den ersten Lebensstunden durch das Kolostrum an die Kälber weitergegeben (Assad et al. 2012, Deutskens et al. 2011). Wie in mehreren Kolostrumtränkeversuchen nachgewiesen und reproduziert werden konnte, wurden so auch die BNP-auslösenden Antikörper von den Mutterkühen auf die Kälber übertragen (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Schroter et al. 2011). In diesen Versuchen konnte bei Kälbern aus BNP-freien Betrieben durch die Verabreichung von Kolostrum einer Kuh, die schon ein BNP-Kalb geboren hatte, ebenfalls BNP induziert werden (Friedrich et al. 2009, Schroter et al. 2011). Anders herum entwickelten Kälber von bekannten BNP-Überträgerkühen keine BNP, wenn man ihnen Kolostrum von einer Kuh ohne BNP-Vorgeschichte verabreichte (Bell et al.

2010a). Dies markierte die pathogenetisch entscheidende Rolle von Kolostrum (BNP-Kolostrum) bestimmter Kühe (BNP-Kühe) bei der BNP.

Bei einer der Tränkestudien wurden verschiedene Arten von Kolostrum getestet. Manche Kälber bekamen Kolostrum von einzelnen BNP-Kühen und andere bekamen Mischkolostrum von mehreren BNP-Kühen verabreicht (Schroter et al. 2011). Es stellte sich heraus, dass Kälber, die Mischkolostrum erhalten hatten, mit 80% eine höhere Letalitätsrate aufwiesen als Kälber, die Kolostrum von je einer einzelnen BNP-Kuh (66%) erhalten hatten (Schroter et al. 2011).

In den einzelnen Versuchen wurden die Tiere nach Verabreichung des Kolostrums auf ihre klinischen Symptome, ihre Blutwerte und auf die Veränderungen im Knochenmark getestet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von 23 getesteten Tieren in vier separaten Versuchen 20 Kälber (87%) charakteristische, klinische BNP-Symptome entwickelten (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012, Schroter et al. 2011). Viele zeigten als erste klinische Symptome ab dem dritten Tag nach Kolostrumaufnahme blutigen Kot und ab dem sechsten Tag petechiale Blutungen in der Schleimhaut (Friedrich et al. 2009). Mehrere Kälber bluteten aus den Ohrmarkeneinzugsstellen und zeigten eine erhöhte Blutungsneigung sowie verlängerte Blutungszeiten (Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012). Ihr Allgemeinbefinden reduzierte sich mit Fortschreiten der Krankheit zusehends, sodass die meisten Kälber euthanasiert werden mussten (Laming et al. 2012).

Die hämatologischen Proben der erkrankten Kälber ließen ebenfalls einen charakteristischen Verlauf der BNP erkennen. Bereits zwei Stunden nach der Kolostrumaufnahme kam es zu einem starken Abfall der Thrombozyten und der Leukozyten gegenüber den mit Kontrollkolostrum getränkten Kälbern (Friedrich et al. 2009). Bei einer Studie mit insgesamt zehn Kälbern waren bei den fünf mit BNP-Kolostrum getränkten Tieren nach acht Stunden bereits 40% weniger Thrombozyten im Vergleich zu den fünf Kontrollkälbern vorhanden (Bell et al. 2013). Danach stiegen die Werte zwar wieder leicht an, sanken jedoch nach dem vierten Tag erneut stetig ab, bei zwei Kälbern sogar so stark, dass keine Thrombozyten mehr nachweisbar waren (Bell et al. 2013). Die Lymphozyten der erkrankten Kälber waren vier Stunden nach Kolostrumaufnahme gegenüber den Kontrollkälbern bereits um 70% abgesunken und Monozyten schon nach zwei Stunden um 95% reduziert (Bell et al. 2013). Auch bei diesen beiden Zellpopulationen stieg die Zahl nach dem ersten

Abfall wieder etwas an, nach 48 Stunden sank sie jedoch ebenfalls erneut ab (Bell et al. 2013). Neutrophile Granulozyten zeigten nach vier Stunden einen Rückgang um 75% im Vergleich zum Ausgangswert (Bell et al. 2013). Diese Zellpopulation erholte sich jedoch innerhalb von zwölf Stunden wieder und bereits acht Stunden nach Kolostrumgabe waren keine Unterschiede mehr zu den Kontrolltieren nachweisbar (Bell et al. 2013). Die Werte der stabkernigen neutrophilen Granulozyten zu den Zeitpunkten acht und zwölf Stunden nach Kolostrumaufnahme lagen sogar über denen der Kontrollkälber (Bell et al. 2013). Die Erythrozytenzahlen und der Hämatokrit lagen zwar meist unterhalb der Werte der gesunden Kälber, jedoch lag kein signifikanter Unterschied vor (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012). In einer anderen Studie konnte nach Kolostrumaufnahme innerhalb der Lymphozytensubpopulationen ein Rückgang der CD25⁺, CD21⁺ und γ/δ TCR⁺ Zellen festgestellt werden (Laming et al. 2012). Die CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten zeigten keinen Rückgang der Zellzahl, im Vergleich zu den Kontrollkälbern stiegen die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen verhältnismäßig sogar stärker an (Laming et al. 2012).

Das Knochenmark der erkrankten Kälber aus den Kolostrumtränkeversuchen wies im Verlauf der Erkrankung charakteristischerweise eine zunehmende Depletion auf (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012). Vierundzwanzig Stunden nach der Kolostrumaufnahme waren histologisch noch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Kälbern erkennbar (Bell et al. 2013). Am sechsten Tag jedoch zeigten die BNP-Kälber eine reduzierte Dichte hämatopoetischer Zellen, die alle Zellreihen betraf (Bell et al. 2013). Die erythroide und myeloide Reihe wurden vor allem durch reife neutrophile und eosinophile Granulozyten und durch späte Normoblasten repräsentiert, frühe Zellstadien dieser beiden Zellreihen waren reduziert (Bell et al. 2013, Laming et al. 2012). Des Weiteren war die Zahl der Megakaryozyten in dieser Phase der Erkrankung schon deutlich vermindert und auch hier waren vor allem noch reife Stadien zu finden (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012). Zehn Tage nach der Kolostrumfütterung hatte die hämatopoetische Zelldichte weiter abgenommen und fünf von sieben Kälbern wiesen zu diesem Zeitpunkt mit einer Zelldichte von weniger als 25% eine trilineäre Hypoplasie des Knochenmarks auf (Bell et al. 2013, Laming et al. 2012). Auch die beiden anderen erkrankten Kälber zeigten eine fortschreitende Degeneration des Knochenmarks, jedoch lag die hämatopoetische Zellrate bei diesen mit 28% und 39% noch etwas höher (Bell et al. 2013). In einem *in vitro*

Experiment mit hämatopoetischen Vorläuferzellen der Versuchskälber wurde zudem nachgewiesen, dass es bei BNP-Kälbern bereits 24 Stunden post-kolostral zu einer funktionellen Beeinträchtigung der pluripotenten Vorläuferzellen kommt und nach sechs Tagen auch die Vorläuferzellen für Granulozyten und Makrophagen beeinträchtigt sind. Die Progenitorzellen für Erythrozyten entwickelten sich zu diesem Zeitpunkt gar nicht mehr (Laming et al. 2012).

Bei der Sektion konnten bei allen Kälbern, die durch das Kolostrum Symptome von BNP entwickelt hatten, Petechien nicht nur in der Maulschleimhaut, sondern auch in der Milzkapsel und im Gastrointestinaltrakt gefunden werden (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009). Die Kälber wiesen weiterhin Ekchymosen, Hämatome und diffuse Blutungen auf (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009). Thymus und Lymphknoten der erkrankten Tiere waren signifikant schwerer als die von Kontrollkälbern, wohingegen die Länge der Femurknochen bei den BNP-Kälbern signifikant kürzer war, was dafür spricht, dass diese in ihrem Wachstum zurückgeblieben waren (Bell et al. 2013).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte die Krankheit auch durch direkte Serumantikörper-Transfusion von BNP-Kühen induzieren (Foucras et al. 2011). Hierzu wurde IgG aus dem Serum von verschiedenen Kühen, die schon BNP-Kälber geboren hatten, präzipitiert und sechs gesunden Kälbern aus Beständen ohne BNP-Vorgeschichte infundiert (Foucras et al. 2011). Jedes Kalb erhielt zwei Liter der Antikörper-Lösung, entsprechend 100 – 150 g IgG, was in den Kälbern einen vergleichbaren Anstieg des Serum-IgGs bewirkte wie die Aufnahme von Erstkolostrum (Foucras et al. 2011). Zwei der Kälber starben bereits nach zwei Tagen aufgrund von transfusionsbedingten Nebenwirkungen (Atemnot und schwere Blutungen) (Foucras et al. 2011). Die restlichen Kälber entwickelten nach zehn Tagen klinische Symptome von BNP. Alle vier Kälber hatten petechiale Blutungen der Schleimhäute und drei Kälber zeigten blutigen Kot (Foucras et al. 2011). Das Blutbild wies einen signifikanten Abfall der Thrombo- und Leukozyten auf (Foucras et al. 2011). Die Zelldichte in Knochenmarkspunktaten war an Tag zehn signifikant niedriger als vor der IgG-Transfusion, wobei alle Zellarten außer eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen reduziert waren (Foucras et al. 2011). Zwei der Kälber mussten an Tag 15 und 17 aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden (Foucras et al. 2011). Die Sektion ergab Blutungen in Eingeweiden, Gelenken und Muskeln und das Knochenmark war massiv depletiert

und enthielt keine Megakaryozyten mehr (Foucras et al. 2011). Die beiden überlebenden Kälber erholten sich von der Krankheit und ihre Blutwerte und die Zusammensetzung des Knochenmarks normalisierten sich innerhalb eines Monats (Foucras et al. 2011).

Wie die BNP-Induktionsversuche zeigten, greifen die BNP-Antikörper Zellen in Blut und Knochenmark an. Deshalb wurde bei weiteren Versuchen das Bindungsverhalten von BNP-Antikörpern an verschiedene Zellen untersucht. Die Bindungsintensität der Immunglobuline aus Seren von BNP- und Kontrollkühen an Leukozyten von gesunden, neugeborenen Kälbern wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (Bridger et al. 2011). Dabei wurden die Leukozytenpopulationen der Lymphozyten und Monozyten gemeinsam getestet, die Granulozyten separat (Bridger et al. 2011). Es zeigte sich, dass BNP-IgG an die Lymphozyten- und Monozytenpopulation stärker als an die Granulozyten band (Bridger et al. 2011). Deshalb testeten die Autoren in einem weiteren durchflusszytometrischen Experiment die Bindungsstärke von kolostralem IgG an Lymphozyten und Monozyten von vier Kälbern, die kurz zuvor BNP-Kolostrum aufgenommen hatten (Bridger et al. 2011). Hierbei zeigte sich, dass der Prozentsatz von BNP-IgG gebundenen Zellen direkt nach Kolostrumaufnahme mit dem Ausmaß des späteren klinischen Bildes der BNP korreliert (Bridger et al. 2011). Bei einem Kalb waren sechs Stunden nach Kolostrumaufnahme 100% der Lymphozyten/Monozyten IgG⁺ und es verließen 90% IgG⁺ bis vier Tage danach. Dieses Tier entwickelte eine starke BNP-Symptomatik und starb nach 13 Tagen (Bridger et al. 2011). Ein weiteres Kalb wies am ersten Tag nach der Kolostrumaufnahme 95% IgG⁺-Lymphozyten/Monozyten auf, nach zwei Tagen nahm der Prozentsatz langsam ab. Das Kalb entwickelte nur milde Symptome einer BNP-Erkrankung und erholte sich wieder davon (Bridger et al. 2011). Bei zwei Zwillingskälbern war initial nur ein geringer Prozentsatz von Lymphozyten/Monozyten IgG⁺ (19 – 30%). Beide Kälber entwickelten nur kurzzeitig eine leichte Leukozytopenie, jedoch keine klinische BNP-Symptomatik (Bridger et al. 2011).

Das Bindungsverhalten von BNP-IgG an die einzelnen Leukozytenpopulationen konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe spezifiziert werden (Bastian et al. 2011). Es wurde bestätigt, dass Granulozyten (26%) von BNP-Antikörpern weniger stark gebunden werden als Lymphozyten und Monozyten. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass BNP-IgG an Monozyten (60%) wiederum weniger stark bindet als an

Lymphozyten (98%) (Bastian et al. 2011).

Weitere Experimente zeigten, dass BNP-Seren einen signifikant höheren Antikörpertiter aufweisen als Kontrollseren (Bastian et al. 2011, Bridger et al. 2011). Die Bindungsintensität von mehreren Kontrollseren und BNP-Überträgerseren wurde auf Lymphozyten und Monozyten von gesunden Kälbern getestet (Bastian et al. 2011). Als Kontrollseren wurden Seren von nicht BVD-geimpften Kühen, Seren von Kühen, die mit einem anderen Impfstoff als PregSure BVD immunisiert wurden, und zuletzt Seren von PregSure BVD-geimpften Kontrollkühen, die keine BNP-Kälber hervorgebracht hatten, verwendet (Bastian et al. 2011). Es wurde deutlich, dass nur die Seren von PregSure BVD immunisierten Tieren an die Kälberzellen banden wohingegen die Seren ungeimpfter bzw. anders BVD-geimpfter Tiere nicht an die Zellen banden (Bastian et al. 2011). Die BNP-Seren zeigten dabei wiederum eine signifikant ($p < 0,01$) höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf als die Seren PregSure BVD-geimpfter Kontrollkühe (Bastian et al. 2011).

Bei einem weiteren Versuch konnte nachgewiesen werden, dass BNP-Serum im Gegensatz zu ungeimpftem Kontrollserum, bei dem keine Bindung nachzuweisen war, deutlich an die zur Impfstoffherstellung verwendete bovine MDBK-Zelllinie bindet, was für eine Alloantikörperbildung aufgrund der Verunreinigung des Impfstoffs mit MDBK-Zellbestandteilen spricht (Bastian et al. 2011). An eine bovine Lungenzelllinie band BNP-IgG hingegen nur noch halb so stark und an Zelllinien von Hamster und Kaninchen gar nicht (Bastian et al. 2011). Das Bindungsmuster von geimpftem Kontrollserum auf MDBK-Zellen wurde hier nicht getestet (Bastian et al. 2011). Weitere Untersuchungen zum Bindungsverhalten von kolostralem BNP-IgG auf MDBK-Zellen zeigten starke Schwankungen beim Prozentsatz der von BNP-IgG gebundenen Zellen (Schumann 2011). Nicht nur zwischen den verschiedenen, sondern auch innerhalb der einzelnen getesteten BNP-Kolostren schwankte der Anteil der gebundenen Zellen bei wiederholten Färbungen teilweise um 55% (Schumann 2011). Von 14 getesteten BNP-Kolostren band das stärkste die MDBK-Zellen zu 66%, das schwächste nur zu 3% (Schumann 2011).

Immunzytologische Färbungen von Leukozyten und Thrombozyten gesunder Kälber ergaben, dass es sich bei den BNP-Antikörpern um den Isotyp IgG₁ handelt (Assad et al. 2012). Bei zusätzlichen Färbungen von Leukozyten und Thrombozyten gesunder Kühe konnte gezeigt werden, dass BNP-IgG₁ keinen Unterschied bei der Bindungsintensität zwischen juvenilen und maturen Blutzellen aufweist (Assad et al.

2012). Grundsätzliche Unterschiede im Zellbindungsmuster der BNP-Antikörper konnten jedoch auch hier nachgewiesen werden. Wie die immunzytologischen Färbungen zeigten, band BNP-IgG₁ an 100% der Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten, an einen Großteil der B- und der CD8⁺ T-Lymphozyten, jedoch nur an wenige CD4⁺ T-Lymphozyten (Assad et al. 2012). Dabei banden die Antikörper nicht nur an die Zelloberfläche, sondern auch intrazytoplasmatisch (Assad et al. 2012). Zusammenfassend zeigen die Versuche auf, dass die pathogenen BNP-Antikörper aus dem Blut von BNP-Überträgerkühen stammten und über das Kolostrum an die Kälber weitergegeben wurden (Bell et al. 2013, Foucras et al. 2011, Friedrich et al. 2009). In diesen Kälbern führte die Aufnahme der Antikörper zu einer Depletion hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark bis hin zur vollkommenen Knochenmarksaplasie sowie zu einer intravasalen Zerstörung von Thrombozyten und in unterschiedlichem Maße auch von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Assad et al. 2012, Bridger et al. 2011, Foucras et al. 2011). 80% der Kälber entwickelten nach Aufnahme von BNP-Kolostrum klinische Symptome und verstarben, nur bei einem geringen Teil traten ausschließlich subklinische Symptome auf (Bell et al. 2013, Friedrich et al. 2009, Laming et al. 2012, Schroter et al. 2011). Aufgrund der Beobachtung, dass die BNP-Kühe selbst die pathogenen Antikörper in ihrem Serum aufwiesen, jedoch keinerlei Symptome zeigten, entstand die Hypothese, dass die Kühe Proteinverunreinigungen im Impfstoff als fremd erkannten und dagegen Alloantikörper ausbildeten, da sie das Protein oder die Proteine selber nicht exprimieren (Assad et al. 2012, Bastian et al. 2011, Demasius et al. 2014, Deutskens et al. 2011, Euler et al. 2013). Da nur 5 – 10% der mit PregSure BVD geimpften Kühe mit der Produktion der hochtitrigen pathogenen Antikörper auf die Impfung reagierten, ist eine Hypothese, dass nur diese Kühe das BNP-auslösende Alloantigen oder ein Epitop davon nicht oder in anderer Form exprimieren und bei ihnen deshalb eine Immunreaktion dagegen stattfand (Bastian et al. 2011, Deutskens et al. 2011). Welche Rolle das neuartige Adjuvans Procision-A bei der Pathogenese der BNP spielte, ist bislang auch noch ungeklärt. Einige Autoren vermuten jedoch, dass die starke Reaktion der Kühe auf den Impfstoff nicht allein den zellulären Verunreinigungen im Impfstoff zuzuschreiben ist, sondern in Kombination mit dem hochpotenten Adjuvans entstand (Deutskens et al. 2011, Kasonta et al. 2012).

2.4 Untersuchungen zum BNP-auslösenden Alloantigen

Da alle Daten auf ein alloimmunes Krankheitsgeschehen hindeuteten, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Suche nach dem BNP-auslösenden Alloantigen.

Dabei postulierten zwei Arbeitsgruppen, dass MHC-I-Alloantikörper zu der BNP-Symptomatik führten (Deutskens et al. 2011, Foucras et al. 2011). Grund für diese Theorie war, dass MDBK-Zellen nach Immunpräzipitation mit zwölf BNP-Seren zwei deutliche Banden im Western Blot aufzeigten, eine bei 44 kDa und eine weitere bei 12 kDa (Deutskens et al. 2011). Zwei von vier Seren PregSure BVD-geimpfter Kontrollkühe (50%), die keine BNP-Kälber hervorgebracht hatten (geimpfte Kontrollkühe), zeigten ebenfalls Banden auf dieser Höhe, wohingegen nicht BVD-geimpfte Kühe oder mit einem anderem Impfstoff (Bovilis BVD/MD, Firma Intervet) gegen BVD geimpfte Kühe im Western Blot keine Reaktionen gegen die 44 und 12 kDa großen Proteine zeigten (Deutskens et al. 2011). Dies sprach nach Ansicht der Autoren dafür, dass im BNP-Serum Antikörper vorhanden sind, die Proteine mit diesen Molekulargewichten auf MDBK-Zellen spezifisch binden. Die beiden detektierten Proteine konnten später massenspektrometrisch identifiziert werden (Deutskens et al. 2011). Sechzehn identifizierte Peptide der 44 kDa-Bande stimmten zu 49,2% mit der Proteinsequenz von bovinem MHC-I überein. Aus der 12 kDa-Bande konnten nur zwei Peptide identifiziert werden, die die Sequenz von β_2 -Mikroglobulin, das mit MHC-I assoziiert ist, zu 15,3% abdeckten (Deutskens et al. 2011).

Da periphere Blutleukozyten (PBL) bei der BNP zerstört werden, wurde weiterhin getestet, ob BNP-Seren auch auf PBL an dieselben Proteine spezifisch binden wie auf den MDBK-Zellen (Deutskens et al. 2011). Hierzu wurden PBL einer BNP-Kuh, einer PregSure BVD-geimpften Kontrollkuh und eines BNP-verdächtigen Kalbes mit BNP-Serum immunpräzipitiert und die präzipitierten Proteine im Western Blot sichtbar gemacht (Deutskens et al. 2011). Es zeigte sich, dass das BNP-Serum auch hier Proteine mit einem Molekulargewicht von 44 kDa und 12 kDa auf PBL des BNP-verdächtigen Kalbes und der Kontrollkuh deutlich band, jedoch nur schwach auf PBL der eigenen BNP-Kuh (Deutskens et al. 2011). Ein Vergleichsansatz zur Reaktion von geimpftem Kontrollserum wurde dabei nicht beschrieben. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde dieser Versuch in abgewandelter Form durchgeführt (Foucras et al. 2011). Sie präzipitierten PBL von fünf BNP-Kälbern mit einem Kontrollserum unbekannter Herkunft und einem BNP-Serum (Foucras et al. 2011). Eine deutliche

Bande zwischen 40 – 45 kDa wurde im Western Blot bei von BNP-Serum präzipitierten PBL sichtbar, wohingegen das Kontrollserum dort keine Bande aufwies (Foucras et al. 2011). Die massenspektrometrische Untersuchung der assoziierten Gel-Bande auf dieser Höhe ergab eine Spezifität für MHCI und auch bei der Wiederholung des Western Blots mit anti MHCI-Antikörper wurde bei den mit BNP-Serum präzipitierten Kälber-PBL eine Bande auf der Höhe zwischen 40 – 45 kDa sichtbar (Foucras et al. 2011). Dabei wurden die unpräzipitierten Kälber-PBL als Positivkontrolle nicht mituntersucht, sodass kein Vergleich zur MHCI-Expression in unbehandelten Kälber-Leukozyten gezogen werden konnte.

Mit einem Inhibitionsversuch wollte die Gruppe um Foucras MHCI weiter bestätigen, indem sie Kälber-PBL und MDBK-Zellen mit BNP-Seren oder geimpften Kontrollseren präinkubierten und anschließend die prozentuale Bindung der Zellen durch einen gegen die monomorphe MHCI-Determinante gerichteten Antikörper (W6/32) testeten (Foucras et al. 2011). Nach Inkubation mit BNP-IgG wiesen die Zellen eine geringere MHCI-Bindung auf als nach Inkubation mit Kontroll-IgG (Foucras et al. 2011). Dies wurde als Indiz dafür gewertet, dass die BNP-Antikörper an ein Epitop von MHCI binden und die Bindung des nachfolgenden MHCI-Antikörpers deshalb teilweise blockieren (Foucras et al. 2011).

In einem weiteren Versuch testete die Gruppe, in welchem Maße sich das Bindungsverhalten von BNP-IgG und anti MHCI-Antikörpern an MDBK-Zellen nach Gen-Silencing von β_2 -Mikroglobulin ändert (Foucras et al. 2011). Im Vergleich zu unbehandelten MDBK-Zellen wiesen BNP-IgG und MHCI-Antikörper (W6/32, gegen die monomorphe Determinante des humanen 45 kDa großen MHCI-Epitops gerichtet) eine ähnlich reduzierte Bindung an MDBK-Zellen nach zwölfstündigem Silencing von β_2 -Mikroglobulin auf (Foucras et al. 2011). Dies veranlasste die Autoren zu der Vermutung, dass ein Großteil der Antikörper im BNP-Serum gegen den MHCI- β_2 -Mikroglobulin Komplex gerichtet sind (Foucras et al. 2011). Daten zum veränderten Bindungsvermögen von PregSure BVD-geimpften Kontroll-IgG lagen hier nicht vor, sodass anhand dieser Versuche nicht festgestellt werden konnte wie sich die Bindung von Kontrollserum nach Gen-Silencing von β_2 -Mikroglobulin geändert hätte.

Da MHCI nicht nur im Proteinrepertoire von MDBK-Zellen, sondern auch im Impfstoff Pregsure BVD selbst vorkommen musste, um als BNP-auslösendes Antigen in Frage zu kommen, stellten die Autoren weitere Untersuchungen zum Vorkommen von

MHCI in PregSure BVD an (Deutskens et al. 2011, Foucras et al. 2011). Die Antigenfraktion des Impfstoffs wurde im Western Blot geladen und MHCI konnte mittels eines gegen die monomorphe Determinante von bovinem MHCI gerichteten Antikörpers (IL-A88) im Impfstoff identifiziert werden (Deutskens et al. 2011, Foucras et al. 2011). Auch unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Zusammensetzung von PregSure BVD im Vergleich zum Proteinrepertoire von MDBK-Zellen, wobei hier als Kontrolle noch ein weiterer BVD-Impfstoff, die Lebendvakzine Vacoviron FS, mitgetestet wurde (Euler et al. 2013). Während in Vacoviron FS nur 43 Proteine identifiziert werden konnten, wurden in PregSure BVD 159 und in MDBK-Zellen 163 Proteine detektiert, von denen 25 Proteine miteinander übereinstimmten (Euler et al. 2013). Unter diesen waren mehrere Proteine mit immunmodulatorischen und Gerinnungs-assoziierten Funktionen wie Komplementfaktor C4 und Thrombospondin zu finden, auch MHCI konnte gering abundant identifiziert werden (Euler et al. 2013). Aufgrund der erhobenen Daten wurde von einer der MHCI-Alloantigenreaktion postulierenden Arbeitsgruppen folgendes Modell zur Pathogenese der BNP, basierend auf einer genetischen MHCI-Varianz in der Kuhpopulation aufgestellt (Deutskens et al. 2011). Entspricht der MHCI-Phänotyp des geimpften Muttertieres dem in PregSure BVD vorhandenen MHCI-Phänotyp, so kommt es nicht zu einer Alloantikörper-Produktion (= Reaktion geimpfter Kontrolltiere). Unterscheiden sich die beiden Phänotypen jedoch, so kommt es zur Bildung der pathogenen BNP-Antikörper (BNP-Überträger und manche geimpfte Kontrolltiere). Ob es nun im Kalb zu einer Ausbildung klinischer BNP kommt, ist abhängig vom MHCI-Phänotyp des Kalbes. Trifft der maternale Antikörper im Kalb auf ein MHCI-Molekül, das dem MHCI-Phänotyp in PregSure BVD entspricht und dessen Gen es vom Vater erhalten haben muss, so kommt es zur Entstehung von BNP. Exprimiert das Kalb dagegen einen anderen als den im Impfstoff vorhandenen MHCI-Phänotyp, so kommt es nicht zur BNP (Deutskens et al. 2011).

Die Arbeitsgruppe, die diese These formulierte, wiederholte später nochmals einige der Versuche, die zur Postulierung von MHCI als BNP-auslösendes Alloantigen geführt hatten (Deutskens 2012). Dabei ergaben sich einige neue Erkenntnisse, die mit der MHCI-Theorie nicht mehr übereinstimmten (Deutskens 2012). So reagierten nach Immunpräzipitation von MDBK-Zellen mit Seren von BNP-Kühen und PregSure BVD-geimpften Kontrollkühen diesmal nicht nur alle BNP-Seren auf Höhe 44 kDa im Western Blot, sondern ausnahmslos auch alle Kontrollseren (Deutskens 2012).

Darüber hinaus wurde in diesem Versuch diesmal noch eine weitere Kontrollgruppe hinzugezogen, nämlich Seren von Tieren, die mit dem BVD-Impfstoff Bovidec (Firma Novartis) immunisiert worden waren (Deutskens 2012). Fünf von acht dieser Seren zeigten ebenfalls schwache bis sehr deutliche Banden auf Höhe 44 kDa nach Immunpräzipitation mit MDBK-Zellen (Deutskens 2012).

Da die BNP-auslösenden Alloantikörper über das Kolostrum übertragen wurden, präzipitierte man MDBK-Zellen nochmals mit kolostralen Antikörpern von vier BNP-Kolostren, vier Kontrollkolostren PregSure BVD-geimpfter Kühe und zwei Kolostren BVD-ungeimpfter Kühe (Deutskens 2012). Hier zeigte sich ebenfalls sowohl bei geimpften Kontrollkolostren als auch bei Überträgerkolostren, dass sie beide spezifisch Proteine auf MDBK-Zellen mit einem Molekulargewicht von 44 kDa und 12 kDa banden (Deutskens 2012). Dies war bei den Kolostren nicht PregSure BVD-geimpfter Kühe nicht der Fall (Deutskens 2012).

Auch die wiederholte Präzipitation boviner Leukozyten von geimpften Kontrollkühen und BNP-Kühen mit BNP-Serum widersprach dem veröffentlichten Versuch aus dem Vorjahr. Das BNP-Serum präzipitierte nicht nur bei drei von vier Kontrolltieren, sondern auch bei zwei von drei BNP-Tieren ein Protein auf der Höhe von 44 kDa. Somit konnten in diesem Versuch keine Unterschiede mehr in der Bindung von BNP-Serum an MHCI von Kontroll- und Überträger-PBL nachgewiesen werden (Deutskens 2012).

Zusammenfassend zeigen die wiederholten Versuche dieser MHCI-Alloantigenreaktion postulierenden Arbeitsgruppe auf, dass die Unterschiede aus den 2011 veröffentlichten Versuchen bei weiterführenden Untersuchungen nicht bestätigt und nun keine Unterschiede in der Bindungsspezifität mehr nachgewiesen werden konnten (Deutskens 2012). Das Erscheinen der 44 kDa-Banden war keinesfalls darauf zurückzuführen, dass BNP-IgG auf MDBK-Zellen oder PBL ein Protein spezifisch band, sondern, dass alle mit PregSure BVD geimpften Tiere, auch die nicht-BNP-Überträger sowie einige mit Bovidec geimpften Tiere, dies tun. Dieser Umstand spricht also eher für eine allgemeine Impf-assoziierte oder andersartige Reaktion der Ausbildung von MHCI-Antikörpern gegen das bovine Leukozyten Antigen (BoLA = MHCI und II) nach Impfung mit bestimmten Vakzinen.

Bei Kühen ist das Auftreten von Antikörpern gegen MHCI während und nach der Trächtigkeit zudem ein bekanntes Phänomen. Sie entstehen durch eine Immunisierung des Muttertieres mit paternalen Leukozytenantigenen (Bell et al.

2013, Newman and Hines 1980). Das Vorhandensein von anti-MHCI-Alloantikörpern im Serum von Kühen ist also physiologisch und ihr Auffinden deutet ohne Erbringen eines funktionellen Beweises nicht zwangsläufig auf eine pathologische Immunreaktion hin.

Auch einige andere Autoren brachten Argumente gegen MHCI als pathogenetisch entscheidendes Antigen für die BNP vor (Assad et al. 2012, Demasius et al. 2014, Euler 2013, Kasonta et al. 2012). Die Tatsache, dass BNP-IgG bei PBL von fast allen getesteten Tieren an Banden auf Höhe von MHCI und von β_2 -Mikroglobulin band (Deutskens 2012), passte nicht zu der niedrigen Inzidenz von BNP (Kasonta et al. 2012).

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt, der gegen die MHCI-Theorie angebracht werden kann, ist der Fakt, dass MHCI von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert wird (Agrawal and Kishore 2000). Wenn die Alloantikörper also gegen MHCI gerichtet sind, stellt sich die Frage, warum sie mit dem Kolostrum durch MHCI-exprimierende Gewebe wie das Darmendothel der Kälber wandern konnten ohne Schäden zu hinterlassen (Deutskens 2012) und dann sogar noch weiter bis ins Knochenmark vorstoßen konnten (Kasonta et al. 2012). Es wäre zu erwarten gewesen, dass die MHCI-Antikörper nicht nur gegen Blutzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen gerichtet sind, sondern dass sie auch vorher schon an andere MHCI-exprimierende Zellen binden und diese schädigen (Laming et al. 2012).

Auch die Bindungsversuche verschiedener Autoren von BNP-IgG an verschiedene Leukozytenpopulationen von Kälber- und Kuh-PBL zeigten, dass nie alle Populationen zu 100% von BNP-IgG gebunden werden (Assad et al. 2012, Bastian et al. 2011, Bridger et al. 2011). Sogar bei den Versuchen zum Bindungsverhalten von kolostralem BNP-IgG an verschiedene bovine Nierenzelllinien (BK-KL3A- und MDBK-Zellen) zeigten sich extreme Schwankungen beim prozentualen Anteil der von BNP-IgG gebundenen Zellen (Schumann 2011). Wegen der genetischen Homogenität der Zelllinien sollten alle Zellen MHCI gleichmäßig exprimieren und kaum Schwankungen in der Bindung von BNP-PBL auftreten (Schumann 2011). Der Anteil der gebundenen Zellen schwankte jedoch nicht nur zwischen den verschiedenen getesteten Seren, sondern auch innerhalb der einzelnen getesteten BNP-Kolostren bei wiederholten Färbungen teilweise um 55% (Schumann 2011). Von 14 in diesen Experimenten getesteten BNP-Kolostren, band ein BNP-Kolostrum mit durchschnittlich 66% den höchsten Prozentsatz an MDBK-Zellen, ein anderes

den niedrigsten mit nur 3% gebundener MDBK-Zellen (Schumann 2011). Diese Werte stehen in starkem Kontrast zur Spezifität von BNP-IgG für MHCI-Alloantikörper.

In einer Versuchstierherde des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf kam es trotz gleichen Impfmanagements und gleicher Umweltbedingungen zu einem gehäuften Aufkommen von BNP-Fällen in einer F2-Generation von Kälbern, die alle vom gleichen F1-Bullen (Charolais – Deutsch Holstein Kreuzung) abstammten (Demasius et al. 2014, Krappmann et al. 2011). Untersuchungen dazu stützen die aufgebrachte These einer genetischen Prädisposition für klinische BNP (Demasius et al. 2014, Krappmann et al. 2011). Da es sich bei der MHCI-Region jedoch um eine der am meisten polymorphen Genregionen bei Rindern handelt (Babiuk et al. 2007), ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein derartig hoher Prozentsatz der BNP-Kälber innerhalb einer kleinen Rinderpopulation das oder die gleichen MHCI-Allel(e) aufwies wie die MDBK-Zelllinie (Demasius et al. 2014). Somit konnte nach dem Ausschluss von Mutationen im Koagulationsfaktor XI-Gen (Krappmann et al. 2011) und diversen MHCII-Allelen (Ballingall et al. 2011) als genetisch prädisponierende Faktoren für BNP also auch kein Beweis für ein genetisch prädisponierendes MHCI-Allel gefunden werden (Demasius et al. 2014).

Die transfusionsassoziierte akute Lungenschädigung (TRALI) beim Menschen wurde von einigen Autoren als Beispiel dargestellt, dass das Vorhandensein von MHCI-Alloantikörpern bei einer Krankheit das Vorhandensein von stärker pathogenen Antikörpern verschleiern kann (Euler et al. 2013, Greinacher et al. 2010). Bei TRALI kommt es innerhalb von sechs Stunden nach Bluttransfusion zu einem akuten Lungenödem verursacht durch große Mengen von Antikörpern aus dem Spenderblut (Greinacher et al. 2010). Bei 73% der Fälle von TRALI konnten MHCI-Antikörper nachgewiesen werden, die jedoch nicht das ernste klinische Bild auslösen, sondern wohl nur schwach pathogen sind (Reil et al. 2008). Wie in den vergangenen Jahren entdeckt wurde, sind dafür vielmehr Antikörper gegen das humane neutrophile Antigen (HNA) 3a verantwortlich (Greinacher et al. 2010). Menschen, die HNA-3a nicht auf ihren neutrophilen Granulozyten exprimieren und zum Beispiel durch eine Schwangerschaft in Kontakt mit fremdem Blut, das HNA-3a enthält, kommen, produzieren Antikörper dagegen. Wird Plasma dieser Personen später anderen Menschen mit HNA-3a exprimierenden Granulozyten transfundiert, so kommt es zum Auftreten von TRALI (Greinacher et al. 2010). Die Identifizierung dieses potenten

Alloantigens beim Menschen war jedoch technisch sehr schwierig und extrem langwierig, da es durch die bei TRALI gleichzeitig auftretende Immunreaktion der Patienten mit hochabundanten Antikörpern gegen MHC I verschleiert wurde (Reil et al. 2008).

Ein Zusammenhang zwischen MHC I-Alloantikörpern und der BNP konnte bisher nicht bewiesen werden, wie auch manche der ursprünglich MHC I-postulierenden Autoren einräumten (Deutskens 2012). Es kann sicher gesagt werden, dass es sich bei der BNP um ein Vakzine-induziertes Problem nach Impfung mit PregSure BVD handelt, wobei nur 5 - 10% PregSure BVD-geimpfter Kühe BNP-auslösende Antikörper produzierten (Bastian et al. 2011). In Tränkeversuchen wurde bewiesen, dass die pathogenen Antikörper mittels Kolostrum in die Kälber gelangten (Friedrich et al. 2009). Die Antikörper zirkulieren nachweislich auch im Blut der Kühe (Foucras et al. 2011), führen dort aber zu keinerlei Symptomen. Bei fast allen Kälbern banden die Antikörper an 100% der Thrombozyten, unterschiedlich stark an Subpopulationen von Leukozyten und an hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark (Bell et al. 2013, Bridger et al. 2011). An bovine Zelllinien band BNP-IgG nicht nur von verschiedenen Spendertieren extrem unterschiedlich, sondern auch die prozentuale Bindung von BNP-IgG eines Spendertieres zeigte eine starke Interassay Varianz (Schumann 2011). Das spricht für eine deutlich unterschiedliche Expression des BNP-Antigens auf den Zielzellen durch eine entsprechende Regulation (Euler 2013). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das Zielantigen der pathogenen BNP-Antikörper weiterhin nicht identifiziert und damit auch die genaue Pathogenese ungeklärt ist. Ob die Krankheit allein auf eine Alloantikörperproduktion wegen einer Kontamination des Impfstoffes mit Zellbestandteilen aus der MDBK-Zelllinie oder auch auf eine abweichende Immunreaktion der BNP-Kühe auf die Impfung mit PregSure BVD zurückzuführen ist, bleibt dabei ebenfalls noch ungeklärt. Unsere Arbeitsgruppe präsentierte mit Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Filamin A und Thrombospondin-1 drei weitere mögliche Antigenkandidaten (Euler 2013). Sie stammen aus einer Reihe proteomischer Experimente, in denen sie spezifisch von BNP-IgG, nicht jedoch von geimpftem Kontroll-IgG bei Thrombozyten und Leukozyten gesunder Kälber sowie bei MDBK-Zellen identifiziert wurden (Euler 2013). Auf diese Weise konnten insgesamt 34 Proteine identifiziert werden, die als potentielle Antigene in Frage kamen. Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Filamin A und Thrombospondin-1 konnten letztlich auch in PregSure BVD nachgewiesen werden,

was als zwingendes Kriterium für ein Kandidaten-Antigen galt (Euler 2013). Die weitere Verifikation dieser drei Proteine als mögliche BNP-Alloantigene war Ausgangspunkt dieser Arbeit.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Puffer und Lösungen

3.1.1 Puffer und Lösungen zur Lymphozytenaufbereitung

Heparinlösung zur Gerinnungshemmung (2.500 I.E./ml)

Heparin-Natrium ¹ (25.000 I.E./ml)	1,00 ml
RPMI 1640 Medium mit Glutamin ²	9,00 ml

Trennlösung zur Isolierung von PBL mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung³ (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl ⁴ (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH ₂ PO ₄ (1,4 mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1 mM)	1,45 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Lysepuffer

Harnstoff ⁵ (9 M)	27,00 g
Thioharnstoff ⁶ (2 M)	7,60 g
CHAPS ⁶ (4%)	2,00 g
DTT ⁷ (65 mM)	0,50 g

in 50 ml Aqua bidest. lösen.

Alle Zutaten bei Raumtemperatur (RT) mindestens fünf Stunden rühren, bis alles gelöst ist. Anschließend zu je 1ml aliquotieren und bei -20°C lagern. Direkt vor Gebrauch 100 µl Aqua bidest. pro 1 ml Lysepuffer zusetzen.

¹ Ratiopharm, Ulm

² Gibco Life Technologies, Karlsruhe

³ Pan Biotech, Aidenbach

⁴ Alle nicht extra markierten Chemikalien: AppliChem, Darmstadt

⁵ GE Healthcare, Freiburg

⁶ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁷ Serva, Heidelberg

3.1.2 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford Reagenz

Bradford Reagenz⁸, gebrauchsfertig.

Bovines Serum Albumin (BSA)-Stammlösung

BSA 40,00 mg

in 10 ml Aqua dest. Lösen.

Zu je 1 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

Salzsäure 1 M

Salzsäure 1 M, gebrauchsfertig.

3.1.3 Puffer und Lösungen für die 1D Gelelektrophorese

Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung 33%⁹, gebrauchsfertig.

Bromphenolblau-Lösung

Eine Messerspitze Bromphenolblau-Pulver⁸ in Aqua bidest. lösen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10%

APS (10%) 0,10 g

in 1 ml Aqua bidest. lösen.

TEMED-Lösung

N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), gebrauchsfertig.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10%

SDS (35 mM) 10,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

⁸ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁹ Serva, Heidelberg

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20%

SDS (70 mM) 20,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei Raumtemperatur lagern.

Gelpuffer, pH 8,8

Tris (1,5 M) 18,15 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

pH 8,8 auf einstellen.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris (0,5 M) 6,00 g

in 100 ml Aqua bidest. lösen.

pH auf 6,8 einstellen.

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris (120 mM) 15,00 g

Glycin¹⁰ (960 mM) 72,00 g

SDS (0,05%) 5,00 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen und pH auf 8,3 einstellen.

Die Stammlösung wird für die Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

5x Lämmli-puffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (250 mM) 8,33 ml

20% SDS-Lösung (5%) 12,50 ml

Glycerin, wasserfrei (50%) 25,00 ml

500 mM 2-Mercaptoethanol¹¹ 1,75 ml

ad 50 ml Aqua bidest. und eine Messerspitze Bromphenolblau¹¹-Pulver hinzufügen.

Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

¹⁰ Biomol, Hamburg

¹¹ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Abdichtgel

Aqua bidest.	400,00 µl
33% Acrylamid-Lösung ¹²	200,00 µl
10% APS-Lösung	20,00 µl
TEMED-Lösung	2,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Laufgel (10% SDS Gel)

Aqua bidest.	4,20 ml
Gelpuffer, pH 8,8	2,50 ml
33% Acrylamid-Lösung ¹²	3,30 ml
10% SDS-Lösung	100,00 µl
10% APS-Lösung	50,00 µl
TEMED-Lösung	20,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Sammelgel (4% SDS Gel)

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	2,50 ml
33% Acrylamid-Lösung ¹²	1,33 ml
10% SDS-Lösung	100,00 µl
Bromphenolblau-Lösung	100,00 µl
10% APS-Lösung	90,00 µl
TEMED-Lösung	30,00 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

2-Propanol

2-Propanol (Isopropanol), gebrauchsfertig.

¹² Serva, Heidelberg

3.1.4 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris	36,33 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Anodenpuffer II 25 mM, pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris	3,03 g
e-Aminocaprinsäure	5,25 g
Methanol, reinst	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S ¹³ (0,2%)	0,20 g
Trichloressigsäure ¹³ (3%)	3,00 g
in 100 ml Aqua bidest. lösen.	

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20 (0,05%)	0,50 ml
ad 1000 ml PBS.	

1% Polyvinylpyrrolidone-Tween Lösung (PVP-T), pH 7,2

Polyvinylpyrrolidone (PVP40) ¹³ (1%)	1,00 g
in 100 ml PBS-T lösen.	

¹³ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

ECL (Enhanced-Chemilumineszenz)-Lösung A

Tris (0,1 M)	2,42 g
Luminol ¹⁴	50,00 mg

in 200 ml Aqua bidest. lösen, pH auf 8,6 einstellen.

Lagerung bei 4°C.

ECL-Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure ¹⁴	0,11 g
---	--------

in 100 ml DMSO lösen.

Dunkel und bei RT lagern.

H₂O₂

H₂O₂ 30%¹⁵, gebrauchsfertig.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis

gemischt:

Lösung A	1,00 ml
Lösung B	0,10 ml
30% H ₂ O ₂	3,00 µl

¹⁴ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

¹⁵ Merck Millipore, Darmstadt

3.1.5 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA	5,00 g
Natriumazid (10%)	0,50 ml
ad 500 ml PBS.	
Bei 4°C lagern.	

Natriumhydrogencarbonat Puffer

NaHCO ₃ (0,1 M)	42,00 g
in 5 l Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 8,0 einstellen.	

Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) Lösung

FITC ¹⁶	1,00 mg
In 1 ml DMSO lösen.	
Lichtgeschützt und direkt vor Gebrauch anmachen.	

Dialysepuffer

PBS, pH 7,2

Glycerin

Glycerin 98%, gebrauchsfertig.

¹⁶ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.6 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI¹⁷, gebrauchsfertig.

Waschpuffer

PBS-T

Blockierlösung

PBS-T

+ 1% BSA

3.1.7 Lösungen für die Zellstimulierung

RPMI Medium (10/1)

RPMI 1640 Medium mit Glutamin¹⁸

+ 1% Penicillin/Streptomycin¹⁹ (Pen/Strep)

+ 10% fötales Kälberserum¹⁹ (FCS)

[³H]-Thymidin-Lösung (0,05 mCi/ml)

[Methyl-³H] Thymidin²⁰ (1.0 mCi/ml)

0,50 ml

ad 10 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamin¹⁸.

¹⁷ Invitrogen, Karlsruhe

¹⁸ Gibco Life Technologies, Karlsruhe

¹⁹ Biochrom, Berlin

²⁰ Perkin Elmer, Hamburg

3.1.8 Puffer und Lösungen zur Anreicherung von Oberflächenproteinen und zur Zellfraktionierung

PBS mit CaCl₂/MgCl₂ pH 6,7

1 M CaCl ₂ (1 mM)	1,00 ml
1 M MgCl ₂ (0,5 mM)	0,50 ml
ad 1 l PBS.	
pH auf 6,7 einstellen.	

Biotinylierungsreagenz

0,5 M Natriummetaperiodat ²¹ (1 mM)	10,00 µl
19,4 mM Aminooxy-Biotin ²¹ (500 µM)	129,00 µl
10,9 M Anilin ²² (10 mM)	4,60 µl
ad 5 ml eiskaltes PBS mit 1 mM CaCl ₂ und 0,5 mM MgCl ₂ pH 6,7.	

Glycerol

Glycerol (100 mM)	9,21 mg
in 1 ml HPLC-Wasser ²³ lösen.	

PBS mit CaCl₂/MgCl₂ pH 7,4

1 M CaCl ₂ (1 mM)	1,00 ml
1 M MgCl ₂ (0,5 mM)	0,50 ml
ad 1 l PBS.	
pH auf 7,4 einstellen.	

Lysepuffer

Nonidet P-40 ²⁴ (1%)	50,0 µl
5 M NaCl (10 mM)	10,0 µl
1 M Tris-HCl pH 7,6 (10 mM)	50,0 µl
ad 5 ml HPLC-Wasser ²³ .	

²¹ Gentaur, Aachen

²² Sigma-Aldrich, Taufkirchen

²³ Merck Millipore, Darmstadt

²⁴ Roche, Penzberg

Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4

Tris (30 mM)	3,60 g
NaCl (150 mM)	8,80 g
in 1000 ml Aqua dest. lösen.	

Strep-Tactin Superflow Beads²⁵

Waschpuffer

TBS pH 7,4
+ 0,2% Nonidet P-40²⁶

TBS mit SDS

TBS pH 7,4
+ 0,5% SDS

TBS mit SDS/DTT

TBS pH 7,4
+ 0,5% SDS
+ 100 mM DTT²⁷

UC-Puffer

Harnstoff ²⁸ (6 M)	10,81 g
1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM)	3,00 ml
ad 30 ml HPLC-Wasser ²⁹ .	

UC-Puffer mit Jodacetamid

50 mM 2-Jodacetamid ²⁸	9,25 mg
in 1 ml UC-Puffer lösen.	

²⁵ IBA, Göttingen

²⁶ Roche, Penzberg

²⁷ Serva, Heidelberg

²⁸ GE Healthcare, Freiburg

²⁹ Merck Millipore, Darmstadt

5 M NaCl

NaCl 29,22 g
 in 100 ml HPLC-Wasser³⁰ lösen.

100 mM Na₂CO₃

Na₂CO₃ 1,06 g
 in 10 ml HPLC-Wasser³⁰ lösen.

50 mM Tris-HCl pH 8,5

1 M Tris-HCl (50 mM) 0,50 ml
 ad 10 ml HPLC-Wasser³⁰.

Trypsin

Trypsin³¹ (0,5 mg/ml) 20,00 µg
 in 40 µl HPLC-Wasser³⁰ lösen.

0,5% Trifluoressigsäure (TFA)

Trifluoressigsäure³² 15,00 µl
 ad 3 ml HPLC-Wasser³⁰.

10x G7-Puffer pH 7,5

Na₂HPO₄ (500 mM) 889,95 mg
 in 10 ml HPLC-Wasser³⁰ lösen.
 Die Stammlösung wird vor Gebrauch 1:10 mit HPLC-Wasser³⁰ verdünnt.

PNGase F³³ (500.000 U/ml)

Low Salt Puffer

5 M NaCl (10 mM) 10,00 µl
 1 M Tris-HCl pH 7,6 (10 mM) 50,00 µl
 ad 5 ml HPLC-Wasser³⁰.

³⁰ Merck Millipore, Darmstadt

³¹ Promega, Mannheim

³² Sigma-Aldrich, Taufkirchen

³³ New England Biolabs, Frankfurt/Main

High Salt Puffer

5 M NaCl (500 mM)	500,00 µl
1 M Tris-HCl pH 7,6 (10 mM)	50,00 µl
ad 5 ml HPLC-Wasser ³⁴ .	

High Salt T-Puffer

Triton X-100 (1%)	50,00 µl
5 M NaCl (500 mM)	500,00 µl
1 M Tris-HCl pH 7,6 (10 mM)	50,00 µl
ad 5 ml HPLC-Wasser ³⁴ .	

3.1.9 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau

Ammoniumbicarbonat (ABC)-Puffer

ABC (50 mM)	3,95 mg
in 1000 µl HPLC-Wasser ³⁴ lösen.	

100 mM DTT

DTT ³⁵ (100 mM)	15,42 mg
in 1000 µl HPLC-Wasser ³⁴ lösen.	

UA-Puffer

Harnstoff ³⁶ (8 M)	14,41 g
1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM)	3,00 ml
ad 30 ml HPLC-Wasser ³⁴ .	

300 mM Jodacetamid

2-Jodacetamid ³⁶ (300 mM)	55,48 mg
in 1000 µl HPLC-Wasser ³⁴ lösen, dunkel lagern.	

³⁴ Merck Millipore, Darmstadt

³⁵ Serva, Heidelberg

³⁶ GE Healthcare, Freiburg

Lys-C

Lysyl Endopeptidase³⁷ (0,2 mg/ml) 20,00 µg
in 100 µl HPLC-Wasser³⁸ lösen.

Trypsin

Trypsin³⁹ (0,5 mg/ml) 20,00 µg
in 40 µl HPLC-Wasser³⁸ lösen.

ABC-Puffer mit 2% Acetonitril (ACN)

ABC-Puffer
+ 2% Acetonitril⁴⁰

0,5% TFA

Trifluoressigsäure⁴⁰ 15,00 µl
ad 3 ml HPLC-Wasser³⁸.

³⁷ Wako, Neuss

³⁸ Merck Millipore, Darmstadt

³⁹ Promega, Mannheim

⁴⁰ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.10 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse

Matrix

α -Cyano-4-Hydroxymizimtsäure ⁴¹	2,50 mg
Acetonitril ⁴² (70%)	700,00 μ l
Trifluoressigsäure ⁴² (0,1%)	1,00 μ l
ad 1000 μ l HPLC-Wasser ⁴³ .	

Puffer A

Acetonitril ⁴² (2%)	20,00 ml
Ameisensäure ⁴² (0,1%)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser ⁴³ .	

Puffer B

Acetonitril ⁴² (98%)	980,00 ml
Ameisensäure ⁴² (0,1%)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser ⁴³ .	

⁴¹ Bruker Daltonics, Bremen

⁴² Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁴³ Merck Millipore, Darmstadt

3.2 Probenmaterial

In dieser Arbeit wurden Proben von 25 gesunden Kontrollkühen sowie 12 BNP-Überträgerkühen untersucht. Alle BNP-Kühe sowie 13 der Kontrollkühe stammten aus einem bayerischen Milchviehbetrieb und wurden mindestens zweimal mit PregSure BVD geimpft. Die BNP-Kühe hatten ein oder mehrere BNP-Kälber geboren, bei denen die charakteristischen Symptome von Hämorrhagien, Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Knochenmarksdepletion (Friedrich et al. 2009, Pardon et al. 2010, Sauter-Louis et al. 2012) festgestellt werden konnten. Die Proben der anderen 13 Kühe aus diesem Betrieb wurden als PregSure BVD-geimpfte Kontrollproben eingesetzt. Somit lagen bei allen PregSure BVD-geimpften Kühen (Kontrollkühe und Überträgerkühe) die gleichen Umweltbedingungen sowie das gleiche Impf- und Kälbermanagement vor. Dies ließ eine sehr gute Vergleichbarkeit der Proben zu. Weitere Kontrollkühe standen uns im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim zur Blutentnahme zur Verfügung, deren Proben als PregSure BVD-ungeimpfte Vergleichsproben und zur Etablierung von Methoden verwendet wurden. Von allen aufgeführten Tieren wurden periphere Blutleukozyten (PBL) und Serum aus Vollblut präpariert. Des Weiteren wurde Erstkolostrum von zehn BNP-Überträgerkühen und zehn geimpften Kontrolltieren aus dem genannten bayerischen Milchviehbetrieb getestet, das uns von den Besitzern der Tiere zur Verfügung gestellt wurde. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung klinisch gesund. Die Blutprobenentnahme von Rindern wurde bei der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2532.3-22-12 angezeigt.

Blutleukozyten, Serum und Kolostrum der Rinder wurden in verschiedenen Experimenten eingesetzt. In den einzelnen Experimenten wurde insgesamt die folgende Anzahl an Kühen und Proben untersucht:

Western Blots zu Alloantigenkandidaten:

- Kolostrum und Serum von 10 geimpften Kontrollkühen und 10 BNP-Überträgerkühen

Durchflusszytometrie zu BNP-IgG auf PBL:

- PBL von 5 geimpften Kontrollkühen und 5 BNP-Überträgerkühen
- Serum von 5 BNP-Überträgerkühen

Immunzytologie:

- PBL von 5 geimpften Kontrollkühen und 5 BNP-Überträgerkühen
- Kolostrum von 5 BNP-Überträgerkühen

Durchflusszytometrie zu CD61, CD43, CD29, CD5:

- PBL von 5 geimpften Kontrollkühen und 5 BNP-Überträgerkühen

Western Blots zu CD5:

- PBL von 4 geimpften Kontrollkühen und 5 BNP-Überträgerkühen

Polyklonale Zellproliferation:

- PBL von 4 geimpften Kontrollkühen und 4 BNP-Überträgerkühen

Zellfraktionierung und Proteomik:

- PBL von 2 geimpften Kontrollkühen und 2 BNP-Überträgerkühen

Western Blots zu TLR2 und Galectin 3:

- PBL von 3 Kontrollkühen und 3 BNP-Überträgerkühen

Zellproliferation mit TLR-Agonisten:

- PBL von 4 geimpften Kontrollkühen und 4 BNP-Überträgerkühen

Western Blots zu T-bet und GATA3:

- PBL von 3 Kontrollkühen und 3 BNP-Überträgerkühen

3.2.1 Gewinnung der Blutproben

Den Rindern wurde nach Desinfektion der Injektionsstelle je nach Bedarf zwischen 10 – 200 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen. Sollten aus dem gewonnenen Blut PBL präpariert werden, wurden zur Gerinnungshemmung pro 10 ml Blut je 200 µl Heparinlösung (2.500 I.E./ml) zugegeben. Zur Gewinnung von Serum wurde es in Serumprobenröhrchen⁴⁴ abgefüllt.

3.2.2 Gewinnung von Serum

Die Serumröhrchen wurden bei Raumtemperatur circa eine Stunde aufgestellt. Anschließend wurden sie bei 290 rcf für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

⁴⁴ Sarstedt, Nürnbergrecht

3.2.3 Gewinnung der peripheren Blutleukozyten mittels

Dichtegradientenzentrifugation

Die Blutproben wurden im Verhältnis 1:2 mit PBS (Raumtemperatur) verdünnt. Mit einer Pipette wurden 5 ml dieser Blutverdünnung in einem 15 ml Röhrchen⁴⁵ auf 3 ml Pancoll Trennlösung⁴⁶ geschichtet und bei 23°C für 30 min zentrifugiert (290 rcf, Bremse ausgeschaltet). Die dadurch zwischen Plasma und Pancoll entstandene, Leukozyten-reiche Interphase wurde unter möglichst geringer Aspiration der benachbarten Phasen abgenommen. Diese leukozytenreiche Phase enthielt Lymphozyten und Monozyten, jedoch keine Granulozyten mehr. Die weitere Präparation erfolgte nun durchgehend gekühlt bei 4°C. Die abgenommenen Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen (500 rcf, 10 min, 4°C, Bremse an), wobei der Überstand nach Zentrifugation verworfen und das entstandene Zellpellet in frischem, kaltem PBS resuspendiert wurde. Die gesamte Zellpräparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde gezählt und anschließend direkt für Durchflusszytometrie, Proliferationsassays oder Proteomanalyse verwendet oder für die SDS-PAGE aufbereitet.

3.2.4 Zählung der gewonnenen Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau⁴⁷ vermischt (Verdünnung 1:2). Zehn µl der Mischung wurden in eine Neubauer-improved Zählkammer⁴⁸ (Kammertiefe 0,1 mm) gegeben. Waren in fünf diagonal angeordneten Gruppenquadraten mehr als 100 Zellen vorhanden, wurden diese ausgezählt und zur Berechnung der Gesamtzellzahl herangezogen. Waren es weniger als 100 Zellen, wurden alle 25 Gruppenquadrate ausgezählt (Fläche pro Gruppenquadrat 0,04 mm²).

Zur Berechnung der Zellzahl diene folgende Formel:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

⁴⁵ Sarstedt, Nürnberg

⁴⁶ Pan Biotech, Aidenbach

⁴⁷ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁴⁸ NeoLab, Heidelberg

3.2.5 Stimulation von Zellen für Western Blots

Für die Western Blot-Experimente in Kapitel 4.4.3 und 4.4.5 dieser Arbeit wurden die Zellen nach der Präparation polyklonal mit Pokeweed Mitogen⁴⁹ (PWM) stimuliert. Hierzu wurden die frisch präparierten Zellen in RPMI Medium (10/1) aufgenommen und in vier gleiche Teile à 1×10^7 Zellen aufgeteilt. Zwei Teile wurden für 10 Minuten, die anderen zwei für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator⁵⁰ aufbewahrt. Pro Zeitpunkt wurde immer einer der beiden Ansätze mit PWM⁴⁹ (5 µg/ml) versetzt, der andere blieb als Mediumkontrolle unbehandelt.

3.2.6 Aufbewahrung und Aufbereitung von PBL für Western Blots

Die Zellsuspension wurde erneut bei 500 rcf abzentrifugiert und der Überstand der Leukozytenpellets verworfen. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Pellets bei -20°C aufbewahrt oder direkt lysiert werden. Je nach Größe wurden die Pellets durch Zugabe von 100 - 1000 µl Lysepuffer gelöst. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und die Lysate bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der lysierten PBL-Proben erfolgte nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Die in den Proben enthaltenen Proteine bilden dabei mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 einen Komplex, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm verschoben wird. Die Proteinmenge der Proben lässt sich anhand der hierzu proportionalen Absorption bestimmen.

Die Eichkurve wurde anhand eines bovinen Serum Albumin (BSA)-Standards erstellt und in Konzentrationen von 0 (Leerwert), 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 mg/ml gemessen. Je 5 µl jeder Probe wurden in je zwei Dellen einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte⁵¹ pipettiert. Nachdem in jede zu bestimmende Delle 250 µl Bradford-Reagenz⁴⁹ zugefügt wurden, folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA-Messgerät (Sunrise)⁵² photometrisch gemessen. Die Nettoabsorption der Probe wurde aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung und durch Abzug des Leerwertes

⁴⁹ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁵⁰ Heraeus Instruments, München

⁵¹ Sarstedt, Nürnberg

⁵² Tecan, Crailsheim

der Standardreihe berechnet. Anhand der Eichgerade ließ sich anschließend die Proteinkonzentration bestimmen und entsprechend der verwendeten Probenmenge berechnen.

3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.4.1 1D Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode durch Anlegen einer elektrischen Spannung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970). Dabei laufen Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit in ein SDS-Gel ein, wobei die größeren Proteine wie in einem Sieb schon weiter oben im Gel abgefangen werden und kleinere Proteine weiter nach unten gelangen können. Die verwendeten Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer⁵³ in einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Um ein Auslaufen der Laufgele zu verhindern, wurden in die Kammern zuerst schnell härtende Abdichtgele gegossen. Darauf wurde dann das Laufgel eingefüllt und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Laufgels wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel darauf geschichtet. Um die Proben später auf das Sammelgel auftragen zu können und zudem mehrere Proben in einem Gel gleichzeitig aufzutrennen, wurde ein entsprechender Kamm zur Herstellung der Probentaschen in das noch flüssige Sammelgel eingefügt. Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Lämmli-Puffer verdünnt und im Thermomixer (750 rpm) fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Um später die Bandenhöhe ablesen zu können, wurden in eine der vorgeformten Geltaschen 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder⁵⁴ gegeben und in die restlichen Geltaschen jeweils die aufzutrennenden Proteine. Nach dem Überführen der ausgehärteten Gele in die Elektrophoresekammern und Befüllen mit Elektrophorese-Puffer wurden die Kammern an das Power Pac Basic Power Supply⁵³ angeschlossen. Die Proben liefen bei RT mit 12,5 mA pro Gel in das Sammelgel ein, bis die Lauffront das Laufgel erreicht hatte. Dann wurde die Amperezahl auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am unteren Gelrand

⁵³ BioRad, München

⁵⁴ Thermo Fisher Scientific, Bonn

angekommen war. Neben Leukozyten-Lysaten von Kontroll- und Überträgerkühen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt:

Protein	Spezies	Firma/Herkunft	Proteinmenge pro Gel
Purin-Nukleosid-Phosphorylase	Mensch	Merck Millipore, Darmstadt	15 µg
Thrombospondin 1	Mensch	Abcam, Cambridge, Großbritannien	15 µg
Filamin A	Mensch	Abcam, Cambridge, Großbritannien	15 µg

3.4.2 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in einem Semi-dry-Elektroblotter (Blue Flash-L)⁵⁵ vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran⁵⁶ überführt. Die Blot-Papiere⁵⁷ und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und übereinander geschichtet. Auf die anodische Platte des Elektroblotters wurden zwei in Anodenpuffer I getränkte Blot-Papiere und ein in Anodenpuffer II getränktes Blot-Papier gelegt. Dann wurde die zuvor in Methanol und Aqua bidest. getränkte PVDF-Membran und anschließend das SDS-Gel aufgelegt. Zum Abschluss wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Blot-Papiere auf dem Gel platziert. Mit einer Glaspipette wurden sämtliche, die Elektrophorese störenden Luftblasen ausgestrichen und anschließend die kathodische Platte des Elektroblotters aufgesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe eines BP 500 Plus Power Supply⁵⁵ bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² und einer Transferzeit von 40 Minuten.

3.4.3 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurde die Membran 10 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Die Ponceau S-Färbung hat eine Sensitivität von 250 – 500 ng Protein (Salinovich and Montelaro 1986). Durch Waschen in Aqua bidest. wurden die Proteinbanden durch Entfernen der

⁵⁵ Serva, Heidelberg

⁵⁶ GE Healthcare, Freiburg

⁵⁷ Roth, Karlsruhe

Hintergrundfärbung sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die komplette Entfärbung der Membran durch Waschen in PBS-T.

3.4.4 Immunoblot

Im Anschluss an die Ponceau-Färbung wurden die Membranen für 1 Stunde bei RT mit 1% PVP-T blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für jeweils zehn Minuten mit PBS-T wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit einem Antigen-spezifischen, primären Antikörper in passender Verdünnung inkubiert. Sollten mehrere Antikörper auf einer Membran getestet werden, wurde diese vorher in Streifen geschnitten. Nach erneutem Waschen der Membranen für dreimal 10 min mit PBS-T, erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten sekundären Antikörper in PBS-T für 1 Stunde bei RT. Überschüssiger, nicht spezifisch an den primären Antikörper gebundener sekundärer Antikörper wurde durch sechs Waschschritte á 10 min mit PBS-T entfernt. Die Lumineszenz der POD-markierten Proteine wurde anhand von ECL detektiert. Dafür wurden die Membranen für 2 min bei RT in der frisch angesetzten ECL-Lösung (siehe Kapitel 3.1.4) inkubiert und in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Röntgenfilme (Euromed Plus green sensitive⁵⁸) wurden je nach Intensität der Signale zwischen 15 Sekunden und 15 Minuten belichtet und anschließend entwickelt. Die Blotmembranen wurden zum Entfernen der ECL-Lösung in Aqua bidest. gewaschen und konnten zur Reinkubation bei 4°C in PBS-T aufbewahrt werden. Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Immunoblot von je zehn Kontroll- und Überträgerkühen gewonnene Kolostren und Seren in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Des Weiteren wurden folgende kommerziell erhältliche primäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Human-CD5	Maus	monoklonal	DAKO, Hamburg	1:300
Anti-Rind-TLR2	Human	monoklonal	Serotec, Puchheim	1:1.000
Anti-Human-Galectin 3	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
Anti-Human-T-bet	Kaninchen	polyklonal	Biozol, Eching	1:500
Anti-Human-GATA3	Kaninchen	polyklonal	Biozol, Eching	1:5.000

⁵⁸ Christiansen, Planegg

Als sekundäre Antikörper fanden folgende POD-gekoppelte Antikörper Verwendung:

Antikörper	Produziert in	Klonalität	Firma/Herkunft	Verdünnung
Anti-Rind-IgG (Fc)	Ziege	polyklonal	Dianova, Hamburg	1:10.000
Anti-Maus-IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5.000
Anti-Human-IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Linaris, Dossenheim	1:1.000
Anti-Kaninchen-IgG (H+L)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:3.000

3.4.5 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der im Western Blot detektierten Banden wurden über die frei zugängliche Software ImageJ 1.47⁵⁹ die Schwärzungsgrade der jeweiligen Banden quantifiziert. Eine intensivere Schwärzung entsprach dabei einer stärkeren Expression des getesteten Proteins in der jeweiligen Probe.

Beim Western Blot zum Nachweis der Gesamtexpression von CD5 in Kontroll- und Überträgerlymphozyten wurden alle Werte der CD5-Banden von Kontroll-PBL mit denen der BNP-PBL im Kolmogorov-Smirnov Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Da eine Normalverteilung vorlag, wurde der Student's *t*-Test zur statistischen Auswertung herangezogen. In diesem Test wurden alle Werte mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.5 Durchflusszytometrie

PBL wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) phänotypisiert.

Folgende primäre Antikörper wurden zur Phänotypisierung eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Isotyp	Herkunft	Verdünnung
Anti-Rind-CD61	Maus IgG ₁	Serotec, Puchheim	1:100
Anti-Human-CD29	Maus IgG ₁	Merck Millipore, Darmstadt	1:50
Anti-Maus-CD5	Ratte IgG _{2b}	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	pur

⁵⁹ <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>

Anti-Human-CD43 Cy5	-	Serotec, Puchheim	1:10
Kontrollserum/-kolostrum	-	-	1:100
Überträgereserum/-kolostrum	-	-	1:100
Kontrollkolostrum FITC	-	-	1:50
Überträgerkolostrum FITC	-	-	1:50

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Farbstoff	Produziert in	Herkunft	Verdünnung
Anti-Rind-IgG ₁ -FITC	Schaf	Serotec, Puchheim	1:50
Anti-Maus-IgG ₁ -FITC	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
Anti-Ratte-IgG _{2b} -FITC	Maus	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200

3.5.1 FITC-Labeln der Antikörper

Zum Markieren mit FITC⁶⁰ wurde je 1 ml der Kolostrum über Nacht in Dialysehschläuchen⁶¹ (Cut-off: 14 kDa) in 5 Litern 0,1M NaHCO₃ (pH 8,0) dialysiert. Im Anschluss wurden die Proteinkonzentrationen mit dem gleichen Puffer auf 1 mg/ml eingestellt und die Proben nach Zugabe von 75 µl FITC-Lösung (siehe 3.1.5) bei RT für eine Stunde lichtdicht rotiert. Anschließend wurden die FITC-gelabelten Proben über Nacht gegen PBS dialysiert und am nächsten Tag 1:2 mit Glycerin⁶² (98%) versetzt. Die FITC-markierten Antikörper wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2 Fluoreszenzfärbung von Leukozyten für die Durchflusszytometrie

Zunächst wurden die gewonnenen PBL in PBS suspendiert und mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Delle in eine 96-Loch Rundbodenplatte⁶³ einpipettiert, dann abzentrifugiert (4°C, 800 rcf, 10 sec), kräftig dekantiert und die verbleibenden Zellpellets mit einem der oben aufgelisteten primären Antikörper pro Delle 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte: Zentrifugieren,

⁶⁰ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁶¹ Roth, Karlsruhe

⁶² Serva, Heidelberg

⁶³ Sarstedt, Nürnberg

Dekantieren und Resuspendieren in Fluo-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit dem passenden sekundären Antikörper (siehe Liste sekundäre Antikörper) inkubiert (4°C, 30 min). Die Inkubationsschritte erfolgten ab dem Einsatz der fluoreszenzmarkierten Antikörper im weiteren Verlauf abgedunkelt. Für alle Färbungen wurden entsprechende Isotypkontrollen erstellt.

3.5.3 Detektion der Zellen mit dem Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die Proteinexpression von einzelnen Zellen und Zellpopulationen feststellen, die vorher mit einem Fluorchrom-markierten Antigen-spezifischen Antikörper gefärbt wurden. Der Prozentsatz der Zellen, die dieses Antigen exprimieren, bzw. die Expressionsstärke dieses Antigens kann somit für die getesteten Zellen ermittelt werden. In einer komplexen Probe wie Leukozyten können durch eine Doppelfärbung mit einem anders Fluorchrom-markierten Zellmarker auch einzelne Lymphozytensubpopulationen wie zum Beispiel T-Helferzellen analysiert werden.

Mit dem FACSCanto II⁶⁴ Immunzytometrie System können tausende von Zellen pro Sekunde detektiert werden. Das System besteht aus einem Argonlaser (488 nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) und kann über bestimmte Filter bis zu vier Farben gleichzeitig wahrnehmen. Der Grund hierfür ist, dass die zur Zellmarkierung genutzten Fluorochrome sich durch die gleiche Wellenlänge anregen lassen, jedoch unterschiedliche, Farbstoff-spezifische Emissionsspektren haben. Die fluoreszenzmarkierten PBL werden hierzu aus den Dellen in das Durchflusszytometer eingespeist und passieren durch hydrodynamische Fokussierung, wie an einer Perlenkette, den gebündelten Argonlaserstrahl. Bei passender Wellenlänge werden die Elektronen der Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nach Beendigung der Anregung, unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese Fluorchrom-spezifische Emission wird über einen Photodetektor (photomultiplier tube, PMT) mit optischem Filter registriert und in elektrische Impulse umgewandelt. Anschließend werden die Impulse über einen Analog-Digital-Wandler graphisch dargestellt und können weiter ausgewertet werden.

⁶⁴ Becton Dickinson, Heidelberg

3.5.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Mit Hilfe der Software FACSDiva⁶⁵ wurde die detektierte Population der Lymphozyten eingegatet und die Bindung der getesteten Antikörper an die Lymphozyten im Histogramm als Graph dargestellt. Dieser war durch eine Linie in zwei Bereiche unterteilt. Der Bereich links der Trennlinie zeigt die nicht-Fluorchrom-gekoppelten Zellen an, wohingegen der Bereich rechts der Linie die positiv-Fluorchrom-gekoppelten Zellen zeigt. Für die positiven Zellen werden zwei Werte angegeben. Der Parent-Wert bezeichnet den prozentualen Anteil der Zellen, an die der zugegebene Antikörper gebunden hat im Verhältnis zu allen gemessenen Zellen. Der Mean-Wert gibt dagegen an wie stark das getestete Antigen von den vorhandenen Zellen exprimiert wird (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI). Für die getesteten Antikörper CD61 und CD43 wurde der Mean-Wert zur Auswertung herangezogen, für alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen bestimmt. Alle Proben, die mit der FACSDiva⁶⁵ Software nicht einheitlich gegatet werden konnten wurden in der frei zugänglichen Flowing Software⁶⁶ (Version 2.5.0) einzeln händisch nachgegatet und anschließend wie beschrieben ausgewertet.

3.5.5 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Um zu ermitteln, ob die Expression der Oberflächenantigene CD61, CD43, CD29 und CD5 zwischen Kontroll- und Überträger-PBL signifikant differenziell ist, wurden zur statistischen Auswertung weiterhin die Mittelwerte aus fünf technisch unabhängigen FACS-Experimenten berechnet und der Mittelwert für die Kontroll-PBL gleich 100% gesetzt. Die Werte wurden anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$) des Kolmogorov-Smirnov Tests lag keine Normalverteilung vor und der Mann-Whitney Test wurde zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen (CD5). Lag eine Normalverteilung ($p > 0,05$) vor, wurde der Student's *t*-Test verwendet (CD61, CD43, CD29).

⁶⁵ Becton Dickinson, Heidelberg

⁶⁶ Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland;
<http://www.flowingsoftware.com/index.php?page=33>

3.6 Immunzytochemie

Um das Bindungsmuster von BNP-auslösenden Immunglobulinen (Ig) auf PBL von geimpften Kontroll- und Überträgerkühen zu analysieren, wurden je circa 5×10^4 PBL auf einem Objektträger⁶⁷ ausgestrichen. Nach Fixierung für 10 Minuten in eiskaltem Aceton wurden die gut getrockneten Zellen in PBS-T rehydriert und die Ausstriche anschließend mit einer Lösung aus 1% BSA in PBS-T bei RT für 40 min blockiert. Es folgte eine Inkubation mit FITC-markiertem Kolostrum in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T mit 1% BSA über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei weitere Waschschriffe mit PBS-T entfernt. Zur Kenntlichmachung der Zellkerne wurden die Zellen dann mit DAPI⁶⁸ (1:1000 in PBS-T mit 1% BSA verdünnt) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Ausstriche mit Fluorescent Mounting Medium⁶⁹ eingedeckelt. Die Auswertung und Dokumentation des Bindungsmusters der Antikörper an PBL erfolgte mit dem Mikroskop Axio Imager M31⁷⁰ und der Software AxioVision⁷⁰ (Version 4.8.2).

3.7 Zellproliferationsassay

3.7.1 *In vitro* Stimulation und radioaktive Markierung von Lymphozyten

Um den Einfluss verschiedener Stimulantien auf die Zellproliferationsrate von Kontroll- und Überträger-PBL zu testen eignet sich ein ³H-Thymidin-Assay. Nach Stimulation der Zellen können diese mit radioaktivem [methyl-³H]-Thymidin, das sich bei der Zellteilung in die zelluläre DNA einbaut, markiert werden. Das Ausmaß der radioaktiven Strahlung, die von den Zellen daraufhin abgesondert wird, gibt Aufschluss über die proliferative Aktivität der Zellen. Hierzu wurden PBL von Kontroll- und Überträgerkühen in RPMI Medium (10/1) auf eine Dichte von 5×10^5 /ml eingestellt. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In sterile 96-Flachboden Lochplatten⁷¹ wurden je 200 µl Lymphozyten-Suspension (1×10^5 Zellen) in Triplikaten eingesät. Ein Triplikat blieb als Mediumkontrolle unstimuliert, die restlichen wurden mit den folgenden Mitogenen stimuliert:

⁶⁷ Medite, Burgdorf

⁶⁸ Invitrogen, Karlsruhe

⁶⁹ DAKO, Hamburg

⁷⁰ Carl Zeiss, Oberkochen

⁷¹ Sarstedt, Nürnberg

Stimulanz	Endkonzentration
Concanavalin A (ConA) ⁷²	5 µg/ml
Phytohämagglutinin (PHA) ⁷²	5 µg/ml
Pokeweed Mitogen (PWM) ⁷²	5 µg/ml
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) ⁷²	1 µg/ml
Lipopolysaccharid (LPS) ⁷²	5 µg/ml
CpG-Oligodesoxynukleotid (CpG-ODN) ⁷³	1 µM
Polyinosin:polycytidylsäure (Poly i:c) ⁷²	25 µg/ml
PregSure BVD ⁷⁴	1 ng/ml

Nach 32-stündiger Inkubation im Brutschrank (CO₂ Auto-Zero)⁷⁵ bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% wurden die Zellen mit 20 µl [³H]-Thymidin-Lösung pro Delle (1 µCi/Kavität) radioaktiv markiert und weitere 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozyten mit dem Harvester⁷⁶ geerntet. Dabei wurden die Zellen aus den Kavitäten gespült und in einem Glasfaserfilter⁷⁷ aufgefangen. Die Filter wurden 30 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet, danach in Omni Filterkassetten⁷⁶ eingespannt und Szintillationsflüssigkeit⁷⁸ (20 µl/Kavität) aufpipettiert. Die Filterkassetten wurden mit einer selbstklebenden Folie⁷⁷ versiegelt. Die [³H]-Aktivität wurde im Beta-Counter (TopCount NXT Microplate)⁷⁶ in counts per minute (cpm) gemessen.

3.7.2 Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten

Für die statistische Auswertung der Zellproliferationsassays wurden aus den cpm-Werten zunächst Stimulationsindizes berechnet, indem die cpm-Werte der stimulierten Zellen jedes Tieres durch die Werte der unstimulierten Zellen desselben Tieres dividiert wurden. Damit wurde der Stimulationsindex für die unstimulierten Ansätze gleich 1 gesetzt. Anhand der Stimulationsindizes konnten Unterschiede in

⁷² Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁷³ Invivogen, Toulouse, Frankreich

⁷⁴ Pfizer, Berlin

⁷⁵ Heraeus Instruments, München

⁷⁶ Packard, Dreieich

⁷⁷ Perkin Elmer, Hamburg

⁷⁸ Perbio Science, Bonn

den Proliferationsraten zwischen Kontroll- und Überträgerkühen verglichen werden. Um diese Unterschiede aus sechs technisch unabhängigen Experimenten zusammenzufassen, wurden Mittelwerte gebildet und die Werte von stimulierten Kontrollzellen und von stimulierten Überträgerzellen anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$) des Kolmogorov-Smirnov Tests lag keine Normalverteilung vor und der Mann-Whitney Test wurde zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen (ConA, PHA, PWM, PMA). Lag eine Normalverteilung ($p > 0,05$) vor, wurde der Student's *t*-Test verwendet (LPS, PregSure, Poly i:c, CpG-ODN).

3.8 Stimulation und Fraktionierung von Zellen für die differenzielle Proteomanalyse

3.8.1 Stimulation von Zellen für die Proteomanalyse

Für die differenzielle Proteomanalyse wurden PBL von je zwei Kontroll- und Überträgerkühen nach Präparation polyklonal mit Pokeweed Mitogen⁷⁹ (PWM) stimuliert. Hierzu wurden die frisch präparierten Zellen in RPMI Medium (10/1) aufgenommen, in zwei gleiche Teile à $2,2 \times 10^7$ Zellen aufgeteilt und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator⁸⁰ aufbewahrt. Zu einem der zwei Ansätze wurde vorher PWM⁷⁹ (5 µg/ml) zugegeben, der andere blieb als Mediumkontrolle unbehandelt.

3.8.2 Fraktionierung der stimulierten Zellen für die Proteomanalyse

3.8.2.1 Biotinylierung der Plasmazellmembranproteine

Für die Proteinexpressionsanalyse der verschiedenen Zellfraktionen wurden die PWM-stimulierten Zellen geerntet und im ersten Schritt Proteine der Plasmazellmembran mittels Oberflächenbiotinylierung angereichert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS mit CaCl₂/MgCl₂ pH 6,7 gewaschen (4°C, 400 rcf, 10 min). Anschließend wurden die entstandenen Zellpellets behutsam in 500 µl Biotinylierungsreagenz mit 500 µM Aminoxybiotin resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Dunkeln über Kopf rotierend inkubiert. Die Biotinylierung wurde

⁷⁹ Sigma-Aldrich, Taufkirchen

⁸⁰ Heraeus Instruments, München

durch fünfminütige Inkubation mit 1 mM Glycerol bei 4°C gestoppt. Die Zellen wurden schließlich einmal mit PBS mit CaCl₂/MgCl₂ pH 7,4 gewaschen (4°C, 400 rcf, 10 min).

3.8.2.2 Anreicherung der Plasmazellmembranproteine und Gewinnung der zytosolischen Fraktion

Die gewaschenen Pellets wurden in 300 µl Lysepuffer resuspendiert und die Lysate bis zur weiteren Präparation bei -20°C gelagert. Nachdem die Lysate wieder aufgetaut waren, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 6000 rcf (4°C, 10 min). Danach wurden die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße⁸¹ überführt. Die entstandenen Pellets wurden zur weiteren Präparation der Zellkernfraktion (Kapitel 3.8.2.4) bei 4°C gelagert. Die separierten Überstände wurden im Verhältnis von 1:5 mit TBS pH 7,4 verdünnt. 80 µl Strep-Tactin Superflow Beads⁸² wurden mit Low Retention Pipettenspitzen⁸¹ in LoBind Reaktionsgefäße⁸¹ pipettiert, kurz invertiert und dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen (RT, 1000 rcf, 1 min). Zur Bindung der Biotin-markierten Oberflächenproteine an die Streptavidin-beschichteten Beads wurden die verdünnten Proben auf die gewaschenen Beads gegeben und bei 4°C für 120 min langsam über Kopf rotierend inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (RT, 1000 rcf, 1 min) und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße⁸¹ überführt. Diese Überstände enthielten die zytosolische Fraktion der Zellen und wurden bis zur weiteren Verarbeitung im FASP-Verdau bei -20°C gelagert.

Die verbleibenden Beads wurden anschließend erst mit 200 µl Waschpuffer, dann mit 200 µl TBS mit 0,5% SDS gewaschen (RT, 2000 rcf, 2 min). Darauf folgte eine Inkubation der Beads mit 200 µl TBS mit 0,5% SDS und 100 mM DTT für 30 min bei RT. Nach dem Waschen mit 200 µl UC-Puffer (RT, 2000 rcf, 2 min) wurden die Proben mit 200 µl UC-Puffer mit Jodacetamid bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Der Zentrifugation (RT, 2000 rcf, 2 min) folgten vier Waschschrte mit je 200 µl der folgenden Lösungen in gegebener Reihenfolge: UC-Puffer, 5 M NaCl, 100 mM Na₂CO₃, 50 mM Tris-HCl pH 8,5 (RT, 2000 rcf, 2 min).

⁸¹ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

⁸² IBA, Göttingen

3.8.2.3 Extraktion der Proteine von den Beads und Verdau der Plasmazellmembran-Fraktion

Die an die Beads gebundenen Proteine wurden über Nacht bei 37°C mit 40 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5 mit 1 µg Trypsin verdaut. Das Enzym Trypsin spaltet Proteine an der Peptidbindung nach Arginin und Lysin, sodass genau definierte Proteinfragmente entstehen. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (RT, 2000 rcf, 2 min) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße⁸³ überführt (= Überstand 1). Daraufhin wurden die Beads mit 40 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,5 gewaschen, abzentrifugiert und mit Überstand 1 zusammengeführt (tryptische Fraktion der Plasmazellmembranproteine). Die tryptische Fraktion wurde mit 0,5% TFA angesäuert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die verbleibenden Beads wurden erneut mit 40 µl 1x G7-Puffer gewaschen (RT, 2000 rcf, 2 min) und die Überstände dekantiert. Anschließend folgte die Spaltung N-glykosidischer Bindungen mittels Verdau durch 500 Einheiten Glycerol-freier PNGase F⁸⁴ in 20 µl 1x G7-Puffer für sechs Stunden bei 37°C. Die Proben wurden zentrifugiert (RT, 2000 rcf, 2 min) und der Überstand in ein neues LoBind Reaktionsgefäß⁸³ überführt (= Überstand 2). Nach dem letzten Waschen der Beads mit 20 µl 1x G7-Puffer wurde der Überstand mit Überstand 2 zusammengeführt und mit 0,5% TFA angesäuert. Überstand 2 stellt die PNGase-Fraktion der Plasmazellmembranproteine (also die vormals glykosylierten Peptide) dar. Da die Plasmazellmembranproteine in diesem Versuch als Ganzes betrachtet werden sollten, wurden tryptische und PNGase-Fraktionen gepoolt und bis zum Einspeisen ins Massenspektrometer bei -20°C gelagert.

3.8.2.4 Aufbereitung der Zellkern-Fraktion

Die in Kapitel 3.8.2.2 gewonnenen Zellpellets wurden parallel zur Präparation der Proteine aus Plasmazellmembran und Zytosol präpariert. Aus ihnen wurden die Proteine der Zellkern-Fraktion gewonnen. Hierzu wurden die Pellets zweimal mit 500 µl Low Salt Puffer gewaschen (4°C, 6000 rcf, 5 min). Dabei wurden die Pellets nur mit dem Puffer invertiert, nicht resuspendiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 200 µl High Salt Puffer für 30 min bei 4°C auf einem schnell laufenden Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit zehn Mal durch

⁸³ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

⁸⁴ New England Biolabs, Frankfurt/Main

eine 18 Gauge Injektionskanüle⁸⁵ gezogen, bei 4°C und 13000 rcf für 10 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues LoBind Reaktionsgefäß⁸⁶ überführt (= Überstand 1). Die Pellets wurden wiederum mit 200 µl High Salt T-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf einem schnell laufenden Rotationsrad inkubiert. Nach erneuten zehn Passagen durch eine 18 Gauge Injektionskanüle⁸⁵ und Zentrifugation bei 4°C und 13000 rcf für 10 min wurden die Überstände mit den Überständen 1 gepoolt (Fraktion Zellkern).

Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen Zytosol und Zellkern wurden mittels Bradford-Methode (siehe Kapitel 3.3) und einer Standardreihe aus BSA in 50% High Salt Puffer und 50% High Salt T-Puffer bestimmt. Je 10 µg jeder Probe wurden im FASP-Verdau weiterbearbeitet.

3.9 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

Die drei isolierten Zellfraktionen von unstimulierten und PWM-stimulierten PBL von je zwei Kontroll- und zwei Überträgerkühen wurden mittels LC-MS/MS massenspektrometrisch analysiert. Für jede Probe wurde eine Messung durchgeführt.

3.9.1 FASP-Verdau der Fraktionen Zytosol und Nukleus

Da die Proben der Fraktionen Zellkern und Zytosol noch keinem enzymatischen Verdau unterzogen wurden, mussten diese vor Einspeisung in das Massenspektrometer einen FASP (filter aided sample preparation) -Verdau durchlaufen (Wisniewski et al. 2011). Jeweils 10 µg Gesamtprotein der Proben wurden mindestens 1:4 mit TBS auf ein Gesamtvolumen von mindestens 100 µl gebracht. Es folgten die Zugabe von 10 µl 100 mM DTT⁸⁷ (100 mM) und 30 min Inkubation bei 60°C unter Schütteln. Im Anschluss wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mit je 250 µl UA-Puffer und 25 µl 300 mM Iodacetamid⁸⁸ für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit wurden 30 kDa Cut-off-Filter⁸⁹ mit 50 mM ABC-Puffer vorgewaschen (RT, 14000 rcf, 5 min). Die Proben wurden auf die angefeuchteten Filter gegeben und abzentrifugiert (RT, 14000 rcf, 15 min). Die Durchläufe wurden verworfen und die

⁸⁵ Becton Dickinson, Heidelberg

⁸⁶ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

⁸⁷ Serva, Heidelberg

⁸⁸ GE Healthcare, Freiburg

⁸⁹ Merck Millipore, Darmstadt

Filter dreimal mit 200 µl UA-Puffer und anschließend zweimal mit 100 µl 50 mM ABC-Puffer gewaschen, wobei die Durchläufe ebenfalls verworfen wurden. Als nächstes erfolgte die Zugabe von je 50 µl 50 mM ABC-Puffer, 5 µl Lys-C⁹⁰ (0,2 µg/µl) und 4 µl Trypsin⁹¹ (0,5 µg/µl). Damit wurden die Filter bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 15 min bei Raumtemperatur und 14000 rcf abzentrifugiert und die Durchläufe, die nun die Peptide enthielten, gesammelt. Zuletzt wurden 20 µl 50 mM ABC-Puffer mit 2% ACN auf die Filter pipettiert und wie vorher abzentrifugiert. Die so gewonnenen Eluate (ca. 70 µl) wurden mit 0,5% TFA angesäuert und die gesamte Probenmenge direkt für die LC-MS/MS verwendet.

3.9.2 LC-MS/MS

Die Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie (LC-MS/MS) -Analyse wurde mit einem Ultimate3000 nano HPLC System⁹² durchgeführt, welches mittels einer Nano Spray Ionenquelle online an ein LTQ OrbitrapXL⁹³ Massenspektrometer gekoppelt ist. Das HPLC System ist mit einer Nano Trap Säule⁹² (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap100C18, 5 µm, 100Å Material) und einer analytischen Säule⁹² (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap100C18, 3 µm, 100Å Material) ausgestattet. Die verdauten Proben aller drei Zellfraktionen wurden automatisch injiziert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/Minute in 5% Puffer B und 95% Puffer A auf die Nano Trap Säule geladen. Nach fünf Minuten wurden die Peptide eluiert und auf der analytischen Säule aufgetrennt. Diese Auftrennung fand durch einen Gradienten von 5 - 50% Puffer B bei einer Flussrate von 300 nl/Minute über eine Zeit von 140 Minuten statt. Restliche, auf der Säule verbliebene Peptide wurden durch einen kurzen Gradienten von 50 - 100% Puffer B innerhalb von 5 Minuten eluiert. Die Analyse der eluierten Peptide erfolgte direkt nach der Nano Spray Ionisierung im LTQ OrbitrapXL⁹³ Massenspektrometer. Dazu wurden die zehn intensivsten Peptidionen aus dem Orbitrap MS Vorscan für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Als Auswahlkriterien wurden eine Intensität von mindestens 100 sowie eine minimal doppelte Ladung des Peptides festgesetzt. Der Wert für die normalisierte Kollisionsenergie CID (Collision induced dissociation) wurde auf 35 festgesetzt. Die Detektion der sich daraus ergebenden Fragmente mit einer normalen Auflösung erfolgte in der linearen Ionenfalle. Ein hochauflösendes MS-

⁹⁰ Wako, Neuss

⁹¹ Promega, Mannheim

⁹² Dionex, Idstein

⁹³ Thermo Scientific, Bonn

Spektrum mit einer Halbwertsbreite (*engl.* full width half maximum) von 60.000 und einer Massenbandbreite von 200 bis 2000 Da wurde in der Orbitrap während der Fragmentanalyse aufgenommen. Jedes Ion, das für die Fragmentierung selektiert wurde, wurde 30 Sekunden lang durch dynamischen Ausschluss von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (dynamic exclusion).

3.9.3 Quantitative Auswertung mit Progenesis

Zur quantitativen Auswertung der Daten wurden die aufgenommenen MS- und MS/MS-Spektren in die Progenesis-Software⁹⁴ (Version 2.5) importiert und die Spektren einzelner Proben jeweils zur Deckung gebracht und normalisiert. Dazu wurde eine Probe als Referenz ausgewählt und die anderen anhand von jeweils fünf bis zehn manuell gesetzten Markierungen automatisch daran ausgerichtet. Einfach geladene Peptide oder Peptide mit einer Ladung von über 7 wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nachdem die Proben über alle detektierten Peptide zueinander normalisiert waren, wurden sie einer Gruppe zugeordnet (Kontrolle/BNP, unstimuliert/PWM). Daraufhin konnten die Spektren für die Datenbanksuche aus der Progenesis-Software⁹⁴ als Mascot Generic File (mgf) exportiert werden. Nach Identifizierung der Peptide in Mascot⁹⁵ (siehe 3.9.4) wurden die Daten wieder in die Progenesis-Software reimportiert und die identifizierten Peptide Proteinen zugeordnet.

3.9.4 Datenbanksuche für die mittels LC-MS/MS identifizierten Peptide

Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden zur Identifikation der Peptide mit Mascot⁹⁵ (Matrix Science, Version 2.4.1) mit der Ensembl-Rind-Datenbank⁹⁶ (Version 70, 2013) abgeglichen. Dabei wurde die Peptidtoleranz auf maximal 10 ppm und die Fragmentationstoleranz auf 1 Da festgesetzt. Cystein Carbamidomethylierung wurde für die Analyse der Fragmentspektren als feste und Oxidierung von Methionin und Deamidierung von Asparagin und Glutamin als variable Modifikationen angegeben. Hier wurde maximal eine nicht geschnittene Spaltstelle erlaubt. Anhand der in Mascot integrierten Decoy-Datenbanksuche wurde die Falschpositivrate (*engl.* False discovery rate, FDR) abgeschätzt (minimale Ionen-Punktzahl von 13, $p < 0,01$) und kleiner 1% gehalten.

⁹⁴ Nonlinear Dynamics

⁹⁵ <http://www.matrixscience.com>

⁹⁶ <http://www.ensembl.org/index.html>

Die Suche der molekularen Funktionsbereiche, an denen die nach PWM-Stimulation zwischen Kontroll- und Überträgertieren differenziell exprimierten Plasmazellmembranoberflächenproteine beteiligt sind (Tab. 4.7 – 4.8), wurde mittels der Software Genomatix⁹⁷ durchgeführt. Zur Suche wurden alle Proteine verwendet, die nach PWM-Stimulation zwischen Kontroll- und Überträgertieren mindestens um den Faktor 2 differenziell exprimiert waren. Die Suche in Genomatix erfolgte mit den humanen Orthologen zu den Genen der identifizierten Rinderproteine, da hierzu mehr Informationen in den Datenbanken vorhanden waren.

Alle verwendeten Datenbanken sind über das Internet zugänglich:

Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>

Genomatix: <http://www.genomatix.de>

3.9.5 Suche von Orthologen und Paralogen

Identifizierte Rinderproteine, für die noch keine Namen oder Gensymbole vorhanden waren, wurden in der frei verfügbaren Ensembl-Rind-Datenbank⁹⁸ (Version 70, 2013) entsprechenden Orthologen oder Paralogen zugeordnet. Falls dort keine passenden Einträge gefunden werden konnten, wurde das Protein anhand der Proteinsequenz mit Hilfe des NCBI BLAST Algorithmus⁹⁹ identifiziert.

Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte der quantitativen LC-MS/MS Datenauswertung ist in folgender Grafik dargestellt (Abb. 3.1):

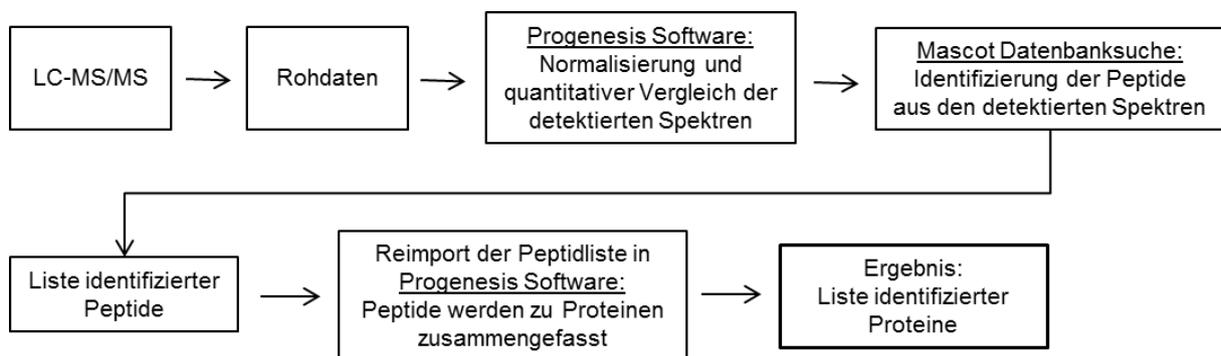


Abb. 3.1: Schema der LC-MS/MS Datenauswertung.

⁹⁷ <http://www.genomatix.de>

⁹⁸ <http://www.ensembl.org/index.html>

⁹⁹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.9.6 Auswertung der Proteinabundanzen

Zur Auswertung der differentiellen Proteinexpressionsanalyse von PWM-stimulierten Leukozytenproteinen der drei Zellfraktionen wurden für jedes identifizierte Protein zunächst die Mittelwerte der Abundanzen von den jeweils zwei getesteten Kontroll- und Überträger-PBL gebildet. Aus diesen Mittelwerten wurden für jedes Protein Quotienten zwischen Kontrollen und Überträgern gebildet, um die Rate der Proteinregulation (ratio) nach Zellstimulation zu berechnen. In den Tabellen 4.1 – 4.6 sind die nach PWM-Stimulation zwischen Kontrollen und Überträgern mindestens zweifach differentiell regulierten Proteine (ratio ≥ 2) dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 BNP-Alloantigenkandidaten konnten nicht verifiziert werden

Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), Filamin A (Fila) und Thrombospondin-1 (TSP1) sind Proteine, die alle im BNP-auslösenden Impfstoff PregSure BVD vorkommen (Euler 2013). Des Weiteren wurde in der vorangegangenen Dissertation unserer Arbeitsgruppe zum Thema BNP (Euler 2013) durch Western Blots nachgewiesen, dass aus dem Gesamtproteom von Rindern alle drei Proteine spezifisch von BNP-Immunglobulinen (Ig) detektiert werden, aber nicht von Immunglobulinen PregSure BVD-geimpfter Kontrollkühe, die keine BNP-Kälber geboren haben. Dies waren die Kriterien für ein Protein, um als potenzieller BNP-Alloantigenkandidat zu gelten. Um diese drei Proteine nun als Alloantigen verifizieren zu können, wurde das jeweilige Protein in aufgereinigter Form in einem 1D SDS-Gel geladen und anschließend mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierauf wurden verschiedene Kontroll- und Überträgerseren sowie entsprechende Kolostren als Quelle für Kontroll- und BNP-IgG getestet und die Bindung an das geladene Protein mittels eines sekundären anti bovinen IgG-Fc-POD Antikörpers sichtbar gemacht. Bei keinem der drei Proteine konnten Unterschiede bei der Häufigkeit oder Intensität der Bindung von Kontroll- und BNP-IgG nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1, Western Blot, repräsentative Beispiele der Bindung von Kontroll-IgG und BNP-IgG an die entsprechenden Kandidaten). Es konnte somit keines der Proteine als BNP-Alloantigen verifiziert werden.

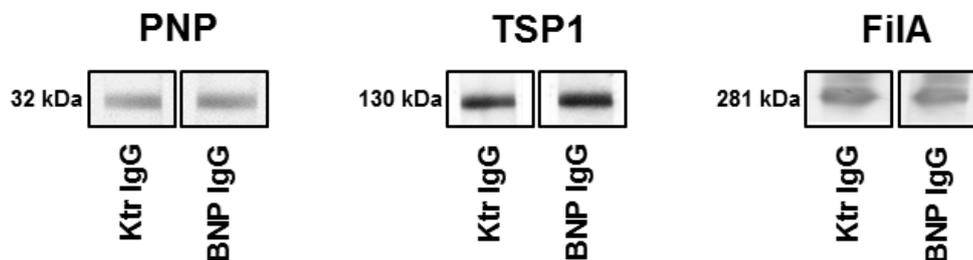


Abb. 4.1: Bindungsverhalten von IgG PregSure BVD-geimpfter Kontroll- und BNP-Überträgerkühe an die BNP-Alloantigenkandidaten-Proteine Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), Thrombospondin-1 (TSP1) und Filamin A (Fila).

Seren und Kolostren von geimpften Kontroll- und Überträgerkühen wurden im 1D Western Blot auf den Proteinen PNP, TSP1 und Fila getestet. Bei keinem der drei Proteine war ein Unterschied bei der Targetierung durch Kontroll- und BNP-IgG nachweisbar. Die dargestellten Blotbanden stehen repräsentativ für die Bindungsintensität von Kontroll- und Überträger-IgG auf dem jeweiligen Protein.

4.2 BNP-Immunglobuline binden gleichmäßig an Lymphozyten von Kontroll- und BNP-Überträgerkühen

Die Hypothese der BNP-Antikörper-Bildung beruhte darauf, dass der auslösende Impfstoff mit MDBK-Zellbestandteilen verunreinigt war, gegen die aber nur manche der geimpften Kühe die BNP-auslösenden Alloantikörper bildeten und über das Kolostrum an ihre Kälber weitergaben (Bastian et al. 2011, Deutskens et al. 2011). Da diese Überträgerkühe selbst aber keinerlei Symptome zeigten ging man davon aus, dass sie das BNP-auslösende Antigen oder ein Epitop davon selbst nicht exprimieren und deshalb nach der Impfung Alloantikörper bildeten (Bastian et al. 2011, Foucras et al. 2011). Nachdem die potentiellen BNP-Alloantigene aus unseren Vorarbeiten (Euler 2013) nicht verifiziert werden konnten, testeten wir im nächsten Schritt die Bindung von BNP-IgG an Lymphozyten von Kontroll- und Überträgerkühen um herauszufinden, ob es sich bei dem BNP-auslösenden Antigen tatsächlich um ein Alloantigen handelt. Dabei war das Ziel aufzuklären, ob es Unterschiede im Bindungsverhalten von BNP-IgG an Zellen von Kontrollkühen und BNP-Überträgerkühen gibt. Der Nachweis erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei das Bindungsmuster von BNP-Immunglobulinen an Oberflächenantigene von peripheren Blutleukozyten (PBL) des Rindes untersucht wurde. Serum von drei verschiedenen BNP-Überträgerkühen wurde auf PBL von PregSure BVD-geimpften Kontrollkühen und Überträgerkühen gegeben. Da aus Vorarbeiten bekannt ist, dass die BNP-auslösenden Antikörper vom Isotyp IgG₁ sind (Assad et al. 2012), wurden die Seren mit anti bovinem IgG₁-FITC-Antikörper markiert. Der Prozentsatz der von BNP-IgG₁ gebundenen Lymphozyten konnte so im Durchflusszytometer ermittelt werden. Die getesteten BNP-Seren zeigten hier keinen signifikanten Unterschied bei der prozentualen Bindung von Kontroll- und Überträgerzellen. Das BNP-Serum 73 band durchschnittlich an 65% ($\pm 10\%$) der Kontroll-PBL und 62,5% ($\pm 17,5\%$) der Überträger-PBL. Dabei band es am stärksten an seine eigenen Zellen (80%, Abb. 4.2 a). Der mittlere Prozentsatz der von BNP-Serum 74 gebundenen Kontrollzellen lag bei 69% ($\pm 11\%$), der der gebundenen BNP-PBL bei 67% ($\pm 25\%$, Abb. 4.2 b). Und auch das BNP-Serum 78 band im Schnitt an 70% ($\pm 15\%$) der Kontrolllymphozyten und an 55% ($\pm 28\%$) der Lymphozyten von Überträgerkühen (Abb. 4.2 c). Anhand der erstellten Balkendiagramme ist ersichtlich, dass das Bindungsverhalten von BNP-IgG₁ abhängig von getestetem BNP-Serum und getesteten PBL Schwankungen aufweist. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass BNP-

Antikörper sowohl Kontroll- als auch Überträgerlymphozyten in gleichem Maße binden (Abb. 4.2). Es ist eine klare Bindung von BNP-IgG an Lymphozyten von Überträgerkühen und sogar an die Zellen der eigenen Kuh nachweisbar. Durch diesen Versuch bestätigte sich außerdem, dass die BNP-Immunglobuline für ein Antigen spezifisch sind, das nicht ubiquitär auf allen Lymphozyten exprimiert ist (Assad et al. 2012). Durchschnittlich werden nur 60 – 70% der Lymphozyten von BNP-Antikörpern gebunden, der restliche Prozentsatz scheint das für BNP ursächliche Antigen nicht zu exprimieren.

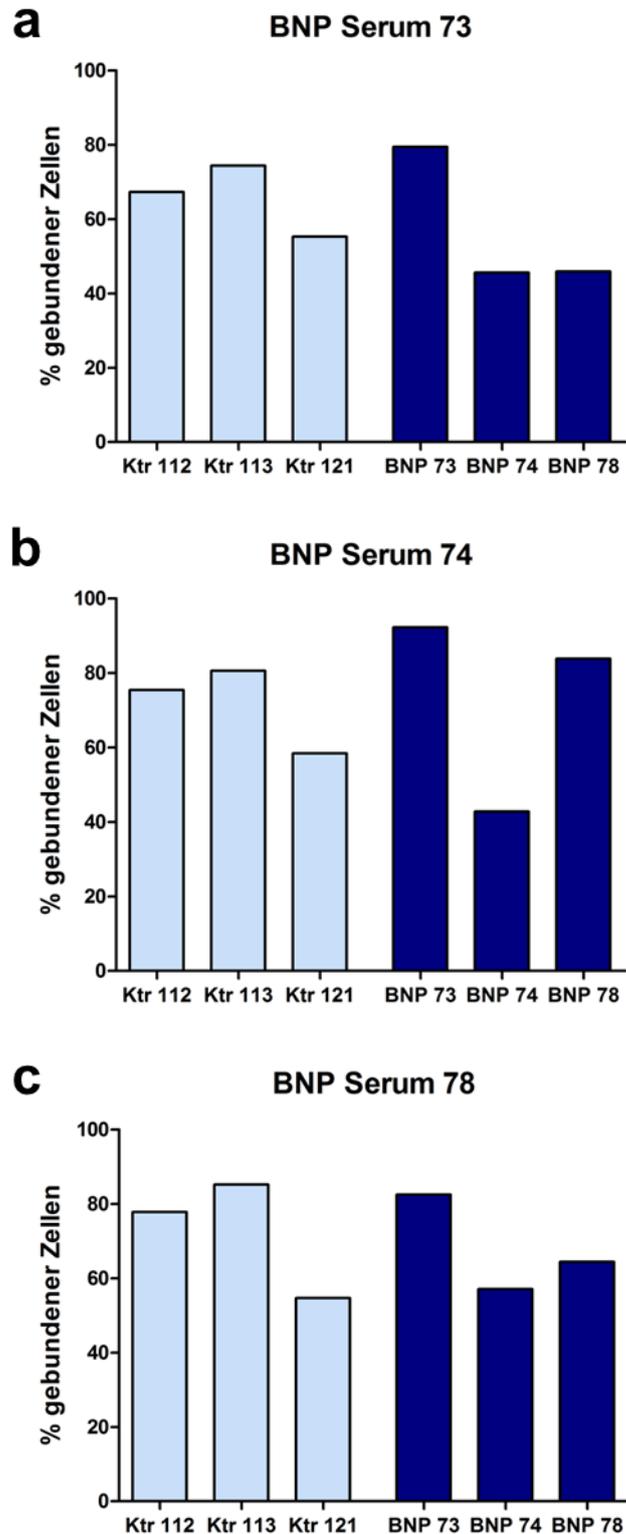


Abb. 4.2: Bindungsverhalten von IgG₁ aus Seren von BNP-Überträgerkühen an Lymphozyten von PregSure BVD-geimpften Kontroll- und Überträgerkühen.

Die y-Achse beschreibt den Prozentsatz der Lymphozyten, die in der Durchflusszytometrie von dem jeweiligen Überträgerserum (a: Serum 73, b: Serum 74, c: Serum 78) gebunden wurden. BNP-Antikörper banden in gleichem Maße an Lymphozyten von Kontrollkühen (hellblaue Säulen, n = 3) und von Überträgerkühen (dunkelblaue Säulen, n = 3). Außerdem zeigte jedes getestete Serum eine deutliche Bindung an die eigenen Zellen.

Dieses Bindungsmuster von BNP-Antikörpern ließ sich auch immunzytochemisch nachweisen. Wie in Abb. 4.3 zu sehen ist, erscheinen ungebundene Lymphozyten durch die Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dunkelblau, die von FITC gelabelten BNP-Antikörpern gebundenen Lymphozyten erscheinen grün bis hellblau (hellblau durch eine Überlagerung mit der dunkelblauen Kernfärbung). Der Prozentsatz der von BNP-Kolostrum gebundenen Zellen wich kaum zwischen Kontroll-PBL und den beiden Überträger-PBL ab. Beide BNP-Kolostrum banden etwa 75% der Lymphozyten, unabhängig davon, ob es sich dabei um PBL von Kontroll- oder Überträgerkühen handelte. Diese Werte stimmen mit den durchflusszytometrischen Daten überein und bestätigen, dass BNP-Antikörper keinen Unterschied bei der Bindungsaffinität zwischen Zellen von Kontroll- und Überträgerkühen aufweist.

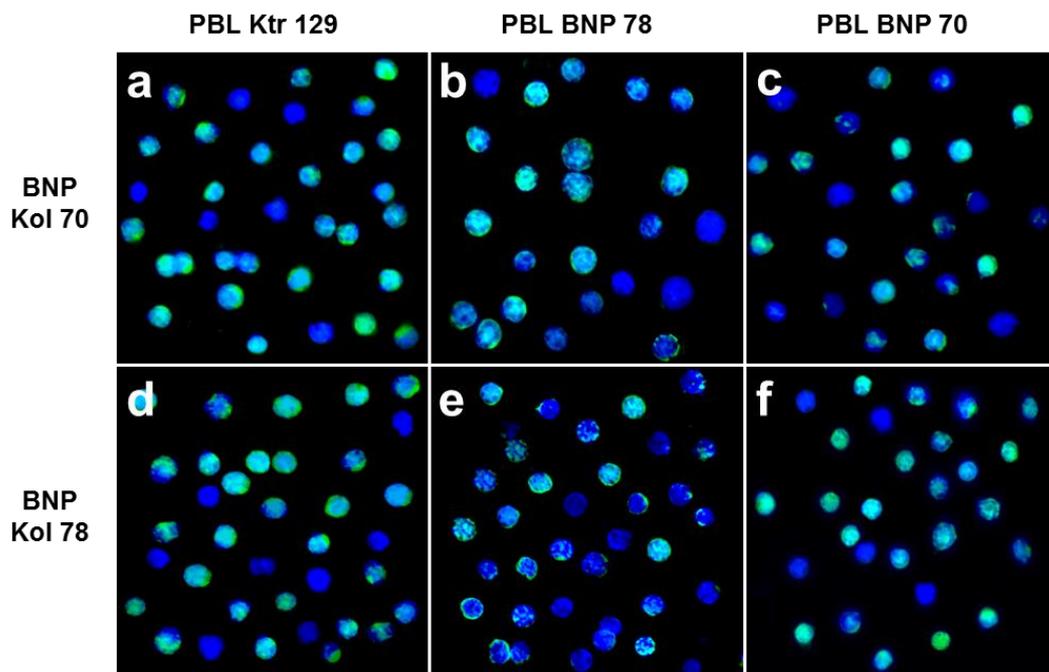


Abb. 4.3: Bindung von Ig aus Kolostrum von BNP-Überträgerkühen an Lymphozyten von geimpften Kontroll- und Überträgerkühen.

Kolostrum von zwei Überträgerkühen (Kolostrum 70: a – c; Kolostrum 78: d – f) wurden auf PBL von einer Kontrollkuh (Ktr 129: a, d) und zwei BNP-Überträgerkühen getestet (BNP 70: b, e; BNP 78: c, f). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (dunkelblau), BNP-Ig gebundene Zellen sind grün oder bei einer Überlagerung mit dem Zellkern hellblau zu sehen. Die Auswertung der Verteilung von grünen bzw. hellblauen Zellen zu dunkelblauen Zellen zeigte, dass die BNP-Kolostrum gleich stark an Lymphozyten von Kontroll- und von Überträgerkühen banden. Immunglobuline aus dem Kolostrum 70 banden zu 81% an PBL der Kontrolle 129 (a), zu 78% an PBL seiner eigenen Spenderkuh 70 (b) und zu 74% an die Zellen der Überträgerkuh 78 (c). Kolostrum 78 band 77% der Zellen von Kontrollkuh 129 (d), 82% der Zellen von Überträgerkuh 70 (e) und 73% der Zellen seiner eigenen Spenderkuh 78 (f).

Die Versuche zeigen also, dass BNP-IgG genauso deutlich an Lymphozyten der Überträgertiere wie an die der Kontrolltiere bindet, was darauf hinweist, dass die BNP-Kühe das BNP-Antigen offenbar doch selbst exprimieren. Demnach beruht die Bildung der tödlichen BNP-Antikörper möglicherweise nicht auf dem postulierten Expressionsunterschied des Antigens zwischen Kontroll- und Überträgerkühen (Deuskens et al. 2011, Foucras et al. 2011), was grundlegend der bisherigen Hypothese der BNP-Ätiologie widerspricht. Die Tatsache, dass nicht alle Lymphozyten, sondern nur circa zwei Drittel von BNP-Antikörpern gebunden werden, bestätigt erneut, dass wir ein MHCI-Bindungsmuster (Deuskens et al. 2011, Foucras et al. 2011) nicht nachweisen können (Assad et al. 2012). MHCI ist auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und müsste zu 100% Bindung der Antikörper führen (Agrawal and Kishore 2000). Auch unsere früheren Daten zeigten nur eine Bindung von 70% der Lymphozyten durch BNP-IgG (Assad et al. 2012). Eine andere Arbeitsgruppe konnte sogar auf bovinen Zelllinien keine einheitliche Bindung von BNP-IgG nachweisen (Schumann 2011). Ihre Versuche zeigten ebenfalls starke Schwankungen in der prozentualen Bindung von MDBK-Zellen, der bovinen Nierenzelllinie, die zur Impfstoffherstellung von PregSure BVD verwendet wurde. Dabei waren nicht nur zwischen verschiedenen getesteten BNP-Kolostren, sondern auch innerhalb der einzelnen BNP-Kolostren in verschiedenen Tests Schwankungen der Bindung um bis zu 55% nachweisbar, was stark gegen ein MHCI-Bindungsmuster spricht (Schumann 2011).

Da die Bildung der tödlichen BNP-Antikörper nach unseren Daten also nicht stichhaltig über eine MHCI-Alloantikörper-Reaktion erklärt werden konnte, haben wir uns als nächstes mit grundsätzlichen Unterschieden bei der Immunreaktion von geimpften Kontrolltieren und BNP-Überträgern beschäftigt. Aus der Vorgängerdissertation hatten wir die Information, dass 29 Oberflächenproteine auf PBL von Überträgerkühen signifikant niedriger exprimiert sind als auf Kontroll-PBL (Euler 2013). Unter den stark signifikant differenziell regulierten Proteinen ($p \leq 0,01$) befanden sich mit CD-Antigenen einige Regulatoren des Immunsystems (z.B. CD5, CD43) und Integrine (CD29, CD61), die interessante Funktionen bei der Immunreaktion einnehmen. Diese Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, dass die BNP-Überträgerkühe generell eine völlig andere Immunkapazität haben könnten als die Kontrollkühe. Daher wollten wir zunächst die Expressionsunterschiede von CD61,

CD29, CD43 und CD5 zwischen Kontroll- und Überträgerkühen näher charakterisieren.

4.3 Differenziell exprimierte Proteine auf der Zelloberfläche von PBL weisen auf ein unterschiedliches Immunrepertoire der Kühe hin

4.3.1 Die differenzielle Oberflächenexpression von CD61, CD43, CD29 und CD5 kann mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden

Mittels Durchflusszytometrie wurde das Expressionsmuster von CD61, CD43, CD29 und CD5 auf mehreren Kühen überprüft. Hierzu erfolgte zu jedem Antigen eine Färbung auf Lymphozyten von insgesamt je fünf Kontroll- und Überträgerkühen. Die niedrigere Expression der jeweiligen Antigene auf Überträger-PBL konnte mit dieser Methode bestätigt werden: CD61 wurde im Vergleich zu Kontrolllymphozyten (100% gesetzt) auf BNP-Lymphozyten nur zu 92% (Abb. 4.4 a) und CD43 nur zu 89% (Abb. 4.4 b) exprimiert. Von den Überträgerlymphozyten exprimierten ebenfalls nur 92% CD29 (Abb. 4.4 c). Diese drei Proteine zeigten also entsprechend der proteomischen Daten eine Tendenz zu niedrigerer Abundanz auf BNP-Lymphozyten, dies jedoch nicht signifikant. Bei der differenziellen Proteomanalyse war CD5 das zwischen Kontrollen und Überträgern am stärksten regulierte Protein. Auch die durchflusszytometrischen Daten bestätigten, dass CD5 auf BNP-Lymphozyten signifikant deutlich niedriger exprimiert wird. Im Vergleich zu Kontrolllymphozyten (100% gesetzt) exprimierten nur 70% der BNP-Lymphozyten das Protein CD5 (Abb. 4.4 d, ** $p \leq 0,01$).

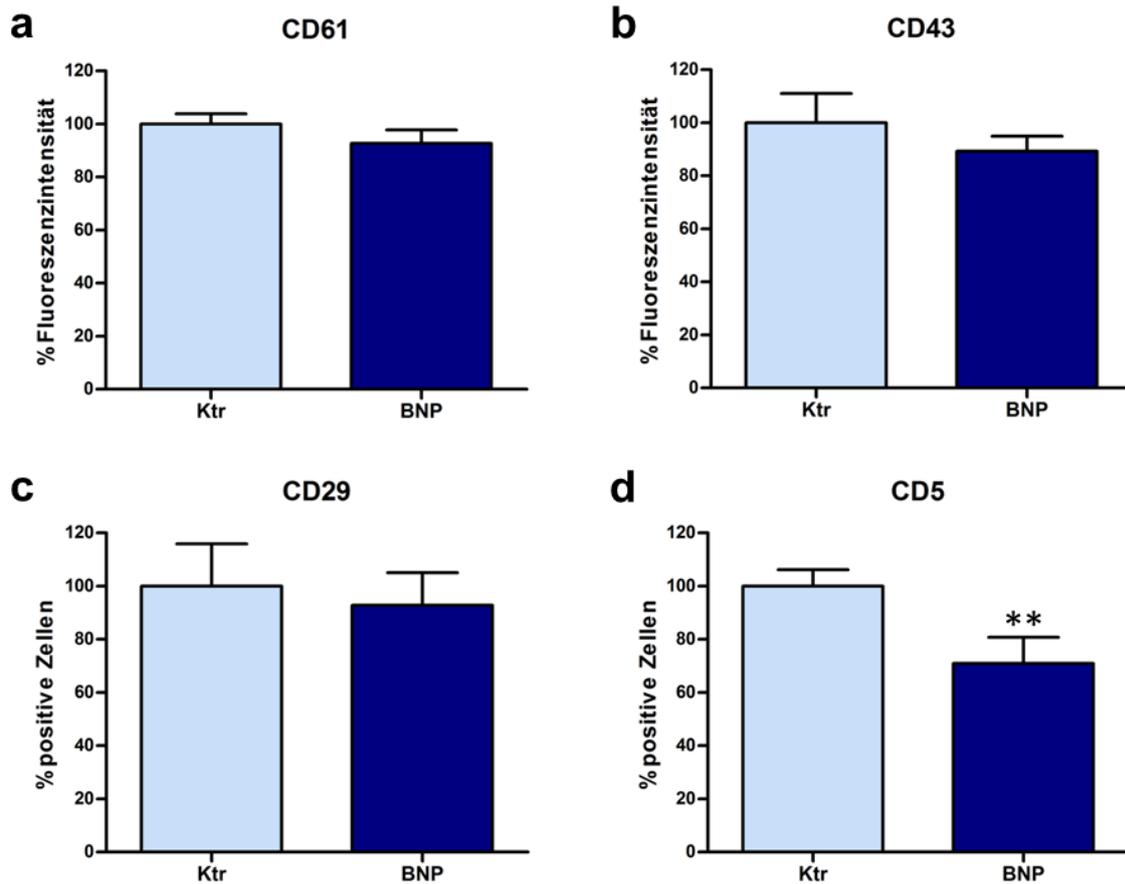


Abb. 4.4: Nachweis differenziell exprimierter Oberflächenproteine auf Kontroll- und Überträger-PBL mittels Durchflusszytometrie.

Die y-Achse beschreibt wie stark das jeweilige Antigen auf den Lymphozyten von Kontroll- (hellblaue Säulen, n = 5) und Überträgerkühen (dunkelblaue Säulen, n = 5) exprimiert ist (a: CD61, b: CD43) bzw. wieviel Prozent der Lymphozyten das Antigen exprimieren (c: CD29, d: CD5). Die Werte für Kontrolllymphozyten wurden zu 100% gesetzt. Im Vergleich zu den Kontrolllymphozyten exprimierten die Überträgerkühe CD61 nur zu 92%, CD43 zu 89%. CD29 wurde nur von 92% der Überträgerlymphozyten exprimiert und CD5 war auf Lymphozyten von BNP-Kühen signifikant auf 70% herunterreguliert (** $p \leq 0,01$). Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus fünf technisch unabhängigen Experimenten dar.

4.3.2 Differenzielle Gesamtexpression von CD5 kann mittels Western Blot bestätigt werden

Um die CD5-Expression auch in der gesamten Zelle vergleichen zu können, wurde im nächsten Schritt CD5 in PBL von mehreren Kontroll- und Überträgertieren im Western Blot detektiert. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie wird im Western Blot die Expression in der gesamten Zelle nachgewiesen, da hierbei Gesamtzelllysate untersucht werden und nicht nur Oberflächenantigene, wie in der Durchflusszytometrie. Die Intensität der CD5-Banden wurde mittels ImageJ-Software quantifiziert und die Werte von CD5 auf die Werte von beta Actin normalisiert.

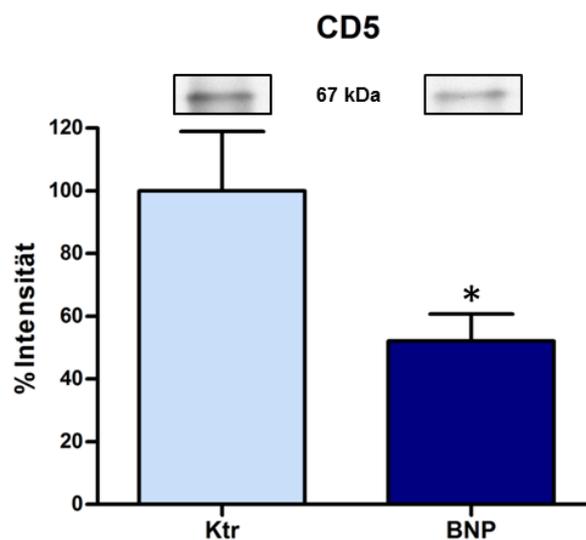


Abb. 4.5: Nachweis der differentiellen Expression von CD5 im Gesamtlysate von Kontroll- und Überträger-PBL im Western Blot.

Dargestellt ist die Intensität der CD5-Bande aus PBL-Lysaten von Kontroll- und Überträgertieren. Die Intensität der entsprechenden Banden wurde quantifiziert und auf beta Actin normalisiert. Die CD5-Expression im Western Blot war auf PBL von BNP-Überträgerkühen (dunkelblaue Säule, n = 5) im Vergleich zu Kontrollkühen (hellblaue Säule, n = 4, 100% gesetzt) signifikant auf 52% (* $p \leq 0,05$) reduziert.

Die niedrigere Expression von CD5 in Überträger-PBL ließ sich auch im Western Blot nachweisen: CD5 war im Gesamtlysate von BNP-PBL im Vergleich zu Kontroll-PBL (100%) auf 52% reduziert (Abb. 4.5, * $p \leq 0,05$). Dies zeigt auf, dass CD5 nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im gesamten Lymphozyten von BNP-Überträgern signifikant geringer abundant ist. Kontroll- und Überträgertiere weisen damit deutliche Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsmuster vor allem bei der CD5-Expression auf. Aufgrund der Funktion von CD5 als immunsuppressivem Rezeptor (Fenutria et

al. 2014) galt es nun, die funktionelle Bedeutung der veränderten CD5-Expression bei den BNP-Überträgern im Rahmen dieser Arbeit näher zu untersuchen. Die deutliche Bestätigung der niedrigeren Expression dieses herunterregulierenden Rezeptors auf BNP-Zellen festigte den Verdacht, dass die BNP-Kühe sich in ihren Immunreaktionen deutlich von den Kontrollkühen unterscheiden.

4.4 Abweichende Reaktion von BNP-Lymphozyten auf polyklonale Stimulation

4.4.1 Lymphozyten von Überträgerkühen zeigen hyperproliferativen Phänotyp auf polyklonale Stimulation

Um mögliche funktionelle Unterschiede bei der Immunantwort zwischen Kontroll- und Überträgerkühen nachzuweisen, wurden Lymphozyten *in vitro* mit verschiedenen Mitogenen polyklonal stimuliert. Nach 48 Stunden Inkubation konnte die Proliferationsrate der Zellen durch Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin in die zelluläre DNA mit einem Beta-Counter gemessen werden. Eine Gruppe der verwendeten Mitogene waren die Lektine Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed Mitogen (PWM). ConA bewirkt über CD28 durch eine Co-Stimulation von CD80 und CD86 vor allem eine T-Zellstimulation (Perrin et al. 1997). PHA ist ebenfalls ein reines T-Zell-Mitogen, das über CD2 den T-Zellrezeptor (TCR) aktiviert (Seggewiss et al. 2005). PWM hingegen ist ein Mitogen, das B- und T-Zellen über Quervernetzung von Glykoproteinen stimuliert (Bekeredjian-Ding et al. 2012). Als viertes polyklonales Stimulanz wurde Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) eingesetzt. PMA induziert über Proteinkinase C β I (PKC β I) eine Phosphorylierung von NF90^{Ser647}, was die IL-2 Produktion aktiviert und somit eine selektive T-Zellstimulation bewirkt (P. Zhu et al. 2010). Bei diesen Experimenten zeigte sich ein deutlich hyperproliferativer Phänotyp der BNP-PBL auf polyklonale Stimulation. Die Kontrolllymphozyten reagierten auf die ConA-Stimulation der Lymphozyten mit einer 13-fach gesteigerten Proliferationsrate im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 4.6). Interessanterweise reagierten die Überträgerzellen im Vergleich zu ihren unstimulierten Zellen auf ConA-Stimulation mit einer 105-fach gesteigerten Proliferationsrate. Dies entspricht einer acht Mal stärkeren Proliferation von Überträgerlymphozyten im Vergleich zu Kontrolllymphozyten durch polyklonale T-Zellstimulation mit ConA (***) $p \leq 0,001$,

Abb. 4.6 a). Das T-Zell-Mitogen PHA bewirkte bei den Kontrolllymphozyten eine Steigerung der Proliferationsrate um den Faktor 12 der unstimulierten Kontrollzellen. Die Überträgerzellen proliferierten auf PHA, gemessen an ihrer Mediumkontrolle, 63 Mal mehr. Somit reagierten die Überträgerzellen um den Faktor fünf stärker auf PHA als die Kontrollzellen (Abb. 4.6 b, *** $p \leq 0,001$). Durch Stimulation mit PMA, ebenfalls einem reinen T-Zell-Mitogen, proliferierten die Zellen der Kontrolltiere vier Mal stärker als ihre unstimulierten Ansätze. Die Überträgerzellen proliferierten sechs Mal mehr als ihre Mediumkontrolle. Insgesamt proliferierten die stimulierten Überträgerlymphozyten damit um den Faktor 1,6 stärker als die stimulierten Kontrolllymphozyten, ebenfalls mit einem statistisch signifikantem Unterschied (Abb. 4.6 c, ** $p \leq 0,01$). Die Stimulation mit dem B- und T-Zell-Mitogen PWM bewirkte bei den Kontrollzellen eine 11-fache, bei den Überträgerzellen eine 51-fache Steigerung der Proliferationsrate. Damit reagierten die Überträgertiere rund fünf Mal stärker auf PWM als die Kontrolltiere (Abb. 4.6 d, *** $p \leq 0,001$).

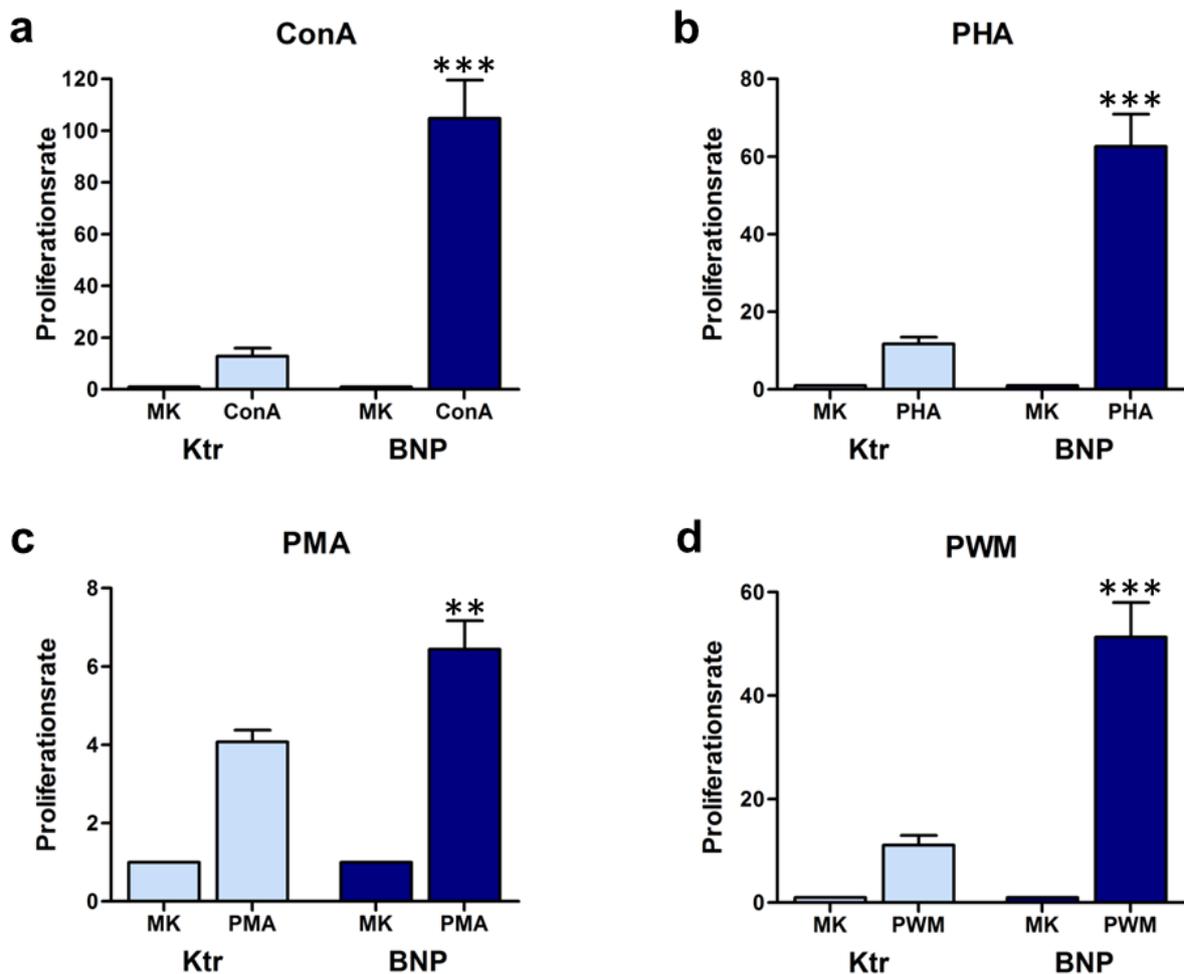


Abb. 4.6: Die polyklonale Stimulation peripherer Blutlymphozyten bewirkt eine deutlich abweichende Reaktion von Kontroll- und Überträgerlymphozyten.

Dargestellt ist der Grad der Zellproliferation von Kontrolllymphozyten (hellblaue Säulen, $n = 4$) und Überträgerlymphozyten (dunkelblaue Säulen, $n = 4$) auf verschiedene polyklonale Stimulantien nach 48 Stunden Inkubation (a: ConA (5 $\mu\text{g/ml}$), b: PHA (5 $\mu\text{g/ml}$), c: PMA (1 $\mu\text{g/ml}$), d: PWM (5 $\mu\text{g/ml}$)). Der Proliferationsfaktor entspricht der Differenz der counts per minute (cpm) im Beta-Counter von stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen (MK, Mediumkontrolle). Dabei wurde für jedes getestete Tier der Wert der stimulierten Ansätze auf den Wert der unstimulierten Mediumkontrolle bezogen (Proliferationsrate der Mediumkontrolle entspricht 1). a) Die mit ConA stimulierten Kontrollzellen proliferierten 13 Mal stärker als die unstimulierten Kontrollzellen. Die ConA stimulierten Überträgerzellen proliferierten 105 Mal mehr als die unstimulierten Überträgerzellen. Damit proliferierten ConA stimulierte Überträgerlymphozyten um den Faktor acht stärker als stimulierte Kontrolllymphozyten (** $p \leq 0,001$). b) Mit PHA stimulierte Kontrolllymphozyten proliferierten im Verhältnis zu ihrer Mediumkontrolle um den Faktor zwölf mehr, PHA stimulierte Überträgerlymphozyten um den Faktor 63. PHA stimulierte Überträgerzellen proliferierten somit 5-fach stärker als die Kontrollzellen (** $p \leq 0,001$). c) PMA bewirkte bei den Kontrollzellen eine Proliferation um den Faktor vier im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Die PMA stimulierten Überträgerzellen proliferierten sechs Mal stärker als die unstimulierten Überträgerzellen und damit um den Faktor 1,6 stärker als die PMA stimulierten Kontrollzellen (** $p \leq 0,01$). d) PWM Stimulation bewirkte bei Kontrolllymphozyten eine 11-fach und bei den Überträgerlymphozyten eine 51-fach gesteigerte Proliferationsrate. Dies bedeutet, dass die Überträger fast fünf Mal stärker auf polyklonale Stimulation mit PWM reagierten (** $p \leq 0,001$). Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus sechs technisch unabhängigen Experimenten dar.

Bei diesem Versuch wurde deutlich, dass die Zellen der Überträgerkühe stark überschießend auf alle getesteten Arten von polyklonaler Stimulation reagieren. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen reiner T-Zell- bzw. B- und T-Zellstimulation. BNP-Überträgerkühe weichen damit hochsignifikant von der physiologischen Reaktion von Kontroll-Kühen auf Immunstimuli ab.

4.4.2 Proteine von Kontroll- und Überträgerlymphozyten werden nach Stimulation mit PWM sehr deutlich differenziell reguliert

Im nächsten Schritt galt es nun festzustellen, wie die Zellen auf molekularer Ebene auf die polyklonale Stimulation reagieren. Dabei war von besonderem Interesse, wie sich ihr Expressionsmuster nach Stimulation ändert und welche Unterschiede sich bei der Proteinexpression zwischen Kontroll- und Überträgerleukozyten feststellen lassen. Um dies herauszufinden, wurde eine quantitative, differenzielle Proteomanalyse von unstimulierten und stimulierten Kontroll- und Überträger-PBL angefertigt. Da bei diesem Versuch Expressionsänderungen von Proteinen in B- und T-Zellen von Interesse waren, wurden die Zellen mit dem B- und T-Zell-Mitogen

PWM stimuliert und eine ansonsten in gleicher Weise behandelte Mediumkontrolle angesetzt, um einen Bezug zum Proteom unstimulierter, sonst aber gleich behandelter Zellen herstellen zu können. Nach 48-stündiger Stimulation und Ernte der Zellen wurden diese anhand einer neuartigen Methode in die drei Bereiche Plasmazellmembranoberfläche, Zytosol und Nukleus aufgetrennt. Diese Methode ermöglicht es, das Proteom von Zellen in der größtmöglichen analytischen Breite zu charakterisieren, dabei jedoch die Änderung in der Proteinausstattung der einzelnen Zellkompartimente getrennt zu betrachten. Da im Immungeschehen vor allem Proteine auf der Zelloberfläche von Interesse sind, war die Möglichkeit zur getrennten Betrachtung der Zellkompartimente hier von entscheidender Bedeutung. Dieses Experiment stellt die Erstbeschreibung des Proteoms von unstimulierten und PWM-stimulierten Rinderlymphozyten bei den einzelnen Zellkompartimenten dar. Mit Hilfe dieses Datensatzes kann zukünftig die Art der Immunstimulation näher charakterisiert werden, die PWM auf das Immunsystem von Rindern ausübt. Nach Fraktionierung wurde die Proteinausstattung jeder Zellfraktion massenspektrometrisch bestimmt und Unterschiede bei der Proteinexpression zwischen PWM-stimulierten Zellen von Kontroll- und Überträgertieren quantitativ ausgewertet. Dabei wurde für die Kompartimente Plasmazellmembranoberfläche, Zytosol und Nukleus separat verglichen, welche Proteine von Kontroll- oder Überträgerzellen nach Stimulation mit PWM mindestens um den Faktor 2 höher exprimiert wurden.

4.4.2.1 Auf der Plasmazellmembranoberfläche von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Aus der Fraktion der Plasmazellmembranoberfläche von Kontroll- und Überträgerlymphozyten wurden insgesamt 487 Proteine eindeutig identifiziert. Nach PWM-Stimulation regulierten mit PregSure BVD geimpfte Kontrollrinder 110 Proteine davon hoch (Tab. 4.1).

Ergebnisse

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Keratin, type I cuticular	ENSBTAP00000012807	22,4
2	Cationic amino acid transporter 3	ENSBTAP00000012324	22,0
3	Cationic amino acid transporter 3	ENSBTAP00000020054	14,8
4	CKLF MARVEL transmembrane protein 7	ENSBTAP00000002243	9,9
5	Keratin, type II cuticular	ENSBTAP00000008857	9,5
6	Keratin, type I cytoskeletal	ENSBTAP00000006450	8,1
7	CD64	ENSBTAP00000011333	7,3
8	Kell blood group, metallo-endopeptidase	ENSBTAP00000019317	6,9
9	AHNAK nucleoprotein	ENSBTAP00000048477	6,6
10	ATP-binding cassette sub-family B member 6	ENSBTAP00000027459	5,6
11	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	ENSBTAP00000014882	5,6
12	Keratin, type I cytoskeletal 14	ENSBTAP00000036252	5,5
13	Macrophage mannose receptor 1	ENSBTAP00000051181	5,3
14	Signal-regulatory protein beta 1	ENSBTAP00000012873	5,2
15	Cadherin-17	ENSBTAP00000043215	5,1
16	Toll-like receptor 2 (TLR2)	ENSBTAP00000010530	4,6
17	CD55	ENSBTAP00000009178	4,1
18	Carbonic anhydrase 4	ENSBTAP00000023909	4,1
19	B-cell receptor complex-associated protein alpha	ENSBTAP00000002451	4,1
20	Plasmalemma vesicle-associated protein	ENSBTAP00000050022	4,0
21	Secretory carrier-associated membrane protein 2	ENSBTAP00000007681	4,0
22	CD32	ENSBTAP00000029114	4,0
23	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	ENSBTAP00000002019	4,0
24	Y+L amino acid transporter 1	ENSBTAP00000019737	4,0
25	Multidrug resistance-associated protein 4	ENSBTAP00000036813	3,9
26	Aquaporin-1	ENSBTAP00000000993	3,7
27	CD81	ENSBTAP00000054606	3,7
28	Band 3 anion transport protein	ENSBTAP00000002116	3,7
29	Transmembrane emp24 protein transport domain 4 (TMED4)	ENSBTAP00000014027	3,6
30	Epithelial membrane protein 1	ENSBTAP00000047239	3,5
31	MHC Class I JSP.1	ENSBTAP00000011795	3,5
32	Platelet-activating factor receptor	ENSBTAP00000038567	3,4
33	Legumain	ENSBTAP00000053922	3,4
34	Ammonium transporter type A	ENSBTAP00000015012	3,4
35	Lysosome-associated membrane glycoprotein 3	ENSBTAP00000008608	3,3
36	Glycophorin B	ENSBTAP00000054507	3,3
37	Napsin A aspartic peptidase	ENSBTAP00000008917	3,3
38	NOP58 ribonucleoprotein	ENSBTAP00000007254	3,3
39	Fc gamma 2 receptor	ENSBTAP00000005286	3,2
40	CD23	ENSBTAP00000042894	3,2
41	CD180	ENSBTAP00000008348	3,2
42	FAM3C	ENSBTAP00000030039	3,2

Tab. 4.1, Proteine 1-42: Hochregulierte Oberflächenproteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.72)

Ergebnisse

43	Glycophorin A	ENSBTAP00000049850	3,1
44	CD79b	ENSBTAP00000053195	3,1
45	CD19	ENSBTAP00000008598	3,1
46	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	ENSBTAP00000052823	3,0
47	Cytochrome b-245 heavy chain	ENSBTAP00000026580	3,0
48	IgM heavy chain constant region	ENSBTAP00000030521	3,0
49	ADP-ribosyltransferase 4	ENSBTAP00000011000	3,0
50	Keratin, type II cytoskeletal	ENSBTAP00000000396	3,0
51	CD11d	ENSBTAP00000026008	3,0
52	CD37	ENSBTAP00000015173	2,9
53	Solute carrier family 12, member 7	ENSBTAP00000038997	2,9
54	Zinc metalloproteinase	ENSBTAP00000053228	2,9
55	IgM heavy chain constant region, secretory form	ENSBTAP00000001613	2,9
56	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor	ENSBTAP00000027807	2,8
57	FAM49B	ENSBTAP00000040143	2,8
58	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha	ENSBTAP00000034179	2,8
59	CD74	ENSBTAP00000020261	2,7
60	Stomatin	ENSBTAP00000015136	2,6
61	Killer cell lectin receptor subfamily G, member 1	ENSBTAP00000018130	2,6
62	CD22	ENSBTAP00000015781	2,6
63	NADP	ENSBTAP00000018741	2,6
64	MHC class I heavy chain isoform 1	ENSBTAP00000031126	2,6
65	HLA class II, DM beta chain	ENSBTAP00000016520	2,6
66	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	ENSBTAP00000027630	2,5
67	Leucine-rich repeat-containing protein 25	ENSBTAP00000022955	2,5
68	Tyrosine phosphatase non-receptor type substrate 1	ENSBTAP00000009488	2,5
69	Arginine repetitive matrix 1	ENSBTAP00000053480	2,5
70	Cytochrome c oxidase subunit 5A	ENSBTAP00000022949	2,5
71	Integrin alpha M	ENSBTAP00000054571	2,5
72	Succinate dehydrogenase	ENSBTAP00000054495	2,5
73	UL16 binding protein 3	ENSBTAP00000050046	2,5
74	Perforin-1	ENSBTAP00000001336	2,4
75	Immunoglobulin lambda	ENSBTAP00000056049	2,4
76	Thrombomodulin	ENSBTAP00000052487	2,4
77	Major histocompatibility complex, class II, DO beta	ENSBTAP00000055511	2,3
78	T-cell surface glycoprotein CD1a	ENSBTAP00000009739	2,3
79	Rho-related GTP-binding protein	ENSBTAP00000000453	2,3
80	Non-classical MHC class I	ENSBTAP00000021451	2,3
81	Mannosidase, alpha, class 2A, member 1	ENSBTAP00000040252	2,3
82	Transmembrane protein	ENSBTAP00000016043	2,3
83	Thioredoxin domain-containing protein 5	ENSBTAP00000054935	2,3
84	CD53	ENSBTAP00000008479	2,3
85	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	ENSBTAP00000028853	2,2

Tab. 4.1, Proteine 43-85: Hochregulierte Oberflächenproteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.72)

86	CD59	ENSBTAP00000002967	2,2
87	Proactivator polypeptide	ENSBTAP00000028655	2,2
88	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	ENSBTAP00000011505	2,2
89	Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	ENSBTAP00000012810	2,2
90	Apolipoprotein F	ENSBTAP00000005751	2,2
91	Niemann-Pick C1 protein	ENSBTAP00000020219	2,2
92	Cytochrome c1, heme protein	ENSBTAP00000016224	2,2
93	Tweety	ENSBTAP00000007792	2,2
94	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	ENSBTAP00000025422	2,2
95	HLA class II, DR alpha chain	ENSBTAP00000014072	2,2
96	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	ENSBTAP00000045192	2,1
97	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for CD32	ENSBTAP00000045494	2,1
98	C-C chemokine receptor type 1	ENSBTAP00000025880	2,1
99	Vanin 2	ENSBTAP00000021759	2,1
100	Phosphogluconate dehydrogenase	ENSBTAP00000017988	2,1
101	Thioredoxin domain containing 5	ENSBTAP00000025617	2,1
102	Transmembrane 9 superfamily member 2	ENSBTAP00000002080	2,0
103	Transmembrane protein 87A	ENSBTAP00000011671	2,0
104	Platelet glycoprotein	ENSBTAP00000023750	2,0
105	Aspartate aminotransferase	ENSBTAP00000009440	2,0
106	Serine/threonine-protein kinase PRP4	ENSBTAP00000002695	2,0
107	NAD(P) transhydrogenase	ENSBTAP00000015769	2,0
108	Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2	ENSBTAP00000040467	2,0
109	Epithelial membrane protein 3	ENSBTAP00000023976	2,0
110	Primary amine oxidase, lung isozyme	ENSBTAP00000040442	2,0

Tab. 4.1: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine der Plasmazellmembranoberfläche, die bei geimpften Kontrollkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei Überträgerkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Kontroll-PBL zu PWM-stimulierten Überträger-PBL.

4.4.2.2 Auf der Plasmazellmembranoberfläche von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Von den insgesamt 487 Proteinen, die aus der Fraktion der Plasmazellmembranoberfläche identifiziert wurden, regulierten die BNP-Überträgerkühe nach PWM-Stimulation überraschenderweise nur sieben Proteine hoch (Tab. 4.2).

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Major histocompatibility complex, class I, A	ENSBTAP00000031125	46,3
2	CD85h (LILRA2)	ENSBTAP00000056185	5,2
3	BOLA-DQA1 (MHCII)	ENSBTAP00000019939	5,2
4	Major histocompatibility complex, class I	ENSBTAP00000048068	3,7
5	Galectin-3	ENSBTAP00000041298	2,8
6	Non-classical MHC class I, isoform X3	ENSBTAP00000035741	2,4
7	CD103	ENSBTAP00000020307	2,1

Tab. 4.2: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine der Plasmazellmembranoberfläche, die bei Überträgerkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei geimpften Kontrollkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Überträger-PBL zu PWM-stimulierten Kontroll-PBL.

Wie aus den Tabellen 4.1 und 4.2 ersichtlich wird, unterschieden sich die Zelloberflächen von Kontroll- und Überträgerlymphozyten nach Stimulation mit PWM deutlich in ihrem Proteinrepertoire. Im Vergleich zu BNP-Kühen waren bei Kontrollkühen nach PWM-Stimulation auf der Plasmazellmembranoberfläche 110 Proteine mindestens 2-fach hochreguliert (Tab. 4.1). Überträgerkühe hingegen wiesen nach PWM-Stimulation nur sieben hochregulierte Proteine (Tab. 4.2) auf, regulierten also deutlich weniger Proteine hoch als die Kontrollkühe. Hierbei wurde an bestimmten Proteinen deutlich, dass Kontroll- und Überträgerkühe nach polyklonaler Stimulation der T- und B-Zellen substanziiell verschieden reagieren und sich dabei auch ganz anderer Pfade der Immunreaktion bedienen. So wurde von Kontrollkühen zum Beispiel der Toll-like Rezeptor (TLR) 2 (Tab. 4.1 Protein 16) als wichtiger Bestandteil des Immunsystems hochreguliert, der bei der Immunabwehr von Infektionserregern eine wichtige Rolle spielt (Liu et al. 2014). Bei den Überträgern dagegen war CD103 (Integrin alpha E, Tab. 4.2 Protein 7) hochreguliert. CD103 ist ein Protein, das auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und eine Immunsuppression verursacht (Pastille et al. 2014). Des Weiteren kommt es auf dendritischen Zellen (DCs) vor, die Antigene an T-Zellen präsentieren (Farache et al. 2013) und als tolerogene DCs Immunsuppression verursachen können (Torres-Aguilar et al. 2010). Durch diese vollkommen unterschiedliche Reaktion der Zellen auf die polyklonale Stimulation ergaben sich aus der differenziellen Proteomanalyse erste Hinweise darauf, dass die Überträgerkühe einen ganz anderen Pfad der Immunreaktion nutzen.

4.4.2.3 Im Zytosol von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Aus dem Zytosol von Kontroll- und Überträgerlymphozyten wurden insgesamt 1605 Proteine eindeutig identifiziert. Nach PWM-Stimulation regulierten die Kontrollrinder davon 166 Proteine hoch (Tab. 4.3).

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	ENSBTAP00000053776	2910,2
2	Vitronectin	ENSBTAP00000021497	117,5
3	Vacuolar protein sorting 13 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	ENSBTAP00000043730	55,4
4	Olfactory receptor, family 5, subfamily I, member 1	ENSBTAP00000056293	44,3
5	Transcriptional activator Myb	ENSBTAP00000016017	17,0
6	Glucosamine-6-phosphate isomerase 2	ENSBTAP00000000357	13,0
7	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	ENSBTAP00000016712	9,6
8	Retinal dehydrogenase 1	ENSBTAP00000010661	9,3
9	Carbonic anhydrase 2	ENSBTAP00000023581	7,4
10	Far upstream element-binding protein 1	ENSBTAP00000011751	6,9
11	NipSnap	ENSBTAP00000029502	6,7
12	Vesicle-associated membrane protein 3	ENSBTAP00000019438	6,1
13	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	ENSBTAP00000004152	6,1
14	L-asparaginase	ENSBTAP00000009073	5,5
15	XRP2	ENSBTAP00000007225	5,5
16	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	ENSBTAP00000054196	4,8
17	Ankyrin 1, erythrocytic	ENSBTAP00000004242	4,7
18	Erythrocyte membrane protein band 4.2	ENSBTAP00000035838	4,6
19	Uridine phosphorylase 1	ENSBTAP00000011088	4,5
20	Immunoglobulin IgA heavy chain constant region	ENSBTAP00000054179	4,5
21	Band 3 anion transport protein	ENSBTAP00000002116	4,4
22	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	ENSBTAP00000002019	4,3
23	CD74	ENSBTAP00000020261	4,2
24	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	ENSBTAP00000042524	4,1
25	Ribonuclease UK114	ENSBTAP00000016718	4,0
26	Sulfotransferase 1A1	ENSBTAP00000011388	4,0
27	Nucleoside diphosphate kinase A 1	ENSBTAP00000006106	3,9
28	Kinesin family member 13B	ENSBTAP00000022902	3,9
29	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ENSBTAP00000008754	3,8
30	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	ENSBTAP00000034179	3,8
31	SMG5	ENSBTAP00000012415	3,7
32	Transgelin-2	ENSBTAP00000002674	3,5
33	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	ENSBTAP00000031532	3,5
34	Matrix metalloproteinase-9	ENSBTAP00000027556	3,5
35	ATP-Synthase subunit gamma, mitochondrial	ENSBTAP00000018505	3,5

Tab. 4.3, Proteine 1-35: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.78)

Ergebnisse

36	Annexin A4	ENSBTAP00000001463	3,5
37	HLA class II, DQ alpha 1 chain	ENSBTAP00000019800	3,5
38	S100-A12	ENSBTAP00000034009	3,4
39	Ras-related protein Rap-1A	ENSBTAP00000019575	3,4
40	Pleckstrin	ENSBTAP00000012724	3,4
41	ATP synthase subunit d, mitochondrial	ENSBTAP00000028282	3,4
42	Hemoglobin subunit alpha	ENSBTAP00000022034	3,4
43	CD20	ENSBTAP00000006236	3,3
44	Hexokinase 3	ENSBTAP00000019834	3,3
45	GTPase, IMAP family member 7	ENSBTAP00000041333	3,2
46	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	ENSBTAP00000001668	3,2
47	Nucleoside diphosphate kinase B	ENSBTAP00000041066	3,2
48	GTP:AMP phosphotransferase, mitochondrial	ENSBTAP00000022789	3,2
49	Cathepsin S	ENSBTAP00000022774	3,1
50	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	ENSBTAP00000022949	3,1
51	RNASSET2	ENSBTAP00000019270	3,1
52	Neutrophil cytosol factor 4	ENSBTAP00000009911	3,1
53	Perilipin-2	ENSBTAP00000007519	3,1
54	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	ENSBTAP00000006715	3,0
55	Heat shock protein HSP 90-beta	ENSBTAP00000056225	3,0
56	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1E	ENSBTAP00000014279	3,0
57	Ragulator complex protein LAMTOR2	ENSBTAP00000045185	3,0
58	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	ENSBTAP00000006432	3,0
59	V-type proton ATPase subunit E 1	ENSBTAP00000037526	2,9
60	Cathepsin H	ENSBTAP00000014593	2,9
61	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	ENSBTAP00000019699	2,9
62	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1, Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	ENSBTAP00000024107	2,9
63	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	ENSBTAP00000055446	2,9
64	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor	ENSBTAP00000027807	2,8
65	Cathepsin Z	ENSBTAP00000025007	2,8
66	Macrophage-capping protein	ENSBTAP00000007150	2,8
67	Tubulin, beta 1	ENSBTAP00000025008	2,8
68	Histone H3.3	ENSBTAP00000034086	2,8
69	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit gamma	ENSBTAP00000026818	2,8
70	Hemoglobin fetal subunit beta	ENSBTAP00000050256	2,8
71	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	ENSBTAP00000052671	2,7
72	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	ENSBTAP00000021569	2,7
73	Histone H4	ENSBTAP00000025810	2,7
74	Isocitrate dehydrogenase	ENSBTAP00000027348	2,7
75	RNA-binding protein FUS	ENSBTAP00000007571	2,7
76	Cathepsin B	ENSBTAP00000036650	2,7
77	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	ENSBTAP00000029203	2,6
78	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	ENSBTAP00000000100	2,6

Tab. 4.3, Proteine 36-78: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.78)

Ergebnisse

79	CUGBP, Elav family member 2	ENSBTAP00000011768	2,6
80	Mitochondrial fission 1 protein	ENSBTAP00000010389	2,6
81	Keratin 3	ENSBTAP00000054280	2,6
82	Family with sequence similarity 129, member B	ENSBTAP00000017069	2,6
83	Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1A	ENSBTAP00000029336	2,5
84	Latexin	ENSBTAP00000042184	2,5
85	CD180	ENSBTAP00000008348	2,5
86	Coagulation factor XIII A	ENSBTAP00000009559	2,5
87	Hemoglobin subunit beta	ENSBTAP00000043063	2,5
88	60S acidic ribosomal protein P2	ENSBTAP00000002326	2,5
89	N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase	ENSBTAP00000025945	2,5
90	Proteasome subunit beta type-8	ENSBTAP00000003955	2,5
91	Keratin, type I cytoskeletal 10	ENSBTAP00000017140	2,5
92	Secretory carrier-associated membrane protein 1	ENSBTAP00000009693	2,4
93	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ENSBTAP00000007527	2,4
94	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	ENSBTAP00000010949	2,4
95	Osteoclast-stimulating factor 1	ENSBTAP00000003560	2,4
96	Cullin 4A	ENSBTAP00000026769	2,4
97	Proteolipid protein 2	ENSBTAP00000021425	2,4
98	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	ENSBTAP00000005628	2,4
99	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	ENSBTAP00000029026	2,4
100	Alpha-S2-casein, Casocidin-1	ENSBTAP00000006590	2,3
101	Cytochrome b-245 heavy chain	ENSBTAP00000026580	2,3
102	WDFY family member 4	ENSBTAP00000031248	2,3
103	Xanthine dehydrogenase/oxidase	ENSBTAP00000016620	2,3
104	Histamine N-methyltransferase	ENSBTAP00000019196	2,3
105	Arginase-2, mitochondrial	ENSBTAP00000002529	2,3
106	Cystatin-B	ENSBTAP00000000683	2,3
107	5'-nucleotidase domain containing 3	ENSBTAP00000007899	2,3
108	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	ENSBTAP00000028330	2,3
109	Dihydropyrimidinase-related protein 2	ENSBTAP00000024448	2,3
110	MHC class I heavy chain isoform 1	ENSBTAP00000031126	2,2
111	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	ENSBTAP00000042536	2,2
112	Proteasome subunit alpha type-7	ENSBTAP00000006760	2,2
113	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	ENSBTAP00000017430	2,2
114	KH-type splicing regulatory protein	ENSBTAP00000027991	2,2
115	Tweety homolog 3 (Drosophila)	ENSBTAP00000007792	2,2
116	Gelsolin a	ENSBTAP00000026534	2,2
117	Heat shock protein beta-1	ENSBTAP00000015883	2,2
118	HLA class II, DR alpha chain	ENSBTAP00000014072	2,2
119	Long chain fatty acid CoA ligase 6	ENSBTAP00000008826	2,2
120	Transmembrane protein C2orf18	ENSBTAP00000024978	2,2
121	Growth factor receptor-bound protein 2	ENSBTAP00000006216	2,2

Tab. 4.3, Proteine 79-121: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.78)

Ergebnisse

122	CKLF MARVEL transmembrane domain-containing protein 7	ENSBTAP00000002243	2,2
123	Proteasome subunit alpha type-1	ENSBTAP00000008621	2,2
124	Lysozyme C, non-stomach isozyme	ENSBTAP00000038081	2,2
125	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	ENSBTAP00000023642	2,2
126	Sorcin	ENSBTAP00000052219	2,2
127	Proteasome subunit alpha type-4	ENSBTAP00000019203	2,1
128	Histone H1.1	ENSBTAP00000015499	2,1
129	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	ENSBTAP00000031993	2,1
130	Beta-lactoglobulin	ENSBTAP00000019538	2,1
131	Arylsulfatase B	ENSBTAP00000010988	2,1
132	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-2	ENSBTAP00000003959	2,1
133	Proteasome subunit beta type-4	ENSBTAP00000028364	2,1
134	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ENSBTAP00000024326	2,1
135	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	ENSBTAP00000026686	2,1
136	Histone H2A.V	ENSBTAP00000022576	2,1
137	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	ENSBTAP00000027191	2,1
138	Plasminogen receptor	ENSBTAP00000023306	2,1
139	NmrA family domain-containing protein 1	ENSBTAP00000013208	2,1
140	Cathepsin D	ENSBTAP00000010022	2,1
141	Thiopurine S-methyltransferase	ENSBTAP00000025698	2,1
142	Keratin 1	ENSBTAP00000055471	2,1
143	Ras-related protein Ral-B	ENSBTAP00000026694	2,1
144	Macrophage mannose receptor 1	ENSBTAP00000051181	2,1
145	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	ENSBTAP00000012542	2,1
146	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	ENSBTAP00000032384	2,1
147	Fructose-bisphosphate aldolase C	ENSBTAP00000017416	2,0
148	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha	ENSBTAP00000000596	2,0
149	H2A histone family, member Y	ENSBTAP00000021436	2,0
150	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ENSBTAP00000014953	2,0
151	Fumarate hydratase, mitochondrial	ENSBTAP00000028902	2,0
152	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	ENSBTAP00000022054	2,0
153	Flightless I homolog (Drosophila)	ENSBTAP00000021517	2,0
154	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	ENSBTAP00000000630	2,0
155	Thioredoxin	ENSBTAP00000041860	2,0
156	Procollagen galactosyltransferase 1	ENSBTAP00000016841	2,0
157	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	ENSBTAP00000015889	2,0
158	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	ENSBTAP00000022378	2,0
159	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	ENSBTAP00000016399	2,0
160	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ENSBTAP00000033996	2,0
161	LSm2	ENSBTAP00000007405	2,0
162	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	ENSBTAP00000025870	2,0
163	Proteasome subunit alpha type-6	ENSBTAP00000012773	2,0
164	Galectin-9 isoform 1	ENSBTAP00000009005	2,0

Tab. 4.3, Proteine 122-164: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.78)

165	Guanylate kinase	ENSBTAP00000019656	2,0
166	Adenosine deaminase protein	ENSBTAP00000019248	2,0

Tab. 4.3: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine des Zytosols, die bei geimpften Kontrollkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei Überträgerkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Kontroll-PBL zu PWM-stimulierten Überträger-PBL.

4.4.2.4 Im Zytosol von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Von den insgesamt 1605 Proteinen, die aus der zytosolischen Fraktion der Zellen identifiziert wurden, regulierten die BNP-Überträgerkühe nach PWM-Stimulation mit 105 Proteinen (Tab. 4.4) erneut weniger Proteine hoch als die Kontrollkühe.

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Phosphoglycerate mutase 2	ENSBTAP00000019336	infinity
2	Cytochrome b-c1 complex subunit 10	ENSBTAP00000011458	1773,0
3	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	ENSBTAP00000014440	153,9
4	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	ENSBTAP00000026261	65,1
5	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	ENSBTAP00000050572	36,7
6	CREB-binding protein	ENSBTAP00000005092	32,4
7	CapZ-interacting protein	ENSBTAP00000018808	28,8
8	Deoxyguanosine kinase, mitochondrial	ENSBTAP00000044459	27,2
9	MHC Class I JSP.1	ENSBTAP00000011795	24,0
10	Homeobox prox 1	ENSBTAP00000029256	18,0
11	Farnesyl-geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	ENSBTAP00000004159	17,9
12	Inverted formin, FH2 and WH2 domain	ENSBTAP00000012349	17,6
13	Golgi phosphoprotein 3	ENSBTAP00000027131	15,7
14	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	ENSBTAP00000001782	15,7
15	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB	ENSBTAP00000008756	15,2
16	Centromere/kinetochore protein zw10	ENSBTAP00000026733	15,2
17	FAM115C	ENSBTAP00000007200	12,6
18	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	ENSBTAP00000008848	11,8
19	Vesicle transport protein GOT1B	ENSBTAP00000000490	11,3
20	ATPase family AAA domain-containing protein 3	ENSBTAP00000012676	10,8
21	Zinc metallopeptidase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	ENSBTAP00000053228	9,8
22	Reticulocalbin-2	ENSBTAP00000020950	9,8
23	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	ENSBTAP00000000088	9,3
24	CD9	ENSBTAP00000019643	9,1
25	NHL repeat-containing protein 2	ENSBTAP00000004806	8,5

Tab. 4.4, Proteine 1-25: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Überträgerkühen (vgl. Legende S.80)

Ergebnisse

26	Pitriylsin metallopeptidase 1	ENSBTAP00000043531	8,3
27	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7	ENSBTAP00000002552	8,3
28	Tyrosine kinase 2-beta	ENSBTAP00000007819	8,2
29	DnaJ homolog subfamily A member 2	ENSBTAP00000004890	8,1
30	Tropomodulin 3 (ubiquitous)	ENSBTAP00000026116	6,2
31	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	ENSBTAP00000005808	6,1
32	AP-2 complex subunit beta	ENSBTAP00000027078	6,1
33	Intercellular adhesion molecule 2	ENSBTAP00000025884	5,8
34	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1 isoform 2	ENSBTAP00000030466	5,6
35	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8	ENSBTAP00000019342	5,4
36	Elongation factor 1-alpha	ENSBTAP00000017825	4,8
37	Ataxin-10	ENSBTAP00000012308	4,5
38	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	ENSBTAP00000025800	4,5
39	Integrin alpha-IIb	ENSBTAP00000010738	4,4
40	Nucleobindin-1	ENSBTAP00000003073	4,2
41	NADH dehydrogenase subunit 1	ENSBTAP00000053145	4,2
42	Protein kinase C, theta	ENSBTAP00000053216	4,1
43	SH2 domain-containing protein 1A	ENSBTAP00000036814	3,9
44	LUC7	ENSBTAP00000022041	3,8
45	Lysosome-associated membrane glycoprotein 3	ENSBTAP00000008608	3,8
46	Netrin 1	ENSBTAP00000016103	3,8
47	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	ENSBTAP00000025246	3,6
48	Serine/threonine kinase 39	ENSBTAP00000030814	3,6
49	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	ENSBTAP00000018100	3,4
50	Vpr (HIV-1) binding protein	ENSBTAP00000030640	3,4
51	Protein phosphatase 1F	ENSBTAP00000009109	3,4
52	Major histocompatibility complex, class I, A	ENSBTAP00000031125	3,4
53	Ribonucleotide reductase M2	ENSBTAP00000010802	3,3
54	Pleckstrin homology domain-containing family O member 2	ENSBTAP00000011069	3,2
55	Cullin-2	ENSBTAP00000051032	3,2
56	Queuine tRNA-ribosyltransferase 1	ENSBTAP00000050250	3,1
57	DCN1	ENSBTAP00000017002	3,1
58	BRO1 domain and CAAX motif	ENSBTAP00000009990	2,9
59	GDP-mannose 4,6 dehydratase	ENSBTAP00000015992	2,9
60	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	ENSBTAP00000019916	2,9
61	Valosin protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	ENSBTAP00000008802	2,9
62	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	ENSBTAP00000020990	2,8
63	Protein phosphatase 1B	ENSBTAP00000043518	2,8
64	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa	ENSBTAP00000014714	2,8
65	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	ENSBTAP00000014505	2,7
66	Glucosidase 2 subunit beta	ENSBTAP00000010787	2,7
67	Transport protein Sec24A	ENSBTAP00000040703	2,7
68	Bifunctional coenzyme A synthase	ENSBTAP00000027845	2,6
69	TH1 (Drosophila)	ENSBTAP00000025006	2,6

Tab. 4.4, Proteine 26-69: Hochregulierte Zytosol-Proteine bei Überträgerkühen (vgl. Legende S.80)

Ergebnisse

70	Nucleolar RNA helicase 2	ENSBTAP00000019351	2,6
71	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	ENSBTAP00000014162	2,6
72	MMS19 nucleotide excision repair	ENSBTAP00000053458	2,6
73	N-terminal kinase protein	ENSBTAP00000042855	2,5
74	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	ENSBTAP00000020277	2,5
75	Integrin beta-1	ENSBTAP00000021156	2,4
76	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	ENSBTAP00000015873	2,4
77	Keratin, type II cytoskeletal 73	ENSBTAP00000010393	2,4
78	SEC63 (<i>S. cerevisiae</i>)	ENSBTAP00000022030	2,4
79	Arylamine N-acetyltransferase 1	ENSBTAP00000045530	2,4
80	Dual specificity mitogen-activated protein kinase 3	ENSBTAP00000013983	2,4
81	Nucleosome assembly 4	ENSBTAP00000029889	2,3
82	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ENSBTAP00000022237	2,3
83	Exportin 7	ENSBTAP00000055736	2,3
84	Nucleoporin SEH1	ENSBTAP00000045994	2,2
85	Mitochondrial calcium uniporter	ENSBTAP00000005059	2,2
86	Elongator complex 4	ENSBTAP00000005990	2,2
87	Nucleolin, isoform CRA_b	ENSBTAP00000021529	2,2
88	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	ENSBTAP00000007043	2,2
89	Glycogenin-1	ENSBTAP00000002261	2,2
90	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	ENSBTAP00000011801	2,2
91	SET	ENSBTAP00000027913	2,2
92	40S ribosomal protein S7	ENSBTAP00000021587	2,2
93	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>)	ENSBTAP00000007309	2,1
94	GDP-mannose pyrophosphorylase A	ENSBTAP00000003897	2,1
95	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	ENSBTAP00000017694	2,1
96	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	ENSBTAP00000023234	2,1
97	Importin subunit alpha-7	ENSBTAP00000003764	2,1
98	WD repeat-containing protein 44	ENSBTAP00000024883	2,1
99	F-box only protein 7	ENSBTAP00000027498	2,1
100	Leupaxin	ENSBTAP00000047420	2,0
101	Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2	ENSBTAP00000040467	2,0
102	Suppressor of Ty 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	ENSBTAP00000027214	2,0
103	Translocon-associated protein subunit alpha	ENSBTAP00000008253	2,0
104	CTP synthase 1	ENSBTAP00000002131	2,0
105	Alpha-2-HS-glycoprotein	ENSBTAP00000000673	2,0

Tab. 4.4: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine des Zytosols, die bei Überträgerkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei geimpften Kontrollkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Überträger-PBL zu PWM-stimulierten Kontroll-PBL.

4.4.2.5 Im Zellkern von Kontrolllymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Aus der Fraktion des Zellkerns von Kontroll- und Überträgerlymphozyten konnten insgesamt 1598 Proteine eindeutig identifiziert werden. In Kontrolllymphozyten wurden davon 153 Proteine nach PWM-Stimulation hochreguliert (Tab. 4.5).

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Peptidoglycan recognition protein 1	ENSBTAP00000003414	14,7
2	Glycophorin A	ENSBTAP00000049850	7,5
3	NADH dehydrogenase	ENSBTAP00000052906	7,5
4	Tropomodulin-1	ENSBTAP00000019585	7,5
5	Enhancer of rudimentary	ENSBTAP00000023664	7,3
6	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	ENSBTAP00000002019	7,1
7	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	ENSBTAP00000007369	7,0
8	Splicing factor 3B subunit 5	ENSBTAP00000012920	6,7
9	Superoxide dismutase	ENSBTAP00000008569	6,3
10	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	ENSBTAP00000042500	5,8
11	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	ENSBTAP00000013734	5,7
12	Ankyrin 1, erythrocytic	ENSBTAP00000004242	5,4
13	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ENSBTAP00000020318	5,4
14	Nucleoside diphosphate kinase A 1	ENSBTAP00000006106	5,0
15	Cytochrome b5 type B	ENSBTAP00000003129	5,0
16	S100-A12	ENSBTAP00000034009	4,8
17	WDFY family member 4	ENSBTAP00000031248	4,7
18	Cathepsin K	ENSBTAP00000028016	4,6
19	SET	ENSBTAP00000027913	4,6
20	Myeloperoxidase	ENSBTAP00000016989	4,5
21	Napsin A aspartic peptidase	ENSBTAP00000008917	4,4
22	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5	ENSBTAP00000041501	4,3
23	Keratin 31	ENSBTAP00000023926	4,2
24	UV excision repair protein RAD23	ENSBTAP00000002506	4,1
25	Heat shock protein beta-1	ENSBTAP00000015883	4,1
26	High mobility group protein B1	ENSBTAP00000024094	4,0
27	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	ENSBTAP00000005628	3,9
28	DAZ associated protein 1	ENSBTAP00000026274	3,9
29	Histone H2A	ENSBTAP00000042479	3,9
30	Casein alpha-S2	ENSBTAP00000006590	3,8
31	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ENSBTAP00000007933	3,8
32	Erythrocyte membrane protein band 4.2	ENSBTAP00000035838	3,7
33	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	ENSBTAP00000022378	3,6
34	ATP synthase subunit d	ENSBTAP00000028282	3,6
35	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	ENSBTAP00000042524	3,5

Tab. 4.5, Proteine 1-35: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.84)

Ergebnisse

36	OCIA domain-containing protein 1	ENSBTAP00000014028	3,5
37	Hepatoma-derived growth factor 3	ENSBTAP00000024660	3,5
38	40S ribosomal protein S19	ENSBTAP00000015875	3,5
39	NHP2	ENSBTAP00000008022	3,4
40	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	ENSBTAP00000006432	3,4
41	IWS1	ENSBTAP00000028213	3,4
42	Fibrinogen beta chain	ENSBTAP00000029826	3,3
43	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ENSBTAP00000054193	3,3
44	Mitochondrial fission 1 protein	ENSBTAP00000010389	3,3
45	Ankyrin repeat domain-containing protein 22	ENSBTAP00000017781	3,2
46	High mobility group protein B2	ENSBTAP00000020096	3,1
47	Cathepsin B light and heavy chain	ENSBTAP00000036650	3,1
48	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subunit 11	ENSBTAP00000055738	3,0
49	Histone H2A.V	ENSBTAP00000022576	3,0
50	Golgi-associated plant pathogenesis protein 1	ENSBTAP00000000086	3,0
51	Tropomodulin-3	ENSBTAP00000055644	2,9
52	Histone H2B type 1	ENSBTAP00000024155	2,9
53	60S acidic ribosomal protein P2	ENSBTAP00000002326	2,9
54	Hemoglobin subunit alpha	ENSBTAP00000022034	2,9
55	tRNA methyltransferase 112	ENSBTAP00000011401	2,8
56	HLA class II, DR alpha chain	ENSBTAP00000014072	2,8
57	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	ENSBTAP00000015924	2,8
58	Macrophage-capping protein	ENSBTAP00000007150	2,8
59	Myosin regulatory light polypeptide 9	ENSBTAP00000021328	2,8
60	Plasminogen precursor	ENSBTAP00000001674	2,8
61	Far upstream element-binding protein 1	ENSBTAP00000011751	2,8
62	Hexokinase 3	ENSBTAP00000019834	2,7
63	Hemoglobin fetal subunit beta	ENSBTAP00000050256	2,7
64	MHC class I heavy chain isoform 1	ENSBTAP00000031126	2,7
65	Hemoglobin subunit beta	ENSBTAP00000043063	2,7
66	Immunoglobulin lambda	ENSBTAP00000031165	2,7
67	Sorcin	ENSBTAP00000052219	2,7
68	Transmembrane protein 109	ENSBTAP00000024427	2,7
69	Nuclear transcription factor Y subunit gamma	ENSBTAP00000029254	2,7
70	Cathepsin D	ENSBTAP00000010022	2,7
71	S100-A10	ENSBTAP00000020150	2,6
72	Hepatoma-derived growth factor	ENSBTAP00000008609	2,6
73	Chromatin licensing and DNA replication factor 1	ENSBTAP00000048486	2,6
74	Integrator complex subunit 8	ENSBTAP00000006451	2,6
75	Caprin-1	ENSBTAP00000022266	2,6
76	NAD-dependent malic enzyme	ENSBTAP00000021641	2,6
77	S100-A4	ENSBTAP00000025561	2,5
78	Kappa-casein	ENSBTAP00000028685	2,5
79	Phospholipase C, beta 3	ENSBTAP00000016609	2,5

Tab. 4.5, Proteine 36-79: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.84)

Ergebnisse

80	Neutrophil cytosol factor 4	ENSBTAP00000009911	2,5
81	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	ENSBTAP00000021397	2,5
82	Histone H2B	ENSBTAP00000038344	2,5
83	Nucleophosmin	ENSBTAP00000020363	2,5
84	Apoptosis-associated speck protein containing a CARD	ENSBTAP00000027359	2,5
85	Pleckstrin	ENSBTAP00000012724	2,5
86	Band 3 anion transport protein	ENSBTAP00000002116	2,4
87	Peroxiredoxin-1	ENSBTAP00000004751	2,4
88	Radixin	ENSBTAP00000006129	2,4
89	MHC Class I JSP.1	ENSBTAP00000011795	2,4
90	Spectrin, beta, erythrocytic	ENSBTAP00000006213	2,4
91	RNA-binding protein 8A	ENSBTAP00000011016	2,4
92	CD14	ENSBTAP00000020009	2,4
93	Myotrophin	ENSBTAP00000010269	2,4
94	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ENSBTAP00000007527	2,3
95	Peroxiredoxin-5	ENSBTAP00000011403	2,3
96	Heat shock 70kDa protein 5	ENSBTAP000000052422	2,3
97	ATP synthase protein 8	ENSBTAP000000053143	2,3
98	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	ENSBTAP00000028330	2,3
99	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	ENSBTAP000000055446	2,3
100	Translationally-controlled tumor protein	ENSBTAP00000013402	2,3
101	Integrin beta-2	ENSBTAP00000022687	2,3
102	Cleavage stimulation factor subunit 2	ENSBTAP00000004619	2,3
103	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	ENSBTAP00000029284	2,3
104	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin e1	ENSBTAP00000020356	2,2
105	Hsc70-interacting protein	ENSBTAP00000008146	2,2
106	Annexin A1	ENSBTAP000000021256	2,2
107	Neutrophil cytosol factor 1	ENSBTAP00000004279	2,2
108	Signal peptidase complex subunit 1	ENSBTAP00000006231	2,2
109	L-lactate dehydrogenase A chain	ENSBTAP00000011447	2,2
110	Tapasin	ENSBTAP00000022386	2,2
111	Fibrinogen alpha chain	ENSBTAP00000002145	2,2
112	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	ENSBTAP00000033015	2,2
113	60S ribosomal protein L22 isoform X2	ENSBTAP00000019184	2,2
114	Tyrosine-protein kinase SYK	ENSBTAP00000006260	2,2
115	Nucleoside diphosphate kinase B	ENSBTAP000000041066	2,2
116	Membrane-associated progesterone receptor component 2	ENSBTAP00000014390	2,2
117	Carnitine palmitoyltransferase 1A	ENSBTAP00000029336	2,2
118	Ore-binding factor, beta subunit	ENSBTAP00000021434	2,2
119	Adenylate kinase 2, mitochondrial	ENSBTAP00000023406	2,1
120	RNA-binding protein FUS	ENSBTAP00000007571	2,1
121	Transgelin-2	ENSBTAP00000002674	2,1
122	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	ENSBTAP000000052671	2,1
123	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	ENSBTAP00000010280	2,1

Tab. 4.5, Proteine 80-123: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Kontrollkühen (vgl. Legende S.84)

124	Myosin light polypeptide 6	ENSBTAP00000014304	2,1
125	Lamin A/C	ENSBTAP00000023373	2,1
126	Bcl-2-associated transcription factor 1	ENSBTAP000000052174	2,1
127	Calreticulin	ENSBTAP00000020111	2,1
128	55 kDa erythrocyte membrane protein	ENSBTAP00000017340	2,1
129	EH domain-containing protein 3	ENSBTAP000000041997	2,1
130	RNA binding motif protein, X-linked	ENSBTAP00000017696	2,1
131	Profilin-1	ENSBTAP00000006465	2,1
132	Dynein light chain 2, cytoplasmic	ENSBTAP00000006190	2,1
133	Enah/Vasp	ENSBTAP00000012242	2,1
134	Interferon-induced guanylate-binding protein 1 isoformX2	ENSBTAP00000032626	2,1
135	FUN14 domain-containing protein 2	ENSBTAP00000022579	2,1
136	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ENSBTAP00000007028	2,1
137	Chromobox protein	ENSBTAP00000007283	2,1
138	Vinculin	ENSBTAP000000053644	2,0
139	Fibrinogen gamma-B chain	ENSBTAP00000008877	2,0
140	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	ENSBTAP00000023642	2,0
141	Vitronectin	ENSBTAP000000021497	2,0
142	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	ENSBTAP00000014162	2,0
143	Proteasome subunit alpha type-6	ENSBTAP00000012773	2,0
144	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2	ENSBTAP00000039580	2,0
145	Tropomyosin alpha-4 chain	ENSBTAP00000005982	2,0
146	Glia maturation factor gamma	ENSBTAP00000007090	2,0
147	30K serine proteinase	ENSBTAP000000055424	2,0
148	Disulfide-isomerase	ENSBTAP00000007943	2,0
149	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	ENSBTAP00000016153	2,0
150	Transport protein Sec61 subunit beta	ENSBTAP00000003190	2,0
151	Protein disulfide-isomerase A3	ENSBTAP00000022854	2,0
152	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3	ENSBTAP00000000367	2,0
153	Bromodomain containing 4	ENSBTAP00000003242	2,0

Tab. 4.5: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine des Zellkerns, die bei geimpften Kontrollkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei Überträgerkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Kontroll-PBL zu PWM-stimulierten Überträger-PBL.

4.4.2.6 Im Zellkern von Überträgerlymphozyten nach PWM-Stimulation höher exprimierte Proteine

Von den insgesamt 1598 Proteinen, die aus der Zellkern-Fraktion identifiziert wurden, waren bei BNP-Überträgerkühen nach PWM-Stimulation mit 164 Proteinen (Tab. 4.6) sogar etwas mehr Proteine hochreguliert als bei den Kontrollkühen.

Ergebnisse

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio ^d
1	Keratin, type II cytoskeletal 75	ENSBTAP00000038262	10783,0
2	Ras and Rab interactor 3	ENSBTAP00000013748	42,2
3	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	ENSBTAP00000016250	37,8
4	Corneodesmosin	ENSBTAP00000028955	17,4
5	Chromosome 25 open reading frame	ENSBTAP00000028313	17,3
6	Heat shock 70kDa protein 4	ENSBTAP00000020825	16,7
7	Desmoplakin	ENSBTAP00000020103	14,5
8	Interferon regulatory factor 4	ENSBTAP00000003812	13,6
9	Premature ovarian failure, 1B	ENSBTAP00000019260	11,5
10	ATP-dependent RNA helicase DDX24	ENSBTAP00000004441	11,5
11	Junction plakoglobin	ENSBTAP00000023522	11,0
12	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	ENSBTAP00000017303	10,7
13	Thymopoietin-2	ENSBTAP00000048213	10,1
14	Interferon-induced protein 44	ENSBTAP00000045648	9,5
15	Keratin 24	ENSBTAP00000027749	9,3
16	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	ENSBTAP00000001019	9,2
17	Histone H2B	ENSBTAP00000048179	8,8
18	Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9	ENSBTAP00000022240	8,4
19	Arginase-1	ENSBTAP00000016461	8,3
20	Interferon induced transmembrane protein 10	ENSBTAP00000056116	7,7
21	Serine/threonine phosphatase 4 catalytic subunit	ENSBTAP00000017178	7,5
22	URB1 ribosome biogenesis 1	ENSBTAP00000016473	7,3
23	MutS	ENSBTAP00000001867	7,2
24	Guanine monphosphate synthetase	ENSBTAP00000017301	6,5
25	Dickkopf-related protein 2	ENSBTAP00000017242	6,3
26	Keratin 1	ENSBTAP00000055471	6,3
27	Apoptosis antagonizing transcription factor	ENSBTAP00000029234	6,1
28	Keratin, type I cytoskeletal 10	ENSBTAP00000017140	6,1
29	Peroxisomal biogenesis factor 7	ENSBTAP00000022338	5,4
30	Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 2	ENSBTAP00000007216	5,2
31	KIAA2013	ENSBTAP00000025834	5,1
32	Importin subunit alpha-2	ENSBTAP00000016216	4,9
33	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	ENSBTAP00000003273	4,9
34	Switch-associated protein 70	ENSBTAP00000002578	4,9
35	Centromere/kinetochore protein zw10	ENSBTAP00000026733	4,9
36	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	ENSBTAP00000000088	4,8
37	Keratin, type I cytoskeletal 19	ENSBTAP00000006450	4,6
38	Flightless I	ENSBTAP00000021517	4,6
39	Remodeling and spacing factor 1	ENSBTAP00000053604	4,3
40	Ribosomal RNA processing 1	ENSBTAP00000023157	4,3
41	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	ENSBTAP00000008756	4,3
42	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37	ENSBTAP00000027206	4,2

Tab. 4.6, Proteine 1-42: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Überträgerkühen (vgl. Legende S.88)

Ergebnisse

43	Mago nashi	ENSBTAP00000004528	4,2
44	Chromosome 14 open reading frame 49	ENSBTAP00000004584	4,1
45	ATP-dependent metalloprotease YME1L1	ENSBTAP000000021868	4,1
46	Keratin, type II cytoskeletal 59 kDa, component IV	ENSBTAP00000000396	4,1
47	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	ENSBTAP000000044296	4,0
48	MDN1, midasin	ENSBTAP000000002157	3,9
49	Sorting nexin-17	ENSBTAP000000025998	3,9
50	Dynamin-1	ENSBTAP000000037777	3,9
51	Keratin, type II cytoskeletal 5	ENSBTAP000000009478	3,9
52	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	ENSBTAP000000030598	3,9
53	Serine/threonine phosphatase	ENSBTAP000000010538	3,8
54	Methyltransferase	ENSBTAP000000035031	3,8
55	Replication factor C subunit 5	ENSBTAP000000009392	3,7
56	H2A histone family, member Y2	ENSBTAP000000001547	3,7
57	WD repeat-containing protein 55	ENSBTAP000000020021	3,7
58	SET binding factor 1	ENSBTAP000000028448	3,7
59	Catalase	ENSBTAP000000027941	3,7
60	26S protease regulatory subunit 7	ENSBTAP000000056372	3,6
61	Guanine nucleotide-binding protein	ENSBTAP000000035753	3,6
62	Menin	ENSBTAP000000002705	3,6
63	Integrator complex subunit 9	ENSBTAP000000046018	3,5
64	Histone deacetylase complex subunit SAP18	ENSBTAP000000024791	3,5
65	Nucleolar complex protein 3	ENSBTAP000000015105	3,5
66	40S ribosomal protein S30	ENSBTAP000000027728	3,5
67	Casein beta	ENSBTAP000000003409	3,5
68	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	ENSBTAP000000042228	3,4
69	Chromatin assembly factor 1 subunit B	ENSBTAP000000015764	3,4
70	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	ENSBTAP000000014281	3,4
71	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	ENSBTAP000000050307	3,4
72	Nucleoporin 205kDa	ENSBTAP000000042092	3,4
73	Multidrug resistance-associated protein 4	ENSBTAP000000035351	3,3
74	Integrator complex subunit 6	ENSBTAP000000003868	3,3
75	Integrator complex subunit 3	ENSBTAP000000008186	3,3
76	Protein kinase C, theta	ENSBTAP000000053216	3,2
77	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	ENSBTAP000000024373	3,2
78	Replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	ENSBTAP000000019296	3,2
79	Translocase of inner mitochondrial membrane 44	ENSBTAP000000020681	3,1
80	Keratin, type I cytoskeletal 14	ENSBTAP000000036252	3,1
81	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	ENSBTAP000000025274	3,0
82	RAN binding protein 2	ENSBTAP000000042908	3,0
83	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C	ENSBTAP000000015866	3,0
84	Actin-related protein 10	ENSBTAP000000019138	2,9
85	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	ENSBTAP000000025246	2,9
86	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	ENSBTAP000000013622	2,9

Tab. 4.6, Proteine 43-86: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Überträgerkühen (vgl. Legende S.88)

Ergebnisse

87	Origin recognition complex subunit 4	ENSBTAP00000020335	2,9
88	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	ENSBTAP00000011424	2,9
89	DNA-directed RNA polymerase	ENSBTAP00000008496	2,9
90	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	ENSBTAP00000012519	2,9
91	Importin subunit alpha-7	ENSBTAP00000003764	2,8
92	Replication factor C subunit 4	ENSBTAP000000043171	2,8
93	Exosome complex component RRP43	ENSBTAP00000015733	2,7
94	Elongator complex protein 4	ENSBTAP00000005990	2,7
95	Keratin, type II cytoskeletal 78	ENSBTAP00000000815	2,7
96	Chromosome 10 open reading frame 21	ENSBTAP000000044409	2,7
97	Glycyl-tRNA synthetase	ENSBTAP000000025254	2,6
98	GTPase, IMAP family member 7	ENSBTAP000000041333	2,6
99	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	ENSBTAP00000013500	2,6
100	40S ribosomal protein S4	ENSBTAP000000025024	2,6
101	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	ENSBTAP000000020608	2,5
102	Minichromosome maintenance complex component 2	ENSBTAP00000019121	2,5
103	Chromodomain helicase DNA binding protein 5	ENSBTAP00000010688	2,5
104	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	ENSBTAP00000019509	2,5
105	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	ENSBTAP000000023150	2,5
106	WD repeat domain 3	ENSBTAP000000026561	2,5
107	Condensin complex subunit 1	ENSBTAP00000019603	2,5
108	Forkhead box K1	ENSBTAP000000025710	2,5
109	Nucleosome assembly protein 1	ENSBTAP000000027852	2,5
110	CD163	ENSBTAP000000026215	2,5
111	Zinc finger RNA binding protein	ENSBTAP00000011072	2,4
112	Serine/threonine kinase 19	ENSBTAP00000007341	2,4
113	Bifunctional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JMJD6	ENSBTAP000000025492	2,4
114	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	ENSBTAP000000005331	2,4
115	Mitogen-activated protein kinase 2	ENSBTAP00000001378	2,4
116	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	ENSBTAP000000043692	2,4
117	Cullin 4B	ENSBTAP000000024713	2,3
118	Caspase-8	ENSBTAP000000038128	2,3
119	Importin 7	ENSBTAP000000039739	2,3
120	Zinc finger and BTB domain containing 7A	ENSBTAP000000035733	2,3
121	26S protease regulatory subunit 6B	ENSBTAP00000012391	2,3
122	Chromosome 14 open reading frame 45	ENSBTAP000000024578	2,2
123	Coatomer subunit zeta-1	ENSBTAP00000007088	2,2
124	Dihydropyrimidine dehydrogenase	ENSBTAP00000007139	2,2
125	Dihydrolipoyl dehydrogenase	ENSBTAP000000033696	2,2
126	Cullin 2	ENSBTAP000000051032	2,2
127	Serine/threonine phosphatase 6 regulatory subunit 1	ENSBTAP000000055919	2,2
128	Histone deacetylase 2	ENSBTAP00000015734	2,2
129	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	ENSBTAP00000001655	2,2

Tab. 4.6, Proteine 87-129: Hochregulierte Zellkern-Proteine bei Überträgerkühen (vgl. Legende S.88)

Ergebnisse

130	Neutral amino acid transporter B(0)	ENSBTAP00000018050	2,2
131	Exosome complex component RRP4	ENSBTAP00000053924	2,2
132	GTP binding protein 4	ENSBTAP00000019864	2,2
133	Serpin B6	ENSBTAP00000026816	2,2
134	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	ENSBTAP00000012328	2,2
135	Histone cluster 1, H1d	ENSBTAP00000051256	2,1
136	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	ENSBTAP00000002650	2,1
137	Nuclear pore complex protein Nup133	ENSBTAP00000006535	2,1
138	Histone deacetylase 1	ENSBTAP00000016877	2,1
139	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	ENSBTAP00000000910	2,1
140	Interferon-stimulated 20 kDa exonuclease	ENSBTAP00000001989	2,1
141	General transcription factor II-I	ENSBTAP00000012904	2,1
142	Family with sequence similarity 91, member A1	ENSBTAP00000006615	2,1
143	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	ENSBTAP00000015465	2,1
144	AFG3	ENSBTAP00000030993	2,1
145	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	ENSBTAP00000037130	2,1
146	N-acetyltransferase 10	ENSBTAP00000022271	2,0
147	Chromosome 4 open reading frame 27	ENSBTAP00000026815	2,0
148	Polycomb protein EED	ENSBTAP00000010324	2,0
149	Chromosome X open reading frame 38	ENSBTAP00000015650	2,0
150	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa	ENSBTAP00000014714	2,0
151	ATPase family, AAA domain containing 2	ENSBTAP00000053735	2,0
152	Cullin 3	ENSBTAP00000029018	2,0
153	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ENSBTAP00000043637	2,0
154	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	ENSBTAP00000018645	2,0
155	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	ENSBTAP00000026857	2,0
156	40S ribosomal protein S3a	ENSBTAP00000013079	2,0
157	DNA replication licensing factor MCM4	ENSBTAP00000052820	2,0
158	ELAV	ENSBTAP00000000805	2,0
159	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1	ENSBTAP00000023383	2,0
160	UTP3, small subunit (SSU) processome component	ENSBTAP00000048599	2,0
161	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1, N-terminally processed	ENSBTAP00000012035	2,0
162	Armadillo repeat-containing protein 8	ENSBTAP00000026578	2,0
163	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	ENSBTAP00000042353	2,0
164	Ribosome biogenesis protein BRX1	ENSBTAP00000025572	2,0

Tab. 4.6: Massenspektrometrisch eindeutig identifizierte Proteine des Zellkerns, die bei Überträgerkühen (n = 2) nach PWM-Stimulation mindestens zweifach stärker reguliert waren als bei geimpften Kontrollkühen (n = 2).

a) Fortlaufende Nummer, b) Name des identifizierten Proteins, c) Identifikationsnummer des Proteins aus Ensembl-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Ratio: Verhältnis der Expression des Proteins von PWM-stimulierten Überträger-PBL zu PWM-stimulierten Kontroll-PBL.

Die Tabellen 4.1 – 4.6 zeigen, dass die Zellen von Kontroll- und Überträgerkühen nach PWM-Stimulation ganz unterschiedliche Proteine höher exprimierten. Zahlenmäßig regulierten die Überträgerkühe (Tab. 4.2) im Vergleich zu den Kontrollkühen (Tab. 4.1) auf der Zelloberfläche fast 16 Mal weniger Proteine. Dabei wird an einzelnen Proteinen bereits sichtbar, dass Überträgerkühe andere Pfade der Immunreaktion benutzen als Kontrollkühe.

4.4.2.7 Unterschiedliche molekulare Funktionsbereiche von nach PWM-Stimulation höher exprimierten Plasmazellmembranproteinen bei Kontroll- und Überträgerlymphozyten

Da die Proteine der Zelloberfläche für das Immungeschehen von besonderer Bedeutung sind und Proteine in Netzwerken interagieren, wurden für die nach PWM-Stimulation regulierten Oberflächenproteine zusätzlich Netzwerkanalysen mit Hilfe einer genomischen Datenbank (Genomatix Software) durchgeführt. Diese sollten dazu dienen, nähere funktionelle Zusammenhänge zwischen den nach PWM stärker exprimierten Oberflächenproteinen zu ermitteln. In Tabelle 4.7 sind die drei am stärksten signifikanten Funktionsbereiche dargestellt, an denen mehrere der bei stimulierten Kontrollzellen hochregulierten Oberflächenproteine teilhaben. Sie nehmen Funktionen wie MHCII-Rezeptoraktivität, Transmembran-Transporter-Aktivität und Muster-Wiedererkennung-Aktivität ein (Tab. 4.7).

Molekulare Funktion ^a	p-Wert ^b
MHC class II receptor activity	≤ 0,001
Transmembrane transporter activity	≤ 0,001
Pattern recognition receptor activity	≤ 0,001

Tab. 4.7: Molekulare Funktionsbereiche von bei Kontrolllymphozyten höher exprimierten Oberflächenproteinen nach PWM-Stimulation.

Dargestellt sind molekulare Funktionen, die jeweils mehrere der identifizierten Proteine erfüllen. Die abgebildeten Funktionen repräsentieren die signifikantesten Wirkungsbereiche der bei Kontroll-PBL höher exprimierten Proteine. a) Beschreibung der molekularen Funktion aus der Gen-Ontologie-Datenbank (GO-Term), b) p-Wert: Beschreibt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die identifizierten Proteine nicht innerhalb des beschriebenen Funktionskreises agieren (***) ($p \leq 0,001$).

Unter den bei PWM-stimulierten Überträgerlymphozyten hochregulierten Oberflächenproteinen finden sich Proteine mit den Funktionen inhibitorische MHCI-Rezeptoraktivität, IgE-Bindung und MHCII-Rezeptoraktivität (Tab. 4.8).

Molekulare Funktion ^a	p-Wert ^b
Inhibitory MHC class I receptor activity	≤ 0,001
IgE binding	≤ 0,01
MHC class II receptor activity	≤ 0,01

Tab. 4.8: Molekulare Funktionsbereiche von bei Überträgerlymphozyten höher exprimierten Oberflächenproteinen nach PWM-Stimulation.

Dargestellt sind molekulare Funktionen, die jeweils mehrere der identifizierten Proteine erfüllen. Die abgebildeten Funktionen repräsentieren die signifikantesten Wirkungsbereiche der bei BNP-PBL höher exprimierten Proteine. a) Beschreibung der molekularen Funktion aus der Gen-Ontologie-Datenbank (GO-Term), b) p-Wert: Beschreibt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die identifizierten Proteine nicht innerhalb des beschriebenen Funktionskreises agieren (** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001).

Im Vergleich zu Kontroll-PBL (Tab. 4.1) wurden auf der Oberfläche von Überträger-PBL nach Stimulation nur sieben Proteine hochreguliert (Tab. 4.2). Anhand der molekularen Funktionsbereiche, in denen diese Proteine agieren (Tab. 4.7 und 4.8) wird deutlich, dass sie an unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sind. Abgesehen vom Funktionsbereich der MHCII-Rezeptor-Aktivität, an dem sowohl die regulierten Kontroll- als auch Überträgerzellen teilhaben, unterscheiden sich die restlichen Funktionsbereiche elementar. Anhand bestimmter molekularer Funktionen der Überträger (inhibitorische MHCI Aktivität, IgE-Bindung) wird durch diese Analyse wiederum deutlich, dass Überträgertiere eine andere Art der Immunantwort regulieren.

4.4.3 Verifikation nach PWM-Stimulation hochregulierter Proteine mittels Western Blot

Im nächsten Schritt wurden immunologisch interessante Proteine aus dem proteomischen Datensatz der regulierten Oberflächenproteine zur Verifikation herausgegriffen. Die Expression der Proteine in Gesamtzelllysat von unstimulierten und PWM-stimulierten Lymphozyten von Kontroll- und Überträgerkühen wurde im Western Blot getestet und anschließend quantifiziert und normalisiert.

4.4.3.1 Kontrolllymphozyten regulieren TLR2 nach PWM-Stimulation hoch

Der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2, Tab. 4.1 Protein 16) wurde als ein bei Kontrollkühen nach polyklonaler PBL-Stimulation hochreguliertes Oberflächenprotein identifiziert. Toll-like Rezeptoren stellen einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems dar. Sie erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen und lösen eine T-Zell-medierte Immunantwort aus (Imanishi et al. 2007). TLR2 im Speziellen induziert dabei eine Aktivierung der Th1-Zellen (Imanishi et al. 2007). Eine differenzielle Regulierung dieses Proteins zwischen Kontroll- und Überträgerzellen konnte auch im Western Blot bestätigt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

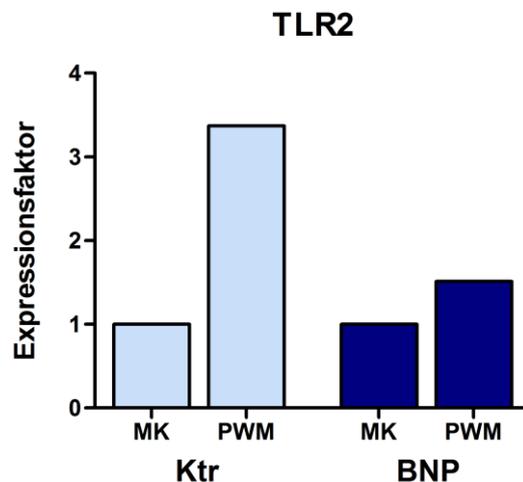


Abb. 4.7: Nachweis der differentiellen Expression von TLR2 bei PWM-stimulierten PBL von Kontroll- und Überträgerkühen im Western Blot.

Auf der y-Achse dargestellt ist der unterschiedliche Grad der Expression von TLR2 in Lysaten von 48 Stunden mit PWM (5 µg/ml) stimulierten PBL eines Kontrolltieres (hellblaue Säulen) und eines Überträgartieres (dunkelblaue Säulen). Die Intensität der entsprechenden Banden im Western Blot wurde quantifiziert und auf beta Actin normalisiert. Die Werte der stimulierten Zellen (PWM) beziehen sich auf eine 48 Stunden inkubierte, aber unstimulierte Mediumkontrolle (MK, Expressionsfaktor entspricht jeweils 1) desselben Tieres. Die Expression von TLR2 war auf stimulierten Kontroll-PBL 3,4-fach erhöht im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Auf BNP-PBL stieg die Expression nach Stimulation dagegen nur leicht um den Faktor 1,5 an. Daraus ergibt sich eine 2,2-fach stärkere Expression vom TLR2 in stimulierten Kontrollzellen im Vergleich zu den gleichartig stimulierten Überträgerzellen.

Die TLR2-Expression im Western Blot war auf stimulierten Kontrollzellen um das 3,4-fache hochreguliert im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-PBL. Bei PWM-stimulierten Überträger-PBL hingegen zeigte sich nur ein leichter Anstieg der TLR2-

Expression im Vergleich zu unstimulierten Überträgerzellen. TLR2 war somit bei stimulierten Kontrollen mehr als 2-fach stärker exprimiert als bei stimulierten Überträgerzellen. Die differenzielle Regulierung von TLR2 aus dem proteomischen Datensatz der Oberflächenproteine konnte somit auch in Gesamtzelllysat nachgewiesen werden.

4.4.3.2 Überträgerkühe regulieren Galectin 3 nach PWM-Stimulation hoch

Galectin 3 (Tab. 4.2 Protein 5), das auf der Oberfläche von stimulierten BNP-PBL hochreguliert war, werden im Immunsystem wichtige Aufgaben zugeschrieben. Beim Menschen wird es auf CD4⁺ T-Gedächtniszellen und regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert (Hsu et al. 2009). Galectin 3 kann mit einer verminderten Antigenpräsentation an T-Zellen und infolge dessen mit einer Beeinträchtigung der Immunabwehr in Verbindung gebracht werden (Chung et al. 2013). Die Expression von Galectin 3 auf Rinder-PBL nach PWM-Stimulation wurde mittels Western Blot getestet.

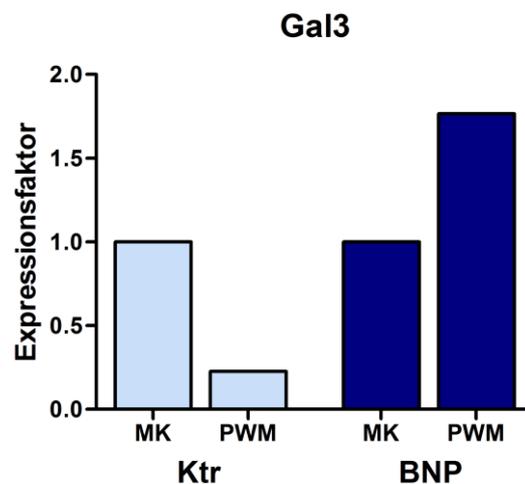


Abb. 4.8: Nachweis der differentiellen Expression von Galectin 3 bei PWM-stimulierten PBL von Kontroll- und Überträgerkühen im Western Blot.

Auf der y-Achse dargestellt ist der unterschiedliche Grad der Expression von Galectin 3 in Lysaten von 48 Stunden mit PWM (5 µg/ml) stimulierten PBL eines Kontrolltieres (hellblaue Säulen) und eines Überträgertieres (dunkelblaue Säulen). Die Intensität der entsprechenden Banden im Western Blot wurde quantifiziert und auf beta Actin normalisiert. Die Werte der stimulierten Zellen (PWM) beziehen sich auf eine 48 Stunden inkubierte, aber unstimulierte Mediumkontrolle (MK, Expressionsfaktor entspricht 1) desselben Tieres. Die Expression von Galectin 3 sank bei stimulierten Kontroll-PBL im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen auf 20% ab. Bei BNP-Lymphozyten stieg die Expression nach Stimulation dagegen um den Faktor 1,8 an. Im direkten Vergleich zwischen den stimulierten Zellen war Galectin 3 in Überträger-PBL damit fast 8 Mal stärker exprimiert als in Kontroll-PBL.

Die Galectin 3-Expression wurde nach Stimulation von Kontrollleukozyten auf 20% der Expression unstimulierter Zellen reduziert. Die stimulierten Überträger-PBL hingegen exprimierten Galectin 3 um 80% (Faktor 1,8) stärker als die unstimulierten Überträgerzellen (Abb. 4.8). Dies entspricht einer fast 8 Mal stärkeren Expression von Galectin 3 in stimulierten Überträger-PBL im Vergleich zu stimulierten Kontroll-PBL. Somit konnte für Galectin 3 die deutliche Hochregulation als Reaktion auf eine polyklonale Stimulation der Zellen mit PWM bestätigt werden.

Mehrere Daten gaben bisher Hinweise darauf, dass Kontroll- und Überträgerkühe sich verschiedener Pfade der Immunreaktion bedienen. Die Bestätigung von TLR2 als ein auf stimulierten Kontrollzellen hochreguliertes Protein sprach dafür, dass die Kontrollkühe nach Immunstimulation mit PWM wahrscheinlich eine Th1-Antwort ausbildeten. Welche Art der Immunantwort die Überträgerkühe ausbildeten, ist dagegen noch unklar. Es konnte bereits eine Expression von Galectin 3 auf Makrophagen des Rindes festgestellt werden (Lee et al. 2009). Zur genauen Funktion des Proteins im Immungeschehen des Rindes ist jedoch noch nichts bekannt. Auch deshalb ist diese Immunreaktion der BNP-Kühe mit Hochregulierung von Galectin 3 sehr interessant.

4.4.4 Lymphozyten von Kontroll- und Überträgerkühen proliferieren nicht unterschiedlich nach *in vitro* Stimulation mit Agonisten von TLR3, TLR4, TLR9 und PregSure BVD

Mit dem Ziel, die Unterschiede bei der Immunreaktion zwischen den Tieren genauer charakterisieren zu können, wurde im nächsten Schritt das Proliferationsverhalten der Kontroll- und Überträgerlymphozyten auf Agonisten von TLR3, TLR4 und TLR9 untersucht. Hierzu wurden PBL von Kontroll- und Überträgerkühen in *in vitro* Proliferationsassays für 48 Stunden mit den TLR-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS), CpG-Oligodesoxynukleotid (CpG-ODN) und Polyinosin:polycytidylsäure (Poly i:c) stimuliert. Auch der BNP-auslösende Impfstoff PregSure BVD wurde zu den Zellen gegeben, da im Adjuvans von Impfstoffen meist TLR-Agonisten enthalten sind (Steinhagen et al. 2011). LPS ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und aktiviert B-Zellen über TLR4 und CD14 ohne Hilfe von T-Zellen (Lu et al. 2008). Wie in Abbildung 4.9 a zu sehen ist, reagierten die Kontrollzellen auf LPS-Zugabe (5 µg/ml) mit 2,9-fach höherer Proliferation als die unstimulierten Kontroll-PBL. Stimulierte Überträgerlymphozyten proliferierten 3,8 Mal stärker und reagierten somit

deutlicher auf LPS, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den stimulierten Kontrollzellen. CpG-ODN kommt im Genom von Bakterien und Viren vor und bewirkt über TLR9 eine Aktivierung von B-Zellen (Ghamlouch et al. 2014). Abbildung 4.9 b zeigt, dass zwar sowohl Kontroll- als auch BNP-Lymphozyten auf CpG-ODN (1 μ M) etwa doppelt so stark proliferierten wie ihre unstimulierten Mediumkontrollen, allerdings gab es keinen spezifischen Unterschied bei der Reaktionsstärke zwischen stimulierten Kontroll- und Überträger-PBL. Poly i:c weist die gleiche Struktur wie doppelsträngige RNA von Viren auf und aktiviert B-Zellen über TLR3 (Marshall-Clarke et al. 2007). Betrachtet man hier die Unterschiede in der Proliferationsrate (Abb. 4.9 c) wird ersichtlich, dass Poly i:c (25 μ g/ml) weder Kontroll- noch Überträgerzellen zu deutlicher Proliferation anregte. Den Impfstoff Pregsure BVD testeten wir, um herauszufinden, ob im Adjuvans ein Stimulanz enthalten ist, welches die Zellen unterschiedlich anregt. Wie in Abbildung 4.9 d zu sehen, bewirkte die direkte Zugabe des Impfstoffes (1 ng/ml) keine Proliferation.

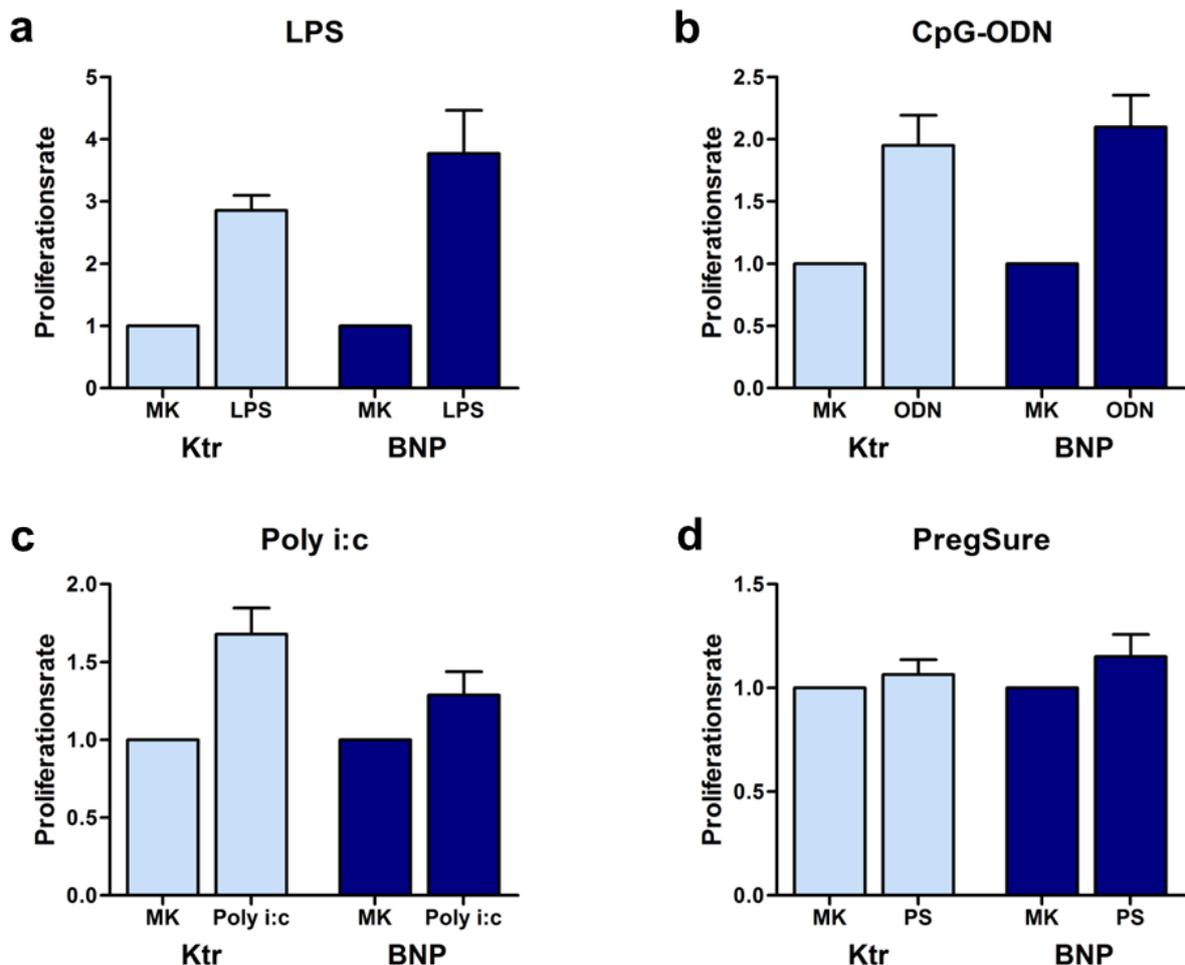


Abb. 4.9: Stimulation von Kontroll- und Überträgerlymphozyten mit TLR-spezifischen Stimulantien und PregSure BVD.

Dargestellt ist der Grad der Zellproliferation von Kontrolllymphozyten (hellblaue Säulen, n = 4) und Überträgerlymphozyten (dunkelblaue Säulen, n = 4) auf verschiedene TLR-Agonisten und PregSure BVD nach 48 Stunden Inkubation (a: LPS (5 µg/ml), b: CpG-ODN (1 µM), c: Poly i:c (25 µg/ml), d: PregSure BVD (1 ng/ml)). Der Proliferationsfaktor entspricht der Differenz der counts per minute (cpm) im Beta-Counter von stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen (MK, Mediumkontrolle). Dabei wurde für jedes getestete Tier der Wert der stimulierten Ansätze bezogen auf den Wert der unstimulierten Mediumkontrolle (Proliferationsrate der Mediumkontrolle entspricht 1). a) Die mit LPS stimulierten Kontrollzellen proliferierten 2,9 Mal stärker als die unstimulierten Kontrollzellen. Die LPS stimulierten Überträgerzellen proliferierten 3,8 Mal mehr als die unstimulierten Überträgerzellen. Damit proliferierten LPS stimulierte Überträgerlymphozyten nur um den Faktor 1,3 stärker als stimulierte Kontrolllymphozyten. b) Mit CpG-ODN stimulierte Kontrolllymphozyten proliferierten im Verhältnis zu ihrer Mediumkontrolle um den Faktor zwei mehr, CpG-ODN stimulierte Überträgerlymphozyten um den Faktor 2,1 stärker. CpG-ODN stimulierte Überträgerzellen proliferierten somit kaum stärker als die Kontrollzellen. c) Poly i:c bewirkte bei den Kontrollzellen eine Proliferation um den Faktor 1,7 im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Die Poly i:c stimulierten Überträgerzellen proliferierten nur 1,3 Mal stärker als die unstimulierten Überträgerzellen und damit etwas weniger als die Poly i:c stimulierten Kontrollzellen. d) Die Stimulation mit PregSure BVD bewirkte bei Kontroll- und bei Überträgerlymphozyten keine gesteigerte Proliferationsrate. Die abgebildeten Werte stellen Mittelwerte aus fünf technisch unabhängigen Experimenten dar.

Dieser Versuch zeigte, dass Kontroll- und Überträgerlymphozyten nach *in vitro* Stimulation mit TLR-Agonisten und PregSure BVD kaum unterschiedlich proliferieren. Auf LPS-Stimulation reagierten sie zwar deutlich abweichend, jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

4.4.5 Die für Th1- und Th2-Immunantworten spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 werden nach PWM-Stimulation differenziell reguliert

Im Zuge der Differenzierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen T-Helferzell-Phänotypen werden verschiedene Zytokine und Transkriptionsfaktoren vermehrt gebildet (Abdoli and Najafian 2014). Um genauer charakterisieren zu können, welchen Th-Phänotyp Kontroll- und Überträgerkühe nach Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen bilden, galt es im nächsten Schritt zu untersuchen, ob die Rinder nach polyklonaler Lymphozytenstimulation mit PWM die für die Th1- oder Th2-Immunantwort spezifischen Transkriptionsfaktoren aktivieren. Als Nachweisverfahren für Th1-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet gut geeignet, für Th2-Zellen der Transkriptionsfaktor GATA3 (Lazarevic et al. 2013). Unsere bisherigen Daten ließen darauf schließen, dass PWM-Stimulation bei Kontrolllymphozyten eine Th1-

Immunantwort auslöst. Mittels Western Blot sollte deshalb die T-bet-Expression überprüft werden. Um eine eventuelle Th2-Antwort der Überträgerkühe abzufragen, testeten wir als Transkriptionsfaktor GATA3.

4.4.5.1 Kontrollkühe regulieren T-bet nach PWM-Stimulation hoch

Der Transkriptionsfaktor T-bet bewirkt eine Differenzierung der aktivierten CD4⁺ T-Zelle zu Th1-Zellen (Lazarevic et al. 2013). Entsprechend unserer Hypothese, dass Kontrollkühe eine Th1-Antwort ausbilden, erwarteten wir im Western Blot also einen Anstieg der T-bet Expression nach Stimulation der Zellen der Kontrolltiere. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von T-bet im Western Blot. T-bet wurde von PWM-stimulierten Kontrolllymphozyten fast 5-fach stärker exprimiert als von unstimulierten Kontrolllymphozyten. Dagegen zeigte sich, dass in BNP-Lymphozyten keine nennenswerte T-bet Regulation erfolgte (Faktor 1,4). Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass Kontrolltiere nach PWM-Immunstimulation eine Th1-Immunantwort ausbilden.

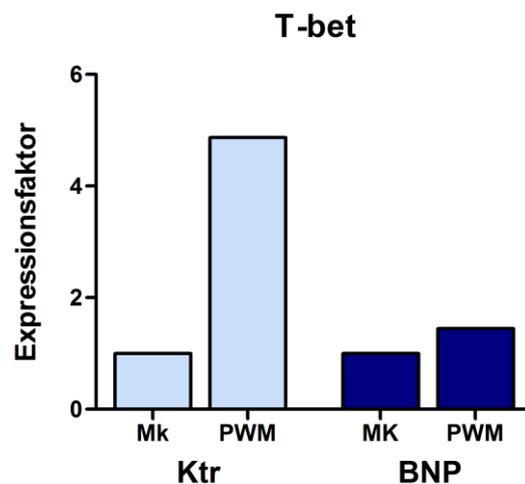


Abb. 4.10: Nachweis der differentiellen Expression von T-bet bei PWM-stimulierten PBL von Kontroll- und Überträgerkühen im Western Blot.

Auf der y-Achse dargestellt ist der unterschiedliche Grad der Expression von T-bet in Lysaten von 10 Minuten mit PWM (5 µg/ml) stimulierten PBL eines Kontrolltieres (hellblaue Säulen) und eines Überträgartieres (dunkelblaue Säulen). Die Intensität der entsprechenden Banden im Western Blot wurde quantifiziert und auf beta Actin normalisiert. Die Werte der stimulierten Zellen (PWM) beziehen sich auf eine 10 Minuten inkubierte, aber unstimulierte Mediumkontrolle (MK, Expressionsfaktor entspricht 1) desselben Tieres. Die Expression von T-bet stieg bei stimulierten Kontroll-PBL im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen um den Faktor 4,9 an. Auf Überträgerzellen erhöhte sich die Expression nach Stimulation dagegen nur um den Faktor 1,4.

4.4.5.2 Überträgerkühe regulieren GATA3 nach PWM-Stimulation hoch

Um zu überprüfen, ob die Überträgerkühe abweichend von der Th1-Antwort der Kontrollkühe eine Th2-Antwort generieren, testeten wir die GATA3-Expression auf stimulierten und unstimulierten Zellen. GATA3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung der aktivierten CD4⁺ T-Zelle zu Th2-Zellen anregt (Kanhare et al. 2012). Sollten die Überträgerkühe nach Immunstimulation tatsächlich eine Th2-Antwort ausbilden, müsste die GATA3-Expression von stimulierten Überträgerzellen also entsprechend stärker sein. PWM-stimulierte Überträgerlymphozyten regulierten GATA3 im Vergleich zu unstimulierten Überträgerzellen extrem hoch. Die GATA3-Expression war auf PWM-stimulierten BNP-Zellen 50-fach erhöht (Abb. 4.11). Kontrolllymphozyten regulierten GATA3 hingegen nur 1,8 Mal stärker nach polyklonaler Stimulation.

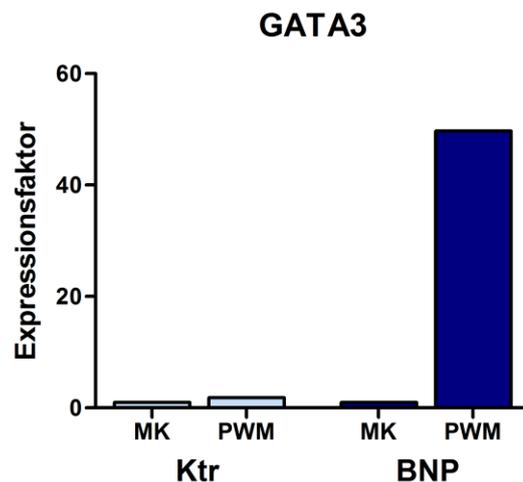


Abb. 4.11: Nachweis der differentiellen Expression von GATA3 bei PWM-stimulierten PBL von Kontroll- und Überträgerkühen im Western Blot.

Auf der y-Achse dargestellt ist der unterschiedliche Grad der Expression von GATA3 in Lysaten von 10 Minuten mit PWM (5 µg/ml) stimulierten PBL eines Kontrolltieres (hellblaue Säulen) und eines Überträgertieres (dunkelblaue Säulen). Die Intensität der entsprechenden Banden im Western Blot wurde quantifiziert und auf beta Actin normalisiert. Die Werte der stimulierten Zellen (PWM) beziehen sich auf eine 10 Minuten inkubierte, aber unstimulierte Mediumkontrolle (MK, Expressionsfaktor entspricht 1) desselben Tieres. Die Expression von GATA3 stieg bei stimulierten Kontroll-PBL im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen nur um den Faktor 1,8 an. Auf Überträgerzellen jedoch erhöhte sich die GATA3-Expression nach Stimulation um das 50-fache.

Dieses klare Resultat belegt die Hypothese, dass BNP-Überträgertiere, anders als Kontrollkühe, nach PWM-Immunistimulation eine Th2-Antwort ausbilden. Durch die bisherigen Ergebnisse wird ersichtlich, dass die Kontroll- und Überträgertiere tatsächlich stark in ihrer Immunreaktion voneinander abweichen und sich grundlegend in ihrer Immunantwort unterscheiden. Nach polyklonaler Stimulation mit PWM bilden die Kühe verschiedene Pfade der Th-Zellantwort aus: Kontrollkühe reagieren mit einer Th1-, BNP-Überträgerkühe mit einer Th2-Immunantwort.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse eine elementar andere T-Zell-medierte Immunreaktion der Überträgertiere auf einen Immunstimulus, die durchaus zur Entstehung von BNP beigetragen haben könnte. Um diese immunologischen Abweichungen noch genauer charakterisieren und in das komplexe Zusammenspiel im Immungeschehen einordnen zu können, müssen weitere Versuche erfolgen.

5 DISKUSSION

Die BNP ist eine seit 2005 in Europa und Neuseeland aufgetretene immunmedierte Erkrankung bei unter vier Wochen alten Kälbern (Bastian et al. 2011). Nach der Immunisierung mit dem inaktivierten Impfstoff PregSure BVD bildeten 5 – 10% der geimpften Kühe pathogene Antikörper, die sie über das Kolostrum an die Kälber weitergaben und bei diesen BNP auslösten (Bastian et al. 2011). Durch Serum- und Kolostrum-Transferversuche konnte sicher nachgewiesen werden, dass die Antikörper die Ursache der BNP sind (Foucras et al. 2011). Nach Aufnahme von Kolostrum banden die Antikörper bei den Kälbern an das BNP-Antigen und sie entwickelten innerhalb weniger Tage multiple Blutungen infolge einer massiven Thrombozytopenie sowie eine Leukozytopenie und eine starke Knochenmarksdepletion (Bell et al. 2010b, Laming et al. 2012, Pardon et al. 2010). Neunzig Prozent der betroffenen Kälber starben an dieser Erkrankung (Deutskens et al. 2011). Da der Impfstoff zuletzt 2011 in Neuseeland wieder vom Markt genommen wurde (Jones et al. 2013), ist zwar die Ursache der BNP-Erkrankung eliminiert, jedoch ist die Pathogenese dieser dramatischen, Impf-assoziierten Erkrankung immer noch ungeklärt. Eine Hypothese war, dass die pathogenen Antikörper durch eine Immunreaktion der BNP-Überträgerkühe auf zelluläre Verunreinigungen des Impfstoffes mit der bovinen MDBK-Nierenzelllinie entstanden (Bastian et al. 2011). Dies konnte jedoch noch nicht klar bewiesen werden, da bisher kein BNP-auslösendes Antigen gefunden und verifiziert werden konnte. Auch das postulierte BNP-Alloantigen MHCI konnte nicht als auslösend bewiesen werden und viele Fakten sprechen mittlerweile gegen eine anti-MHCI-Immunreaktion als Ursache der BNP (Demasius et al. 2014, Deutskens 2012, Euler et al. 2013). Die genaue Pathogenese dieser tödlichen Erkrankung ist also weiterhin unklar. In dieser Arbeit wurden deshalb weitere Alloantigenkandidaten untersucht und die Immunreaktionen von PregSure BVD-geimpften Kontrollkühen und BNP-Überträgerkühen charakterisiert.

Unsere zu verifizierenden Antigenkandidaten stammten aus einer Reihe von Vorversuchen (Euler 2013). Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), Filamin A und Thrombospondin-1 (TSP1) wurden dabei spezifisch von BNP-IgG im Vergleich zu geimpftem Kontroll-IgG auf Rinderzellen detektiert und konnten zusätzlich alle in PregSure BVD nachgewiesen werden (Euler 2013). Die Funktionen dieser drei

Proteine sind interessant und pathogene Antikörper gegen sie könnten symptomatisch mit der BNP in Verbindung gebracht werden. Die Purin-Nukleosid-Phosphorylase ist ein Enzym, das in den meisten Geweben im Körper vorhanden und am Purin-Stoffwechsel beteiligt ist (Dalal et al. 2001). Ein Mangel an diesem Protein führt beim Menschen zu einer erheblichen Lymphopenie, vor allem der T-Zellen, und zu einer schweren kombinierten Immundefizienz (Dalal et al. 2001). Des Weiteren haben manche Menschen mit PNP-Mangel eine erhöhte Inzidenz für Autoimmunkrankheiten wie zum Beispiel für die autoimmunhämolytische Anämie (Dalal et al. 2001). Filamin A quervernetzt Aktinfilamente und verknüpft den von-Willebrandt-Faktor-Rezeptor mit dem darunterliegenden Zytoskelett von Thrombozyten (Falet et al. 2010). Mäuse mit einem Mangel an Filamin A auf ihren Thrombozyten zeigten eine verlängerte Blutungszeit und wiesen eine geringere Anzahl an Thrombozyten auf (Falet et al. 2010). So kann eine Beeinträchtigung dieses Proteins mit einer erhöhten Blutungsneigung in Verbindung gebracht werden. Auch Thrombospondin-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung und wird sowohl von Thrombozyten als auch von Lymphozyten exprimiert (Forslow et al. 2007). Bei Mäusen führten gegen Thrombospondin-1 gerichtete Antikörper durch eine behinderte Bindung von Thrombospondin-1 an Fibrinogen und CD41 zu einer reduzierten Thrombozytenaggregation (Legrand et al. 1992).

Die Verifikationsversuche der Kandidaten im Rahmen dieser Arbeit erfolgten durch Vergleich der Immunreaktionen von mehreren BNP-IgG und Kontroll-IgG auf den jeweiligen Kandidatenproteinen im Western Blot (Abb. 4.1). Da alle drei Proteine nicht als Rinderproteine erhältlich waren, wurde hierbei auf gereinigte humane Proteine zurückgegriffen. Die Verifikationsversuche bestätigten eine deutliche Bindung aller getesteten BNP-IgG an alle drei Kandidatenproteine, jedoch banden die getesteten Kontroll-IgG genauso daran (Abb. 4.1). Somit konnte anhand dieser Methode keiner unserer Alloantigenkandidaten verifiziert werden, da zwischen Kontroll- und BNP-IgG keine Unterschiede im Bindungsverhalten nachzuweisen waren. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die geladenen Kandidatenproteine keine bovinen Proteine waren, sondern humane. Um die Proteine komplett als BNP-Alloantigenkandidaten ausschließen zu können, müssten die Kandidatenproteine Rinder-spezifisch kloniert und exprimiert werden und die Immunreaktionen der BNP-IgG in weiteren Western Blots darauf getestet werden. Eine Hürde bei der Expression von Proteinen durch einen transfizierten Organismus

stellt zum Beispiel die Tatsache dar, dass posttranslationelle Modifikationen wie Glykosylierungen dabei meist vom Zustand des Proteins *in vivo* abweichen (Papaneophytou and Kontopidis 2014). Eine Schwierigkeit bei der Auffindung des BNP-Antigens liegt nämlich eventuell darin, dass es sich beim BNP-Antigen möglicherweise um ein modifiziertes Protein handelt, sodass dieses Protein möglichst so exprimiert werden sollte, wie es auch *in vivo* aufzufinden ist, um die Bindungsunterschiede daran nachweisen zu können. Da es sich bei dem targetierten Antigen außerdem um ein konformelles Epitop handeln könnte, ist der Western Blot, der durch die vorige Lyse der Proteine nur lineare Epitope abbilden kann, möglicherweise auch nicht die geeignete Form des Nachweises. Des Weiteren handelt es sich bei dem BNP-Kandidaten wahrscheinlich um eine Isoform des Kandidaten, die zwischen den BNP-Überträgern und Kontrollen verschieden exprimiert wird, weswegen die BNP-Überträger Antikörper gegen das bei ihnen nicht vorhandene Epitop generiert haben. Zu Isoformen ist aber beim Rind noch relativ wenig bekannt, sodass die beiden Rinder-Phänotypen zunächst genomisch auf Unterschiede bei der Kandidatenexpression untersucht werden sollten. Es kommt also durchaus auch weiterhin ein Alloantigen als Ursache für die pathogenen Antikörper in Frage. Jedoch sind hierzu noch weitergehende Untersuchungen der genannten Rinderproteine nötig, um eindeutiger Aussagen treffen zu können.

Andere Arbeitsgruppen postulierten bereits MHCI als BNP-Alloantigen (Deutskens et al. 2011, Foucras et al. 2011). Bei Immunpräzipitationen (IPs) erkannten die Autoren eine bevorzugte Bindung der BNP-Immunglobuline an MHCI von MDBK-Zellen im Vergleich zu Kontroll-IgG, da alle zwölf getesteten BNP-IgG MHCI banden, jedoch nur zwei von vier Kontroll-IgG (Deutskens et al. 2011). Bei weiteren IPs konnte dies von der gleichen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden, da keine unterschiedliche Bindung zwischen Kontroll- und BNP-IgG mehr nachgewiesen werden konnte (Deutskens 2012). So präzipitierten alle vier getesteten Kontroll-IgG und alle vier getesteten BNP-IgG MHCI von MDBK-Zellen (Deutskens 2012). Diese Folgeexperimente widersprachen den publizierten Ausgangsdaten, nach denen MHCI selektiv von BNP-IgG gebunden wurde und deshalb das Ziel der BNP-verursachenden Immunreaktion sein sollte. Damit hat diese Gruppe durch dieselbe Methode ihre eigenen Daten widerlegt. Die verwendete Methode der Immunpräzipitation hat die Nachteile, dass es zu Schwierigkeiten bei der Detektion hochspezifischer Antikörper kommen kann (Miernyk and Thelen 2008) und dass

niedrig abundante Antikörper durch die vielen Waschvorgänge verloren gehen können (Huang and Kim 2013). So ist diese Methode vor allem für höher abundante Antikörper geeignet (Huang and Kim 2013). Ein weiterer großer Nachteil der Immunpräzipitation ist, dass die unspezifische Bindung von Proteinen, wie zum Beispiel an die Matrix der Beads, häufig zu falsch positiven Ergebnissen führt (Sousa et al. 2011). Auch bei kommerziellen Antikörpern ist die Anwendbarkeit in der IP ein gängiges Problem. So ist die Verwendung der Immunpräzipitation als Hauptmethode zur Identifizierung eines noch unbekanntes Antigens zwar durchaus möglich, es sprechen jedoch auch einige Gründe dafür vergleichend noch weitere Methoden anzuwenden. Da man nicht weiß, ob der BNP-Antikörper überhaupt fähig ist in der IP etwas zu präzipitieren, war in diesem Fall die IP vielleicht nicht die geeignete Methode, um die Spezifität von BNP-IgG zu überprüfen.

Eine weitere Möglichkeit, warum das auslösende Alloantigen noch nicht gefunden wurde, könnte sein, dass die Auswahlkriterien zur Identifikation des Alloantigens falsch getroffen wurden. So ist eventuell die Annahme, dass das Protein zwingend im Impfstoff vorkommen muss, um als Kandidatenprotein zu gelten, falsch, denn es könnte auch andere Auslöser für eine Antikörperreaktion geben. Eine alternative Erklärung, warum die BNP-Kühe nach der Impfung pathogene Antikörper gegen Rinderproteine ausbilden, wäre zum Beispiel, dass es durch die Impfung zur Änderung von Oberflächenstrukturen auf ihren Zellen kommt. Haptene beispielsweise sind kleine Moleküle, die alleine keine Immunantwort induzieren, wenn sie jedoch an ein Trägermolekül gebunden haben, als Antigen wirksam werden können (Chipinda et al. 2011). Haptene sind in der Lage, Autoimmunreaktionen nach Medikamentengabe hervorzurufen (Chang and Gershwin 2010). Demnach entstehen bei der Verstoffwechslung des Medikaments Metabolite, die potente Haptene ausbilden können, welche an Proteine auf Zellen binden und dadurch das Antigenrepertoire der Zellen abändern (Chang and Gershwin 2010, Garratty 2009). Da dieses neue Antigen für den Körper fremd ist, werden Autoantikörper dagegen gebildet (Chang and Gershwin 2010). Ein bekanntes Beispiel für eine durch Haptene ausgelöste Autoimmunkrankheit ist die Medikamenten-induzierte immunhämolytische Anämie (DIIHA) beim Menschen (Garratty 2009). Bereits 125 Medikamente konnten bisher als DIIHA-auslösend identifiziert werden (Garratty 2009). Die meisten davon sind Antibiotika, jedoch befinden sich auch einige entzündungshemmende und anti-neoplastische Medikamente darunter (Garratty 2009). Je nach Medikament ist der

Mechanismus, der zur DIIHA führt, anders und es ist noch nicht jeder vollständig geklärt (Garratty 2009). Der Wirkmechanismus für den antibiotischen Wirkstoff Cefotetan ist beispielsweise bekannt (Garratty 2009). Seine Stoffwechselprodukte binden im Blutkreislauf kovalent an Proteine auf der Erythrozytenoberfläche (Garratty 2009). Dies schädigt die Zellen zwar nicht per se, die Patienten können jedoch IgG gegen diese Medikamentenbestandteile ausbilden (Garratty 2009). Binden die Antikörper dann an die neu entstandenen Antigene, kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und zur extravasalen Zerstörung der Erythrozyten (Garratty 2009). In schlimmen Fällen kann die DIIHA auch zum Nierenversagen und zum Tod führen (Garratty 2009).

Daten zeigen jedoch, dass die meisten Patienten, bei denen Hapten-induzierte Autoantikörper nachweisbar sind, keine Symptome entwickeln (Chang and Gershwin 2010). Der Mechanismus, der dazu führt, dass die Patienten zwar Autoantikörper bilden, jedoch keine Symptome zeigen, ist noch unklar (Chang and Gershwin 2010). In Bezug auf die BNP ist dies außerordentlich interessant, da auch bei den BNP-Kühen die pathogenen Antikörper im Serum nachweisbar sind (Foucras et al. 2011), jedoch zu keiner Symptomatik bei den BNP-Kühen, sondern erst bei den Kälbern führen. Es müsste sich also um einen Mechanismus handeln, bei dem die pathogenen Antikörper zwar entstehen, der eine Bindung oder die Wirkung der Antikörper *in vivo* in diesem Individuum jedoch verhindert, sodass die Antikörper erst nach dem Transfer in die Kälber binden und eine Symptomatik hervorrufen.

Es stellt sich weiterhin die Frage, inwiefern die geimpften Kontrollkühe anders auf die Impfung reagiert haben könnten als die BNP-Überträgerkühe. Haben sie nach der Impfung einfach keine Haptene ausgebildet oder reagierten sie immunologisch anders auf die neuen Hapten-Antigene? Die zweite Variante würde für eine unterschiedliche Immunreaktion von geimpften Kontroll- und Überträgerkühen sprechen. Zur ersten Variante gibt es beim Menschen bereits Informationen, dass auch hier nur ein geringer Prozentsatz an Patienten, die das gleiche Medikament verabreicht bekommen haben, Haptene bzw. Hapten-induzierte Antikörper produzieren (Chang and Gershwin 2010). Dies weist auf einen komplexen, bislang aber unbekanntem Mechanismus hin, der verschiedene Medikamenten-, Patienten- und Umwelt-assoziierte Faktoren einbezieht (Chang and Gershwin 2010).

Es handelt sich bei dieser Hapten-Theorie nur um eine Alternative zu der Hypothese, dass die Produktion der pathogenen Antikörper auf eine Reaktion der BNP-Kühe auf

Verunreinigungen des Impfstoffes PregSure BVD zurückgeht (Bastian et al. 2011). Mit PregSure BVD wurde erstmals ein neuartiges Adjuvans bei Rindern eingesetzt, das zur Ausbildung von Nanokomplexen führt, die von den dendritischen Zellen aufgenommen werden und so eine verlässlichere Immunität der Rinder gegen BVD bewirken sollten als die anderen BVD-Vakzinen auf dem Markt (Deutskens et al. 2011). Dabei wäre es zum Beispiel denkbar, dass dieser Mechanismus der Bindung an dendritische Zellen zu unterschiedlichen Immunreaktionen der beiden Rindergruppen geführt hat. Um einer Hapten-Theorie nachzugehen, müssten zukünftig noch eingehende Untersuchungen erfolgen. Sie soll vorerst jedoch aufzeigen, dass bei der Suche nach dem BNP-auslösenden Antigen noch weitere Möglichkeiten der Antikörperentstehung in Betracht gezogen werden müssen. Denn sicher nachgewiesen werden konnte bisher durch die Kolostrum- (Friedrich et al. 2009) und Serum-Transferversuche nur, dass es sich bei der BNP um eine Antikörper-induzierte Krankheit handelt (Foucras et al. 2011). Worauf die Antikörperbildung beruht, konnte allerdings noch nicht bewiesen werden.

Um herauszufinden, ob *in vitro* eine Bindung der BNP-Antikörper an die Zellen von BNP-Kühen gezeigt werden kann und es sich damit eventuell tatsächlich um Antikörper gegen Proteine handelt, die die BNP-Rinder auch selbst exprimieren, testeten wir mit zwei Methoden das Bindungsverhalten von BNP-IgG an PBL von geimpften Kontrollkühen und von BNP-Kühen (Kapitel 4.2). Die Versuche zeigten bei allen getesteten BNP-Seren, dass es keine Unterschiede bei der Bindung von Kontroll- und Überträger-PBL gab. BNP-IgG band durchschnittlich etwa zwei Drittel der Kontroll- und BNP-Lymphozyten, wobei nur leichte individuelle Schwankungen zu sehen waren (Abb. 4.2 und 4.3). Wir konnten somit nachweisen, dass BNP-IgG ebenso an die Zellen der BNP-Kühe bindet wie an die der geimpften Kontrollkühe. Unsere Daten zeigen also eine deutliche Bindung von BNP-IgG an die Zellen beider Kuhphänotypen ohne nachweisbare Unterschiede auf. Dies spricht dafür, dass sowohl Kontroll- als auch Überträgerkühe das BNP-auslösende Antigen exprimieren. Die Daten widerlegen außerdem Versuche einer anderen Gruppe, die eine Autoreaktivität von BNP-IgG zunächst ausschloss, weil BNP-Serum keine Proteine, weder aus PBL derselben BNP-Kuh noch von anderen BNP-Kühen immunpräzipitierte (Deutskens 2012, Deutskens et al. 2011). Dabei war auffällig, dass BNP-IgG in diesen Versuchen kein einziges Protein aus BNP-PBL präzipitierte, obwohl die IP eine Methode ist, die für ihre vielen unspezifischen Bindungen bekannt

ist (Sousa et al. 2011). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass mittels dieser Methode kein einziges Protein präzipitiert werden konnte, zumal es sich bei den getesteten BNP-IgG um BNP-Serum mit einer Vielzahl an weiteren Antikörpern handelte. Spätere Versuche dieser Arbeitsgruppe ergaben dann entgegen ihren vorigen Experimenten ebenfalls eine Reaktivität von BNP-IgG mit Proteinen von mehreren Überträger-PBL (Deuskens 2012), was nun im Einklang mit unseren Daten zum Bindungsverhalten von BNP-IgG steht.

Bei der Suche nach der Spezifität des BNP-auslösenden Antikörpers besteht die Möglichkeit, dass die Spezifität bislang nicht entdeckt werden konnte, weil sie in den Versuchen durch andere, stärker abundante Reaktionen überdeckt wurde. Ein Beispiel für eine immunmedierte Krankheit, bei der solch eine hochabundante Immunreaktion lange Zeit die niedrig affine, jedoch pathogenetisch relevante Immunreaktion überdeckte, ist die transfusionsassoziierte akute Lungenschädigung (TRALI) beim Menschen. Bei der TRALI kommt es nach Bluttransfusionen durch große Mengen von Antikörpern aus dem Spenderblut innerhalb weniger Stunden zu einem akuten Lungenödem (Greinacher et al. 2010). Bei zwei Drittel der TRALI-Patienten konnten MHCII-Antikörper nachgewiesen werden, die jedoch nur schwach pathogen sind und nicht das ernste klinische Bild auslösen (Reil et al. 2008). Neuere Studien belegen, dass dafür vielmehr Antikörper gegen das humane neutrophile Antigen (HNA) 3a verantwortlich sind (Greinacher et al. 2010). Sobald Menschen, die kein HNA-3a, sondern nur HNA-3b auf ihren neutrophilen Granulozyten exprimieren, in Kontakt mit fremdem Blut kommen, das HNA-3a enthält, produzieren sie Antikörper dagegen. Wird Plasma dieser Personen anderen HNA-3a exprimierenden Menschen transfundiert, so kommt es zur aktiven Aggregation von Granulozyten und zum Auftreten von TRALI (Greinacher et al. 2010). Durch die bei TRALI gleichzeitig erscheinende Immunreaktion der Patienten mit hochabundanten Alloantikörpern gegen MHCII wurde die pathogenetisch relevante Immunreaktion gegen das HNA-3a-Alloantigen jahrzehntelang verschleiert, was die Identifizierung technisch extrem schwierig und sehr langwierig machte (Reil et al. 2008). Das Beispiel dieser Krankheit zeigt deutlich, dass anti-MHCII-Antikörper stark abundant und durchaus dazu in der Lage sind, gleichzeitig auftretende Immunreaktionen mit niedriger affinen Antikörpern zu überdecken. Dass dies auch bei den Versuchen zum BNP-auslösenden Antikörper der Fall war, ist durchaus möglich. Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ging bereits hervor, dass sowohl Kontroll- als auch BNP-IgG generell

ein sehr breites Spektrum an Proteinen aus dem Proteom von Thrombozyten und PBL von Kälbern binden (Euler 2013). Bei einem solch breiten Antikörperrepertoire ist es schwierig, einen niedrig affinen Antikörper zu identifizieren, da sehr viele Nebenreaktionen auftreten. Zudem ist die Anwesenheit von anti-Leukozyten-Antikörpern (auch gegen MHC I) bei Rindern während und nach der Trächtigkeit physiologisch und ist bedingt durch eine Immunisierung des Muttertieres mit paternalen Leukozytenantigenen (Bell et al. 2013, Newman and Hines 1980). Es ist daher durchaus nachvollziehbar, dass sowohl bei Kontroll- als auch bei Überträgerkühen MHC I-Alloantikörper nachgewiesen werden konnten.

Die beste Möglichkeit, um die durch die Impfung entstandenen Unterschiede im Antikörperrepertoire zwischen BNP-Kühen und Kontrollkühen zu identifizieren, wäre Proben der Tiere vor der Impfung mit denen nach der PregSure BVD-Impfung zu vergleichen. Auf diese Weise könnte man die unterschiedlichen Immunreaktionen in ihrer Entstehung nachverfolgen und auch eine mögliche Impfstoff-assoziierte Veränderung des Antigenrepertoires ließe sich so genauer betrachten. Dass solche Proben irgendwo existieren ist jedoch unwahrscheinlich, da die meisten Kühe ja erst aufgrund ihrer Eigenschaft als geimpfte Kontrollen oder BNP-Überträger beprobt wurden.

Da der Mechanismus der Antikörperproduktion somit immer noch unklar ist, beschäftigten wir uns zunächst noch einmal grundlegend mit dem Vergleich der Immunkapazitäten von geimpften Kontrolltieren und BNP-Überträgern, um möglicherweise abweichende Immunreaktionen auf die Stimulierung des Immunsystems durch die Impfung genauer charakterisieren zu können. Unsere Vorarbeiten zeigten bereits, dass das Leukozyten-Oberflächenproteom von geimpften Kontroll- und Überträgerkühen signifikante Unterschiede aufweist (Euler 2013). Neunundzwanzig Oberflächenproteine sind auf PBL von Überträgerkühen signifikant niedriger exprimiert als auf Kontroll-PBL (Euler 2013). Darunter befinden sich mit CD-Antigenen einige Regulatoren des Immunsystems (z.B. CD5, CD43) und Integrine (CD29, CD61), die interessante Funktionen bei der Immunreaktion einnehmen. Am stärksten signifikant reguliert ist dabei CD5 (Euler 2013). Eine niedrigere CD5-Expression bei BNP-Überträgerkühen konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels zweier Methoden bestätigt werden (Abb. 4.4 d und 4.5). Sowohl die CD5-Expression auf der Lymphozytenoberfläche (Abb. 4.4 d) als auch die CD5-Gesamtexpression (Abb. 4.5) war bei den BNP-Kühen signifikant niedriger als bei

den geimpften Kontrollkühen.

CD5 ist ein Protein, das bei Mensch, Maus und Rindern auf der Oberfläche von allen T-Zellen exprimiert wird und anhand dessen die B-Zellen bei diesen Spezies in CD5⁺ B1-Zellen und CD5⁻ B2-Zellen differenziert werden können (Wilson and Wilkie 2007). Bei Mensch und Maus können die B1-Zellen dabei noch weiter unterteilt werden in CD5⁺ B1a-Zellen und CD5⁻ B1b-Zellen (Youinou et al. 1999). Die CD5⁻ B1b-Zellen unterscheiden sich dabei nur in der fehlenden CD5-Oberflächenexpression von den CD5⁺ B1a-Zellen, teilen sonst aber alle weiteren Eigenschaften der B1a-Zellen wie die Oberflächenantigene CD11b und CD18 (Youinou et al. 1999). Studien bei Mäusen zeigten, dass CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) und CD19⁺ CD1d⁺ IL-10⁺ regulatorische B-Zellen (Breg) CD5 am stärksten exprimieren (Ordonez-Rueda et al. 2009, Yanaba et al. 2008). Beim Rind können T-Zellen je nach Intensität der CD5-Expression weiterhin eingeteilt werden in CD5^{stark} und CD5^{schwach} (Stabel and Khalifeh 2008). Dabei sind die CD5^{stark} T-Zellen CD2⁺ CD4⁺ oder CD2⁺ CD8⁺, wohingegen die CD5^{schwach} T-Zellen stark positiv sind für den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor (TCR) (Stabel and Khalifeh 2008).

Unsere Daten zeigen eine signifikant niedrigere CD5-Expression von Lymphozyten der BNP-Überträgerkühe im Vergleich zu den geimpften Kontrollkühen (Abb. 4.4 d und 4.5). Welche Lymphozytensubpopulation dabei betroffen ist und ob sich die niedrigere CD5-Expression dabei auf eine Subpopulation beschränkt, muss in weiteren Versuchen, zum Beispiel mittels Doppelfärbungen in der Durchflusszytometrie, ermittelt werden. Ob und welche Bedeutung die niedrigere CD5-Expression bei den BNP-Kühen möglicherweise auf die Pathogenese der BNP hat, ist noch unklar. Zu einer differenziellen CD5-Expression bei Rindern gibt es schon Daten von mit *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP)-infizierten Rindern (Stabel and Khalifeh 2008). Bei klinisch und subklinisch mit MAP-infizierten Rindern konnte ein höherer Prozentsatz an CD5⁻ B-Zellen nachgewiesen werden, bei gesunden Kontrollrindern dagegen ein höherer Prozentsatz CD5⁺ B-Zellen (Stabel and Khalifeh 2008). Dies führten die Autoren auf einen Effekt zurück, der bereits bei Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet werden konnte (Stabel and Khalifeh 2008). So zeigten Patienten mit Morbus Crohn und ulzerativer Colitis ebenfalls eine reduzierte Anzahl an zirkulierenden CD5⁺ B-Zellen auf (Polese et al. 2007). Es wurde vermutet, dass bei diesen Patienten die CD5⁺ B1a-Zellen in den Magen-Darm-Trakt abwandern, da sie polyklonale Antikörper

produzieren und somit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle luminaler Antigene einnehmen (Polese et al. 2007). Ein solcher Effekt wäre auch bei MAP-infizierten Rindern denkbar. Zur funktionellen Bedeutung einer differenziellen CD5-Expression beim Rind ist bislang jedoch nichts bekannt.

Aus Versuchen mit Mäusen ging hervor, dass CD5 durch Interaktion mit CD5-Liganden inhibitorisch auf die Signaltransduktion des TCR und des B-Zellrezeptors (BCR) bei B1a-Zellen wirkt (Fenutria et al. 2014, Tabbekh et al. 2013). So konnte gezeigt werden, dass unreife T-Zellen von CD5^{-/-} Mäusen hyperresponsiv auf TCR-Stimulation reagierten und reife CD5^{-/-} T-Zellen nach TCR-Stimulation eine erhöhte Zellproliferationsrate entwickelten (Tabbekh et al. 2013). Dies lässt sich damit erklären, dass die inhibitorische Wirkung von CD5 bei CD5^{-/-} Mäusen nicht mehr in physiologischem Maße gegeben ist und die Tiere somit durch die fehlende Hemmung stark überreagieren. Übertragen auf die BNP-Kühe könnte dies ebenfalls auf eine überschießende Immunreaktion durch eine niedrigere CD5-Expression hinweisen. Um den Effekt einer reduzierten Interaktion von Zellmembran-gebundenem CD5 mit den CD5-Liganden zu erforschen, wurden Studien mit transgenen Mäusen, die nur eine lösliche, frei zirkulierende Form von CD5 exprimierten, durchgeführt (Fenutria et al. 2014). Diese Mäuse zeigten eine verstärkte Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Fenutria et al. 2014). So entwickelten diese Mäuse nach experimenteller Induktion schwerere Verlaufsformen der Autoimmunkrankheiten Kollagen-induzierte Arthritis und autoimmune Enzephalitis als Gen-unveränderte Mäuse (Fenutria et al. 2014). Die Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen dieser transgenen Mäuse ergab, dass sie verhältnismäßig weniger regulatorische T- und B-Zellen als Gen-unveränderte Mäuse aufwiesen (Fenutria et al. 2014). Der funktionelle Zusammenhang zwischen der reduzierten CD5-Funktion und der geringeren Anzahl an Treg und Breg bei den transgenen Mäusen ist bislang ungeklärt (Fenutria et al. 2014). Die damit verbundene geringere Aktivität von regulatorischen Zellen führten die Autoren jedoch als mögliche Ursache für die erhöhten Immunreaktionen der transgenen Mäuse gegen Autoantigene an (Fenutria et al. 2014). Auch der verminderte inhibitorische Effekt von CD5 auf TCR und BCR durch die reduzierte Interaktion von Zellmembran-gebundenem CD5 mit den CD5-Liganden wurde als weitere mögliche Ursache dafür genannt (Fenutria et al. 2014).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine niedrigere CD5-Expression bei Mensch

und Maus bereits mit einer Reihe immunologischer Phänomene in Verbindung gebracht werden konnten. Die bedeutende Rolle des CD5-Rezeptors als Inhibitor im Immungeschehen wird dabei deutlich. Ob und in welchem Zusammenhang die von uns erhobenen Daten mit der Pathogenese der BNP stehen, ist noch unklar. Eine niedrigere Expression von CD5 spricht jedoch für eine geringere Hemmung des T- und B-Zellrezeptors, weshalb wir eine überschießende Reaktion der BNP-Überträgerkühe auf Immunstimuli vermuteten. Um genauere funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können, muss in zukünftigen Versuchen dabei zunächst konkret abgeklärt werden, ob CD5 bei den BNP-Kühen auf B- oder auf T-Zellen herunterreguliert ist und ob es somit eher zu einer verminderten Hemmung des B- oder des T-Zellrezeptors kommt. Dies kann mittels Doppelfärbungen in der Durchflusszytometrie erfolgen.

Um unsere Hypothese eines Rückgangs der physiologischen Inhibition des T- oder B-Zellrezeptors bei Lymphozyten von BNP-Kühen überprüfen und charakterisieren zu können, wurden polyklonale Stimulationen von Kontroll- und Überträgerlymphozyten durchgeführt. Als reine T-Zell-Stimulantien wurden die Mitogene ConA, PHA und PMA (Abb. 4.6 a - c) verwendet, als B- und T-Zell-Mitogen diente PWM (Abb. 4.6 d). Bei diesen Experimenten wurde ein deutlich hyperproliferativer Phänotyp der BNP-PBL, sowohl nach reiner T- als auch nach T- und B-Zellstimulation sichtbar (Abb. 4.6). Die Daten zeigten eine überraschend stark abweichende und einheitliche Reaktion aller Überträgerkühe im Vergleich zu allen Kontrollkühen auf polyklonale Zellstimulation (Abb. 4.6). Auf alle vier getesteten Mitogene reagierten die BNP-Rinder geschlossen mit einer hochsignifikant stärkeren (ConA: 8-fach, PHA: 5-fach, PMA: 1,6-fach, PWM: 5-fach) Zellproliferationsrate als die Kontrollkühe (Abb. 4.6). Unsere Versuche zeigen somit erstmalig deutliche Unterschiede bei der Immunkapazität zwischen zwei Rinder-Phänotypen auf, die so noch nie vorher beim Rind beschrieben wurden.

In einer früheren Studie konnten signifikant unterschiedliche Reaktionen von PBL *boviner Leukose Virus* (BLV) -positiver Kühen und BLV-negativer Kühe auf die Stimulantien ConA und PWM nachgewiesen werden (Erskine et al. 2011). Dabei zeigten BLV-positive Kühe nach ConA-Stimulation eine etwa 0,7-fach niedrigere Proliferationsrate als BLV-negative Kühe, nach PWM-Stimulation hingegen eine circa 1,5-fach höhere Proliferationsrate (Erskine et al. 2011). Die Autoren deuteten diese Ergebnisse so, dass eine BLV-Infektion sowohl Auswirkungen auf T-Zellen als auch

auf B-Zellen hat, konnten den Einfluss der Infektion auf diese beiden Subpopulationen aber nicht genauer spezifizieren (Erskine et al. 2011).

Nach den überraschend deutlichen Ergebnissen dieser Stimulationen stellte sich die Frage nach der Ursache für die abweichenden Reaktionen zwischen Kontroll- und BNP-Kühen auf die polyklonale Stimulation. Deshalb verglichen wir im nächsten Schritt in einer differenziellen Proteomanalyse das Proteinrepertoire von Kontroll- und Überträgerlymphozyten auf molekularer Ebene, sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach polyklonaler Stimulation (Kap. 4.4.2). Da uns dabei die Reaktionen von B- und T-Zellen interessierten, verwendeten wir hierzu das T- und B-Zell-Stimulanz PWM. Die Verwendung einer neuartigen Zellfraktionierungsmethode ermöglichte es uns, die Proteinausstattung der drei Zellkompartimente Plasmazellmembranoberfläche, Zytosol und Nukleus getrennt voneinander zu untersuchen. Bei diesem Versuch war von Interesse, wie die Zellen auf molekularer Ebene auf die polyklonale Stimulation reagieren und welche Unterschiede sich im Proteinrepertoire der drei Zellkompartimente von Kontroll- und Überträger-PBL nach PWM-Stimulation feststellen lassen.

In diesem Discovery Proteomics Experiment wurde die Proteinausstattung der Zellen verglichen und differenziell exprimierte Proteine zwischen PWM-stimulierten Kontroll- und Überträgerlymphozyten quantifiziert. Ein Proteomik-Experiment bietet den Vorteil der größtmöglichen Identifikationsbreite des Proteinrepertoires von Zellen und die Möglichkeit der Entdeckung neuer, noch unbeschriebener Proteine, die eine Rolle bei der untersuchten Immunreaktion des Rindes spielen. Durch vorherige Zellfraktionierung ist es zusätzlich möglich, die identifizierten Proteine für jedes Zellkompartiment getrennt betrachten zu können und eine bestmögliche analytische Tiefe zu erzielen. Insgesamt konnten mittels dieser Methode 3690 Proteine aus allen drei Zellfraktionen von unstimulierten und PWM-stimulierten Kontroll- und Überträger-PBL identifiziert werden (Kap. 4.4.2). Davon gehörten 487 Proteine zur Plasmazellmembranoberfläche (Kap. 4.4.2.1 und 4.4.2.2), 1605 zum Zytosol (Kap. 4.4.2.3 und 4.4.2.4) und 1598 zum Kompartiment Zellkern (Kap. 4.4.2.5 und 4.4.2.6). Die große Anzahl eindeutig identifizierter Proteine spricht für ein technisch gelungenes, qualitativ hochwertiges Experiment. Dieses stellt zudem die Erstbeschreibung des Proteomes der einzelnen Zellkompartimente von unstimulierten und stimulierten Rinderlymphozyten dar. Des Weiteren handelt es sich bei Mensch und Tier auch um den ersten proteomischen Datensatz, anhand dessen

die Auswirkung von PWM auf das Leukozyten-Proteom charakterisiert wurde (PubMed-Recherche September 2014).

Die Ergebnisse machten eine deutliche Dichotomie im Proteinrepertoire von Kontroll- und BNP-Lymphozyten nach Stimulation mit PWM sichtbar. Es war auffällig, dass die BNP-PBL nach PWM-Stimulation (Tab. 4.2) im Kompartiment Plasmazellmembranoberfläche wesentlich weniger Proteine hochregulierten als die Kontrolllymphozyten (Tab. 4.1). Auf der Zelloberfläche regulierten die geimpften Kontrollkühe 110 Proteine hoch (Tab. 4.1). Im Vergleich dazu reagierten die BNP-Überträger mit der Hochregulierung von nur sieben Proteinen auf die PWM-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollkühen (Tab. 4.2).

Im Zytosol betrug die Zahl der hochregulierten Proteine bei den Kontrollkühen 166 (Tab. 4.3) und 105 bei den Überträgerkühen (Tab. 4.4). Die Anzahl der im Nukleus nach PWM-Stimulation hochregulierten Proteine war mit 153 Proteinen bei den Kontrollkühen (Tab. 4.5) und 164 Proteinen bei den Überträgern (Tab. 4.6) dagegen relativ ausgeglichen. Dieser Datensatz enthält erstmals das gesamte Proteinrepertoire von bovinen PBL, aufgetrennt in drei Zellkompartimente. Die Daten geben Aufschluss über das Proteinrepertoire von gesunden Kontrollkühen und von BNP-Überträgerkühen, sowohl für unstimulierte als auch für PWM-stimulierte Zellen. Je nach Fragestellung können so auch in Zukunft die unterschiedlichen Informationen dieses Datensatzes miteinander verglichen und ausgewertet werden.

Da im Immungeschehen vor allem Proteine auf der Zelloberfläche von Interesse sind, betrachteten wir im Weiteren die auf der Plasmazellmembran nach PWM-Stimulation hochregulierten Proteine näher. Zunächst wurden Netzwerkanalysen mit allen nach Stimulation hochregulierten Oberflächenproteinen durchgeführt, um einen Eindruck von den Funktionsbereichen der identifizierten Proteine zu bekommen. Hier zeigte sich, dass die bei Überträgerkühen nach PWM-Stimulation hochregulierten Proteine zum Großteil andere Funktionen einnehmen als die vielen bei Kontrollkühen hochregulierten Proteine (Tab. 4.7 und 4.8). Überträger-PBL regulierten nach PWM-Stimulation signifikant Proteine mit den Funktionen inhibitorische MHC-I-Aktivität und IgE-Bindung hoch (Tab. 4.8), die sich elementar von den Funktionsbereichen Transmembran-Transporter-Aktivität und Muster-Wiedererkennung-Aktivität der hochregulierten Kontroll-PBL unterscheiden (Tab. 4.7).

Betrachtet man die einzelnen identifizierten Plasmazellmembranproteine, so wird an bestimmten Proteinen erneut deutlich, dass sich Kontroll- und Überträgerkühe

fundamental in ihrer Immunreaktion auf eine polyklonale Stimulation mit PWM unterscheiden.

Ein wichtiges Protein, das von den Kontrollkühen nach PWM-Stimulation im Vergleich zu BNP-Kühen 4,6-fach hochreguliert wurde, ist der TLR2 (Tab. 4.1 Protein 16). Toll-like Rezeptoren stellen primäre Sensoren des angeborenen Immunsystems der Säugetiere dar, die Mikroorganismen über Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMP) erkennen (Takeda et al. 2003). So werden TLRs vor allem von antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch von B- und T-Zellen exprimiert (Imanishi et al. 2007). So spielen sie nicht nur beim angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle, sondern auch bei der T-Zell-medierten adaptiven Immunantwort durch die Stimulierung von Th1-induzierenden Zytokinen (Medzhitov 2001). TLR2 im Speziellen wird bei Säugetieren auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen exprimiert (Hennessy et al. 2010). Mit Hilfe von CD36 erkennt es spezifisch Komponenten wie zum Beispiel Lipoteichonsäure von Gram-positiven Bakterien (Hennessy et al. 2010). Durch Liganden wie das synthetische Lipopeptid Pam₃CSK kann TLR2 Heterodimere mit TLR1 ausbilden, was eine noch spezifischere Erkennung der PAMPs ermöglicht (Hennessy et al. 2010) und zur Induktion einer protektiven Immunantwort bei Infektionen führt. Untersuchungen zu TLR2 bei Mäusen zeigten, dass dieser Rezeptor von Th1-Zellen exprimiert wird und so eine direkte Aktivierung von Th1-Zellen induzieren kann (Imanishi et al. 2007). Die Daten könnten darauf hindeuten, dass eine erhöhte Expression von TLR2 auf Kontrollzellen für eine bevorzugte Th1-Immunantwort der Kontrolltiere nach PWM-Stimulation spricht.

Auch das nach PWM-Stimulation auf Kontrollzellen stärker abundante Protein CD55 (Tab. 4.1 Protein 17) kann mit einer geregelten, protektiven Immunantwort in Verbindung gebracht werden. Zu diesem Protein ist spezifisch für das Rind noch nichts bekannt (PubMed-Recherche September 2014). Bei Mensch und Maus ist CD55 ein Komplement-Regulationsfaktor, der durch Bildung der C3/C5-Konvertase die Zellyse durch das Komplement-System verhindert (Obaid et al. 2014). Es wurde beschrieben, dass naive humane CD4⁺ T-Zellen durch Stimulation mit CD55 einen Th1-Phänotyp ausbilden (Sutavani et al. 2013). Diese und weitere bei Kontrollkühen nach PWM-Stimulation hochregulierten Proteine stehen im Zusammenhang mit einer Th1-Immunantwort.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren regulierten die BNP-Rinder mit vier von sieben

Proteinen nach PWM-Stimulation vor allem MHCI (Tab. 4.2 Proteine 1, 4, 6) und MHCII (Tab. 4.2 Protein 3) hoch. Auch die Kontrollkühe regulierten MHCI und MHCII nach der PWM-Stimulation hoch, was für Antigen-präsentierende Komplexe nach einer Immunstimulation nicht weiter ungewöhnlich und sogar zu erwarten ist. Auffällig ist nur, dass die Überträgerkühe dies wesentlich deutlicher tun als die Kontrollkühe (Kap. 4.4.2.1 und 4.4.2.2). Bei den BNP-Kühen war MHCI (Tab. 4.2 Protein 1) beispielsweise um den Faktor 46,3 höher reguliert, bei den Kontrollkühen (Tab. 4.1 Protein 31) nur um den Faktor 3,5. Die restlichen drei Proteine, die ausschließlich von BNP-Kühen nach PWM-Stimulation hochreguliert wurden, waren CD103 (Tab. 4.2 Protein 7), CD85h (Tab. 4.2 Protein 2) und Galectin 3 (Tab. 4.2 Protein 5). CD103 (Integrin alpha E, Tab. 4.2 Protein 7) ist ein Oberflächenprotein, das zur Familie der Integrine gehört (Yoshimoto et al. 2014). Beim Rind ist bisher noch nichts zur Expression oder zur Funktion von CD103 publiziert (PubMed-Recherche September 2014). Es wird beim Menschen von mehreren Lymphozytensubpopulationen wie T-Lymphozyten und intraepithelialen Lymphozyten des Darmepithels und der Lamina propria exprimiert (Yoshimoto et al. 2014). Des Weiteren exprimieren bei Mensch und Maus auch eine Population regulatorischer T-Zellen (Pastille et al. 2014) und bestimmte spezialisierte dendritische Zellen (DCs) CD103 (Farache et al. 2013). DCs sind eine heterogene Gruppe von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Torres-Aguilar et al. 2010). Je nach DC-Typ können sie sowohl Immunität als auch Toleranz induzieren (Torres-Aguilar et al. 2010). Mit ihrer Funktion Antigene zu binden, in die Lymphknoten zu migrieren und Antigene zu präsentieren, können sie eine T-Zell-medierte Immunantwort auslösen (Desch et al. 2014). CD103⁺ DCs stellen dabei eine Subgruppe der DCs dar und haben die einzigartige Fähigkeit apoptotische Zellen aufzunehmen und deren Antigene an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren (Desch et al. 2014). Tolerogene DCs (tDCs) haben die Aufgabe, die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel durch Induktion von Tregs zu verhindern (Torres-Aguilar et al. 2010). Eine Expression von CD103 auf Tregs hingegen kann mit einer Immunsuppression in Verbindung gebracht werden (Pastille et al. 2014). So konnte zum Beispiel bei Mäusen und Menschen mit Kolonkarzinom eine erhöhte Anzahl an CD103⁺ Treg festgestellt werden, was durch die bevorzugte Migration dieser Zellen in entzündete Gewebe erklärt werden kann (Huehn et al. 2004, Pastille et al. 2014). Diese Tumor-assoziierten CD103⁺ Tregs supprimieren eine Immunantwort von CD8⁺

T-Zellen deutlich stärker als CD103⁺ Tregs, was ein Grund für die ausgeprägte Immunsuppression der Krebspatienten ist (Pastille et al. 2014).

Da für das Proteomik-Experiment alle peripheren Blut-Leukozyten verwendet wurden, kann im Moment noch nicht gesagt werden, von welcher Zellpopulation die erhöhte CD103-Expression der BNP-Zellen nach PWM-Stimulation ausging. Dies muss in weiteren Versuchen noch überprüft werden zum Beispiel mittels Doppelfärbungen mit Zellpopulationsmarkern in der Durchflusszytometrie oder mittels *in vitro* Generierung und anschließender Phänotypisierung von dendritischen Zellen der BNP-Überträger vor und nach PWM-Stimulation. Die bekannten Informationen zu CD103 sprechen bisher für einen tolerogenen Phänotyp von CD103-exprimierenden BNP-Zellen nach PWM-Stimulation. Was dieser funktionell für diese Rinder bedeutet, muss in weiteren Versuchen noch genauer untersucht werden.

Ein weiteres Protein, das die BNP-PBL nach PWM-Stimulation auf der Oberfläche hochregulierten, war CD85h (Tab. 4.2 Protein 2). Dieses Protein heißt auch Leukozyten Immunglobulin-like Rezeptor A2 (LILRA2) und gehört zu einer Familie aktivierender und inhibierender Rezeptoren, die konstitutiv auf der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert sind (Lu et al. 2012). Da zur Expression oder zur Funktion von CD85h beim Rind bislang ebenfalls noch keine Informationen publiziert sind (PubMed-Recherche September 2014), handelt es sich auch bei diesem Protein um die Erstbeschreibung im Rinderproteom. CD85h wird beim Menschen vor allem auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen exprimiert, jedoch nur schwach auf dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen (Borges et al. 1997, Lu et al. 2012). Interessanterweise zeigten *in vitro* Versuche mit humanen Zellen, dass CD85h in der Lage ist, die Differenzierung dendritischer Zellen zu hemmen und so das angeborene Immunsystem zu supprimieren (Lee et al. 2007). Untersuchungen an Lepra-Patienten zeigten, dass Menschen, die die tuberkuloide Form von Lepra ausbilden, weniger CD85h exprimieren als Patienten, die die lepromatöse Form ausbilden (Bleharski et al. 2003). Bei der lepromatösen Form, die mit einer signifikant höheren CD85h-Expression einhergeht, wird eine Th2-Immunantwort ausgebildet, was nur zu einer geringen Abtötung der Bakterien und zu einer schweren Entzündung führt. Patienten mit tuberkuloider Lepra hingegen entwickeln eine protektive Th1-Immunantwort, durch welche die Bakterien schneller abgetötet werden und nur eine geringe Entzündung entsteht (Bleharski et al. 2003). Diese Daten sprechen dafür, dass eine erhöhte CD85h-Expression mit einer vorrangigen

Th2-Immunantwort einhergeht, die im Fall der Infektion mit Mykobakterien nicht protektiv ist. Auch bei den BNP-Kühen könnte die erhöhte CD85h-Expression nach PWM-Stimulation für eine bevorzugte Th2-Immunantwort der Tiere nach Immunstimulation oder für die Inhibition der Reifung dendritischer Zellen sprechen. Hierzu müssen in Zukunft jedoch erst noch weitere Experimente erfolgen, um genauere Aussagen treffen zu können. Denn da CD85h beim Menschen auf mehreren verschiedenen Zellen exprimiert wird und beim Rind noch keine Daten dazu bekannt sind, ist auch bei diesem Protein unklar, von welchen Zellen die erhöhte CD85h-Expression der BNP-Kühe nach PWM-Stimulation ausgeht. Dies kann in der Fluoreszenzzytometrie mittels Doppelfärbungen von PWM-stimulierten BNP-PBL mit Lymphozyten-Subpopulationsmarkern und anti-CD85h-Antikörper untersucht werden.

Galectin 3 (Tab. 4.2 Protein 5) war bei den Überträgerkühen nach PWM-Stimulation ebenfalls höher abundant (Faktor 2,8) als bei den Kontrolltieren. Bei Galectin 3 handelt es sich um ein β -Galactosidase-bindendes Lektin, dessen Expression bereits auf Makrophagen des Rindes beschrieben wurde (Lee et al. 2009). Diese Rinder waren infiziert mit *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) und zeigten granulomatöse Läsionen des Darms auf, in denen die Galectin 3⁺ Makrophagen gefunden wurden (Lee et al. 2009). Aufgrund dieser Beobachtung vermuteten die Autoren eine Verbindung zwischen Galectin 3 und der Ausbildung dieses chronischen Granulationsgewebes im Darm von MAP-infizierten Rindern (Lee et al. 2009). Beim Rind konnte Galectin 3 des Weiteren auf Epithelzellen des Uterus und von Plazentomen (Froehlich et al. 2012), im Corpus luteum (Hashiba et al. 2014) sowie bei Zellen des Respirations- und des Magen-Darm-Traktes (Kaltner et al. 2002) gefunden werden. Beim Menschen findet man es verstärkt auf Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren, wobei beide Zellarten auch in der Lage sind Galectin 3 zu sekretieren (Liu et al. 1995). Ebenso wird Galectin 3 beim Menschen von CD4⁺ T-Gedächtniszellen und regulatorischen T-Zellen (Hsu et al. 2009), von Mastzellen (Frigeri and Liu 1992), neutrophilen (Truong et al. 1993a) und eosinophilen Granulozyten (Truong et al. 1993b) exprimiert. Auch bei der Maus wird es von Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen exprimiert (Sano et al. 2003). Zudem kann es auch auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gefunden werden, jedoch erst nachdem diese mit anti-CD3 oder ConA aktiviert wurden (Joo et al. 2001). Da eine Galectin 3-Expression bei Blutzellen des Rindes bislang nur auf Makrophagen

nachgewiesen werden konnte (Lee et al. 2009), sollten zukünftig auch weitere Leukozytenpopulationen untersucht werden, um das komplette Expressionsmuster von Galectin 3 auf Rinder-Leukozyten zu kennen.

Galectin 3 hat viele Funktionen im Immungeschehen. Je nach Lokalisation übernimmt es bei T-Zellen von Mensch und Maus vielfältige Aufgaben (Hsu et al. 2009). Extrazellulär induziert es beispielsweise Apoptose, die Aktivierung und Migration von Zellen, hemmt jedoch die TCR-Signaltransduktion, Zelladhäsion und IL-5-Produktion (Hsu et al. 2009). Intrazellulär stimuliert es das Zellwachstum und inhibiert Apoptose (Hsu et al. 2009). Eine weitere interessante Funktion ist die Regulation der Immunantwort durch Galectin 3. In Studien mit Galectin 3^{+/+} und Galectin 3^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass Galectin 3^{+/+} Mäuse mehr Th2-spezifische und weniger Th1-spezifische Zytokine sowie einen höheren IgE-Serumspiegel als Galectin 3^{-/-} Mäuse aufwiesen (Zuberi et al. 2004). In einem unabhängigen Modell zur akuten atopischen Dermatitis entwickelten Galectin 3^{+/+} Mäuse zusätzlich zu diesen Beobachtungen auch deutlich stärkere Symptome einer atopischen Dermatitis als Galectin 3^{-/-} Mäuse (Saegusa et al. 2009). Diese Ergebnisse zeigen eine Galectin 3-mediierte Th2-Immunantwort auf (Hsu et al. 2009) und lassen weiterhin auf einen Zusammenhang von Galectin 3 mit allergischen Vorgängen schließen. Neue Studien zeigen, dass Galectin 3 beim Menschen ebenfalls zu einer verminderten Differenzierung von Monozyten zu DCs und damit zu einer mangelnden T-Zell-Antigenpräsentation führen kann (Chung et al. 2013).

Beim Rind ist zum Einfluss von Galectin 3 auf das Immungeschehen noch nichts bekannt. Im Zusammenhang mit der BNP sind die bei Maus und Mensch bekannten Funktionen jedoch sehr interessant. Galectin 3 ist mit einer Th2-Immunantwort assoziiert, was erneut als Indiz für eine bevorzugte Th2-Immunantwort der BNP-Überträgerkühe nach PWM-Stimulation gewertet werden kann und unsere Daten einer abweichenden Immunreaktion von Kontroll- und Überträgertieren weiter festigt. Der negative Einfluss von Galectin 3 auf die Ausbildung dendritischer Zellen spricht für eine supprimierende Funktion von Galectin 3 auf das angeborene Immunsystem und somit auch für eine eingeschränkte Antigenpräsentation der nach PWM-Stimulation vermehrt Galectin 3-exprimierenden BNP-PBL. Des Weiteren stimmen die Daten von höheren IgE-Serumspiegeln bei Galectin 3^{+/+} Mäusen mit den durchgeführten Netzwerkanalysen der bei BNP-Kühen hochregulierten Proteine überein, bei denen eine IgE-bindende Funktion dieser Proteine gezeigt wurde

(Tab. 4.8). Insgesamt ist die Immunreaktion der BNP-Kühe mit Hochregulierung von Galectin 3 nach PWM-Stimulation sehr interessant. Um ihre volle Bedeutung zu erfassen, muss die Funktion von Galectin 3 auf das Immungeschehen beim Rind zukünftig näher charakterisiert werden. In Bezug auf die BNP ist dabei von besonderem Interesse, ob die PBL der Überträgerkühe nach Immunstimulation tatsächlich vermehrt IgE-Antikörper bilden, was in weiteren Versuchen untersucht werden muss.

Vergleicht man die Immunfunktionen der drei identifizierten Proteine CD103, CD85h und Galectin 3, so ist auffällig, dass alle im Zusammenhang mit einer gestörten Differenzierung von DCs genannt werden und somit alle mit einer verminderten Antigenpräsentation in Verbindung gebracht werden können. CD85h und Galectin 3 wird außerdem zugeschrieben, dass sie bevorzugt eine Th2-, statt einer Th1-Immunantwort induzieren. Dass diese Funktion gleich bei zwei von drei Proteinen bekannt ist, gibt erneut einen konkreten Hinweis auf eine andere Immunreaktion der Überträgerkühe nach PWM-Stimulation.

Insgesamt zeigen die betrachteten, differenziell exprimierten Oberflächenproteine eine starke Dichotomie von Kontroll- und Überträger-PBL nach PWM-Stimulation auf. Nach dem aktuellen Stand der Literatur spricht die vermehrte Expression von TLR2 auf PWM-stimulierten Kontrollzellen dabei für eine bevorzugte Th1-Antwort der Kontrollkühe (Imanishi et al. 2007) und die vermehrte Expression von Galectin 3 (Hsu et al. 2009) und LILRA2 (Bleharski et al. 2003) für eine bevorzugte Th2-Antwort der BNP-Kühe. Um diese Hypothese abschließend zu beweisen, wollten wir die Entstehung von Th1- und Th2-Zellen durch die PWM-Stimulation verifizieren. Eine Möglichkeit Th-Phänotypen zu detektieren, ist der Nachweis der korrespondierenden Transkriptionsfaktoren, die im Verlauf der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th-Zellen gebildet werden. Es ist bekannt, dass Transkriptionsfaktoren evolutionär hochkonserviert sind (Vaquerizas et al. 2009). Daher entschieden wir uns dazu, die zugehörigen Transkriptionsfaktoren zu den einzelnen Th-Phänotypen bei den Kühen abzufragen, um die entstandene Immunreaktion einem Th-Typ zuordnen zu können. Um unsere Hypothese einer Th1-Immunantwort der Kontrolltiere und einer Th2-Antwort der Überträgertiere nach PWM-Stimulation zu überprüfen, untersuchten wir PWM-stimulierte PBL beider Gruppen auf eine unterschiedliche Expression der jeweiligen Transkriptionsfaktoren (Kap. 4.4.5). T-bet ist ein typischer Transkriptionsfaktor für Th1-Zellen und GATA3 spezifisch für Th2-Zellen (Lazarevic

et al. 2013). Unsere Versuche zeigten eine deutlich höhere Expression von T-bet in stimulierten Kontroll-PBL (Abb. 4.10), was die These einer vorrangigen Th1-Antwort der geimpften Kontrolltiere beweist. Stimulierte BNP-PBL hingegen exprimierten den Th2-spezifischen Expressionsfaktor GATA3 fast 30 Mal stärker als die stimulierten Kontroll-PBL und zeigten so eindeutig eine Th2-Reaktion auf (Abb. 4.11). GATA3 ist beim Rind bislang nur dafür bekannt, Trophoblasten-spezifische Gene zu regulieren (Bai et al. 2011). Im Zusammenhang mit der Induktion von Th-Phänotypen existierten zu T-bet und GATA3 bisher keine Informationen zum Rind, beide Transkriptionsfaktoren konnten jedoch in unseren Versuchen auch beim Rind detektiert werden.

Mit der erhöhten TLR2-Expression bei den Kontrollkühen nach PWM-Stimulation war ein bekannter Vertreter des angeborenen Immunsystems bei diesen Kühen nachweisbar. Da es sich bei den TLRs um wichtige Rezeptoren im Immungeschehen handelt, überprüften wir in weiteren *in vitro* Stimulationen, ob sich auch andere TLRs bei Kontroll- und Überträger-PBL unterschiedlich aktivieren lassen und ob dabei weitere Hinweise auf Unterschiede bei der Immunantwort zwischen den Kuh-Phänotypen detektiert werden können (Kap. 4.4.4). Hierzu stimulierten wir PBL von Kontroll- und BNP-Tieren mit Agonisten für TLR3, TLR4 und TLR9. Als Stimulanz für TLR4 wurde LPS (Abb. 4.9 a) verwendet, da es B-Zellen über TLR4 aktiviert (Lu et al. 2008). CpG-ODN (Abb. 4.9 b) kommt im Genom von Bakterien und Viren vor und bewirkt über TLR9 eine Aktivierung von B-Zellen (Ghamlouch et al. 2014). Poly i:c (Abb. 4.9 c) weist die gleiche Struktur wie doppelsträngige RNA von Viren auf und aktiviert B-Zellen über TLR3 (Marshall-Clarke et al. 2007). Zusätzlich zu den spezifischen TLR-Stimulantien wurde die Reaktion der Zellen auf Zugabe des Impfstoffes PregSure BVD (Abb. 4.9 d) vergleichend getestet, da im Adjuvans von Impfstoffen meist TLR-Agonisten enthalten sind (Steinhagen et al. 2011), was ebenso eine unterschiedliche Reaktion beider Rinder-Phänotypen auslösen könnte. Durch keine der vier getesteten Substanzen konnte ein signifikanter Unterschied bei der Zellproliferationsrate zwischen Kontroll- und Überträgerkühen gezeigt werden (Abb 4.9). Es war sowohl innerhalb der Kuh-Phänotypen zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen nur eine schwache Reaktion auf die getesteten TLR-Agonisten zu beobachten als auch zwischen den stimulierten Zellen von Kontroll- und BNP-Kühen. Somit konnten keine Hinweise auf eine unterschiedliche Ansprechbarkeit von TLR3, TLR4 und TLR9 bei den getesteten Rindergruppen gefunden werden. Bei

zukünftigen Stimulationen sollte die Reaktivität der Zellen auf weitere TLR-Agonisten untersucht werden. Hierbei sollte ebenfalls die Reaktion der Zellen auf *in vitro* Stimulation mit einem TLR2-Agonisten getestet werden, um zu prüfen, ob TLR2 sich bei den Kontrollkühen auch durch direkte Stimulation mit einem Agonisten anregen lässt oder ob es nur durch Stimulation mit anderen Mitogenen vermehrt exprimiert wird, wie es im Proteomik-Experiment der Fall war. Ein geeigneter TLR2-Agonist wäre beispielsweise tri-palmitoyl-S-glyceryl cysteine (Pam₃Cys). Pam₃Cys ist ein synthetisches Analogon zu einem bakteriellen Lipopeptid, das häufig in Adjuvantien von Impfstoffen verwendet wird und TLR2 aktiviert (Steinhagen et al. 2011). Für die hier getesteten TLR3-, TLR4- und TLR9-Agonisten konnten also keine unterschiedlichen Reaktionen zwischen Kontroll- und Überträgerkühen nachgewiesen werden. Nach PWM-Stimulation war bei den BNP-Kühen kein anderer TLR außer TLR2 differenziell reguliert, sodass die Unterschiede zwischen den Rinder-Phänotypen bei den TLRs bisher spezifisch TLR2 betreffen.

Für die BNP-Pathogenese ist nun vor allem von Bedeutung, ob die BNP-Überträgerkühe auch auf die Immunstimulation der Impfung mit PregSure BVD derart abweichend reagiert haben wie auf PWM-Stimulation. PregSure BVD war mit seinem neuartigen Adjuvans darauf ausgelegt, über eine gute zelluläre Immunität eine bessere BVD-Immunität der Tiere zu gewährleisten als die bisherigen BVD-Vakzinen (Deuskens et al. 2011). Ob die BNP-Rinder auf diese Impfung nun auch eine nicht erwünschte Th2- statt einer gegen BVD protektiven Th1-Immunantwort ausgelöst haben, kann nicht mehr mit Sicherheit anhand der vorhandenen PregSure BVD-geimpften Kuhpopulation nachgewiesen werden, da hierzu Probenmaterial der Tiere vor der Impfung fehlt. Um die möglichen Immunreaktionen der BNP-Kühe auf die Impfung eingrenzen zu können, könnten die ausgebildeten anti-BVD-Antikörper bei den Pregsure BVD-geimpften Rindern entsprechend näher charakterisiert werden. Was nämlich derzeit schon für eine Th2-Reaktion der BNP-Tiere auf die Impfung mit PregSure BVD spricht, ist die Tatsache, dass die pathogenen BNP-Antikörper vom Isotyp IgG₁ sind (Assad et al. 2012) und dass die Produktion von IgG₁-Antikörpern beim Rind hauptsächlich auf eine Th2-Immunantwort zurückzuführen ist (Corbeil 2002).

Außer der diskutierten Th1- und Th2-Immunantwort gibt es nach momentanem Wissensstand zusammen mit Th9, Th17 und Treg insgesamt fünf verschiedene Arten von T-Helferzell (Th)-Phänotypen beim Menschen (Abdoli and Najafian 2014). Beim

Rind wurden davon bisher Th1, Th2, Th17 und Treg nachgewiesen (Maeda et al. 2013). Zur Differenzierung naiver CD4⁺ Zellen zu einem Th-Phänotyp kommt es durch eine Kombination aus einem primären TCR-spezifischen MHC-Signal dendritischer Zellen und einem sekundären Signal durch Th-spezifische, Kostimulatorische Moleküle wie CD28 und CD40 (Abdoli and Najafian 2014). Sind die naiven CD4⁺ Zellen einmal aktiviert, bestimmt vor allem das vorherrschende Zytokin-Milieu die Ausbildung des Th-Phänotyps (J. Zhu et al. 2010). Die verschiedenen Phänotypen unterscheiden sich nicht nur in ihren Funktionen, sondern auch in ihren korrespondierenden Transkriptionsfaktoren und den Zytokinen, die sie produzieren (Abdoli and Najafian 2014) und anhand derer sie auch identifiziert werden können. Die Hauptfunktion von Th1 ist die Ausbildung einer zellulären Immunität gegen intrazelluläre Pathogene (Abdoli and Najafian 2014), Th2 hingegen ist für eine Ausbildung von Antikörpern und die Abwehr extrazellulärer Pathogene wie Parasiten zuständig (Turner et al. 2003, Urban et al. 1998). Th9 ist ein erst kürzlich entdeckter Th-Phänotyp, der durch seine Produktion von IL-9 bereits mit einer Induktion von Entzündungen bei allergischen und autoimmunen Vorgängen in Verbindung gebracht werden konnte, wobei der genaue Mechanismus dabei noch unklar ist (Kaplan 2013). Th17 mediiert Immunantworten gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze und wurde ebenfalls schon mit Autoimmunkrankheiten in Zusammenhang gebracht (Chen et al. 2003, Kao et al. 2005, Komiyama et al. 2006). Außerdem ist bei Th17-Zellen der Maus beschrieben, dass sie die Fähigkeit besitzen zum Th1-Phänotyp zu wechseln (Kurschus et al. 2010). Bei Tregs können natürliche Tregs (nTregs) von induzierten (iTregs) unterschieden werden (Bluestone and Abbas 2003). Dabei sind nTregs eine Subpopulation von T-Zellen, die im Thymus generiert werden, wohingegen iTregs dagegen wahrscheinlich in der Peripherie von CD4⁺ Zellen und in Gegenwart von TGFβ erzeugt werden. iTregs sind in die Alloantigen-Toleranz und in Allergien verwickelt (Reyes and Saban 2014). Sie entfalten ihre Wirkung durch die Produktion der supprimierenden Zytokine IL-10 und TGFβ und durch direkten Kontakt mit DCs über das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 (Reyes and Saban 2014). Diese Interaktion hemmt die Ausreifung dendritischer Zellen und inhibiert dadurch auch die Differenzierung naiver T-Zellen (Reyes and Saban 2014). Auch Th17 und Tregs sind bei der Maus dafür bekannt, dass sie sich unter bestimmten Bedingungen ineinander umwandeln können (Zhou et al. 2009). Berücksichtigt man, dass CD103 (Pastille et al. 2014) und Galectin 3 (Hsu et al. 2009), die bei den BNP-

Überträgern beide nach PWM-Stimulation hochreguliert waren, auch für eine Expression auf Tregs bekannt sind, so könnte dies auf eine vorrangige Ausbildung einer Treg-Immunantwort der BNP-Überträger auf die Immunstimulation durch PWM hinweisen.

Die Daten aus dem Proteomik-Experiment zur PWM-Stimulation sind, über die PregSure BVD Impfung hinausgehend, von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis der grundsätzlichen Immunkapazität der beiden Rinder-Phänotypen und sie zeigen auf, dass elementare Unterschiede in der Kuhpopulation bestehen. Um die Reaktion der Kühe auf eine vorrangige T-Zellstimulation abzu prüfen und so einen Vergleich zur kombinierten B- und T-Zellstimulation mit PWM herstellen zu können, wird zukünftig ein weiteres Proteomik-Experiment mit ConA-Stimulation der PBL von Kontroll- und BNP-Kühen folgen.

Eine grundlegende Frage, die sich bei der abweichenden Immunreaktion der BNP-Kühe stellt, ist, ob die BNP-Kühe schon vor der Impfung mit PregSure BVD eine andere Immunkapazität aufwiesen als die Kontrollkühe oder ob die Verabreichung des Impfstoffs mit seinem hochpotenten Adjuvans zu einer kompletten Umprogrammierung der Immunkapazität dieser Tiere geführt hat. Sollten die Kühe schon vorher eine andere Immunkapazität gehabt haben, so müsste diese abweichende Reaktion, die wir *in vitro* mittels polyklonaler Stimulationen nachweisen konnten, mit der gleichen Methode auch in der heute vorhandenen, nicht-Pregsure BVD-geimpften Kuhpopulation nachweisbar sein. Die Existenz eines bestimmten Prozentsatzes solcher immunologisch abweichender Tiere in der Kuhpopulation würde ein Gefahrenpotential nicht nur bei weiteren Impfungen bergen. Wir halten es darüber hinaus auch für möglich, dass diese Kühe durch eine nicht-protective Immunantwort mit dem großen Problem der Erregerpersistenz in Kuhbeständen, wie zum Beispiel von BVDV oder MAP, in Verbindung gebracht werden können und außerdem den Grund für den Misserfolg mancher Impfprogramme darstellen. Um unserer Hypothese nachzugehen, planen wir die Phänotypisierung der Tiere eines PregSure BVD-ungeimpften Kuhbestandes mittels *in vitro* Stimulationen mit mehreren polyklonalen Mitogenen. Wir erwarten dabei, dass in unseren Versuchen ein bestimmter Prozentsatz der Kühe einen ebenso hyperproliferativen Phänotyp zeigen wird wie die BNP-Überträgerkühe. Sollte sich dies bestätigen, würde man die immunologisch auffälligen Tiere weiterhin auf verschiedene Infektionskrankheiten untersuchen, um so eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen einer

abweichenden Immunreaktion und einer unzureichenden Erregerelimination herstellen zu können. Unsere Hypothese zeigt einen Lösungsansatz für das große Problem von subklinisch und persistent infizierten Tieren in Rinderbetrieben auf, die selbst zwar keine Symptome aufweisen, aber eine große Ansteckungsquelle für die übrigen Rinder ihres Bestandes darstellen und so zur Erregerpersistenz führen. Sollte für diese Tiere durch unsere Versuche ein Zusammenhang mit einer abweichenden Immunkapazität bewiesen werden können, so wäre es anhand dieser Informationen möglich, diese Tiere frühzeitig in der Kuhpopulation zu identifizieren und sie gegebenenfalls eliminieren zu können, um so weitere Schäden für den Bestand auszuschließen und Kontrollprogramme zu verbessern.

Der Trend bei Impfungen geht immer mehr zum Einsatz von Adjuvantien, die eine zelluläre Immunreaktion induzieren (Matyas et al. 2013). Bei Verabreichung an Tiere mit abweichender Immunkapazität könnten sie ein zusätzliches Gefahrenpotential bergen, weil sie in diesen Tieren entweder keine ausreichende Wirkung hervorrufen oder eine falsche Immunreaktion bewirken. Auch bei PregSure BVD wurde erstmals ein neuartiges, hochpotentes Adjuvans eingesetzt, das die Produktion wesentlich höherer neutralisierender Antikörpertiter und eine verlässlichere zelluläre Immunreaktion gegen das BVD-Virus gewährleisten sollte als die bisherigen BVD-Vakzinen (Bastian et al. 2011, Deutskens 2012). Das eingesetzte Adjuvans soll zur Ausbildung von immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) mit dem enthaltenen BVD-Antigen führen (Pham et al. 2006), die von CD8 α ⁺ DCs im Lymphknoten aufgenommen werden, deren Ausreifung induzieren und so effektiv zu einer Antigenpräsentation führen (Düewell et al. 2011). Wie Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, bildeten die BNP-Überträgerkühe daraufhin massiv pathogene IgG₁-Antikörper (Assad et al. 2012), was beim Rind für eine Th2-Antwort spricht (Corbeil 2002). Sollten die Überträgerkühe auf eine Immunstimulation generell derart reagiert haben, so wären sie nicht in der Lage gewesen eine protektive Reaktion auf die Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien auszubilden. Studien zeigen, dass ISCOMs in der Lage sind, neben Th1-Antworten auch Th2-Immunantworten auszulösen (Platt et al. 2008, Sjolander et al. 1997). Ob dies der Grund für die abweichende Immunreaktion der Überträgertiere gewesen sein könnte oder ob es durch das Zusammenspiel des hochpotenten Adjuvans und einer abweichenden Immunkapazität der BNP-Überträgertiere, die dann auch in der heutigen Kuhpopulation noch auffindbar sein muss, zur Ausbildung der pathogenen Antikörper

kam, werden wir zukünftig mittels der oben beschriebenen Vorgehensweise untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten viele neue Erkenntnisse zum Immungeschehen von PregSure BVD-geimpften Kontroll- und BNP-Rindern gewonnen werden konnten. Auf polyklonale Stimulation reagierten ausnahmslos alle BNP-Kühe mit einer hochsignifikant stärkeren Proliferation als alle geimpften Kontrolltiere. Mittels neuartiger Subfraktionierung der Zellen und anschließender differenzieller Proteomanalyse, konnte das Proteinrepertoire von Rinder-PBL für jede Zellfraktion einzeln analysiert werden und liegt nun in seiner Gesamtheit komplett vor. Da hierbei sowohl die PBL geimpfter Kontrollkühe als auch von BNP-Kühen in unstimuliertem und PWM-stimuliertem Zustand untersucht wurden, konnten Vergleiche zwischen diesen Zuständen hergestellt werden. Dabei wurde anhand von höher exprimierten Proteinen auf PWM-stimulierten Zellen von Kontroll- und Überträgerkühen eine starke Dichotomie der beiden Rinder-Phänotypen sichtbar, welche die unterschiedliche Reaktion zwischen den beiden Gruppen auf die Impfung mit PregSure BVD erklären könnte. So konnte eine bevorzugte Th1-Reaktion der Kontrolltiere und eine bevorzugte Th2-Immunantwort der Überträgertiere nach Immunstimulation mit PWM über die vermehrte Produktion der Transkriptionsfaktoren T-bet (Kontrolltiere) und GATA3 (BNP-Tiere) bewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die proteomischen Daten, dass bei den Überträgerkühen durch die PWM-Stimulation teilweise beim Rind noch unbekannte Proteine hochreguliert werden, die neben einer Th2-Antwort auch mit einer regulatorischen Immunantwort in Verbindung gebracht werden können (CD103, CD85h, Galectin 3). Bei den Kontrolltieren wurden erwartungsgemäß Proteine hochreguliert, die vor allem im Zusammenhang mit einer inflammatorischen Immunantwort stehen (TLR2). Ob diese Kuh-Phänotypen generell derart auf eine Immunstimulation reagieren, werden wir mit einem weiteren Proteomik-Experiment nach voriger Stimulation der Zellen mit dem T-Zell-Mitogen ConA überprüfen.

Wir halten es nach wie vor für möglich, dass die Immunreaktion auf ein (Allo-)Antigen der Auslöser für die Produktion der pathogenen BNP-Antikörper bei den Überträgerkühen war. Auch hier werden noch weitergehende Versuche benötigt, um das targetierte Antigen zu finden. Nach den von uns erhobenen Daten ist es zudem jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine grundsätzlich abweichende Immunkapazität

der BNP-Rinder zu einer unterschiedlichen Immunreaktion auf die PregSure BVD Impfung geführt hat und so zumindest teilweise zur BNP-Pathogenese beigetragen hat. Sollten die Kühe schon vor der Impfung mit PregSure BVD eine andere Immunkapazität aufgewiesen haben, so müsste auch in der heute vorhandenen Kuhpopulation noch ein gewisser Prozentsatz an Kühen mit einer gleichartig abweichenden Immunkapazität vorhanden sein. Wir halten es durchaus für möglich, dass diese Kühe bei Infektionen keine ausreichende Erregerelimination durchführen können und es dadurch zur Ausbildung von subklinischen und persistenten Infektionen kommt. Diese Tiere könnten somit für das große Problem persistenter Infektionen wie zum Beispiel von BVDV in Kuhbeständen verantwortlich sein. Es ist also ausnehmend wichtig, die vorhandene Kuhpopulation auf die gleiche abweichende Immunkapazität, wie die BNP-Kühe sie aufweisen, zu phänotypisieren und diese dann auf das Vorhandensein funktionell relevanter Unterschiede wie persistierende Erreger zu untersuchen. Anhand dieser Informationen wäre es somit möglich, Tiere mit solch einer abweichenden Immunreaktion aus der Kuhpopulation zu identifizieren und gegebenenfalls auch zu eliminieren. Dies wäre nicht nur für die Gesundheit des einzelnen Tieres, sondern vor allem für die Bestandsgesundheit und damit verbunden auch für Bereiche wie die Tierseuchenbekämpfung und die Lebensmittelsicherheit von grundlegender Bedeutung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine seit 2005 aufgetretene, tödliche Erkrankung von Kälbern, die mit Symptomen hämorrhagischer Diathese einhergeht. Als Ursache der Erkrankung konnte eine Mutterkuhimpfung mit dem Impfstoff PregSure BVD festgestellt werden, nach welcher 5 – 10% der Kühe pathogene Antikörper entwickelten, die sie über das Kolostrum an ihre Kälber weitergaben. Bei den Kälbern banden die Antikörper an Thrombozyten und Leukozyten im Blut sowie an Vorläuferzellen im Knochenmark und zerstörten diese. Neunzig Prozent der an BNP erkrankten Kälber starben. Da die genaue Pathogenese dieser tödlichen Erkrankung nach wie vor ungeklärt ist, war es Ziel dieser Arbeit, Immunreaktionen geimpfter Kontrollkühe und BNP-Überträger vergleichend zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt untersuchten wir das Bindungsverhalten von Kontroll- und BNP-IgG an unsere drei BNP-Alloantigenkandidaten Filamin A, Thrombospondin-1 und Purin-Nukleosid-Phosphorylase. In Western Blots mit humanen Proteinen konnte keine unterschiedliche Bindung der Antikörper nachgewiesen und die Kandidaten daher nicht verifiziert werden. Da auch gegen den von anderen Arbeitsgruppen postulierten Alloantigenkandidaten MHCI einige Daten sprechen, konnte bisher kein BNP-auslösendes Alloantigen identifiziert werden. Deshalb charakterisierten wir in weiteren Versuchen nochmals generell die Bindungskapazitäten von BNP-IgG an PBL von Kontroll- und Überträgerkühen. Es zeigte sich, dass die BNP-Antikörper gleich stark an PBL von Kontroll- und BNP-Kühen banden. Die Bindung von BNP-IgG an die Zellen von Überträgerkühen stand im Widerspruch zu der Hypothese der BNP-Pathogenese, dass die BNP-Kühe das auslösende Antigen nicht exprimieren. Daher untersuchten wir nun grundlegender die Immunreaktionen von Rindern aus der Gruppe der geimpften Kontrollkühe im Vergleich zu BNP-Überträgern. Aus Vorversuchen wussten wir unter anderem, dass BNP-Leukozyten das inhibitorische Molekül CD5 signifikant niedriger exprimieren. Daher testeten wir, wie die BNP-PBL auf polyklonale Zellstimulation reagieren. Es zeigte sich ein deutlich hyperproliferativer Phänotyp der BNP-Kühe, was Hinweise darauf gab, dass die BNP-Kühe grundsätzlich abweichend von Kontrollkühen auf eine Immunstimulation reagieren. Um diese Reaktion der BNP-Zellen auch auf Proteinebene charakterisieren zu können, wurde ein Discovery Proteomics Experiment mit unstimulierten und PWM-stimulierten Leukozyten durchgeführt. Für die differenzielle

Proteomanalyse wurden die Zellen in die drei Zellfraktionen Zelloberfläche, Zytosol und Nukleus aufgeteilt. Mittels dieser Methode konnten insgesamt 3690 Proteine aus allen drei Zellfraktionen identifiziert werden, wobei vor allem auf der Zelloberfläche nach PWM-Stimulation mit 110 aufregulierten Proteinen bei den Kontrolltieren und nur sieben bei den Überträgertieren ein deutlicher Unterschied zwischen den Kuh-Phänotypen sichtbar wurde. Die bei Kontrollkühen hochregulierten Proteine wie TLR2 sprechen dabei für eine geregelte, inflammatorische Th1-Immunantwort. Die von den stimulierten BNP-PBL hochregulierten Proteine (CD103, CD85h, Galectin 3) stehen hingegen im Zusammenhang mit einer regulatorischen und bevorzugten Th2-Immunantwort und konnten teilweise in dieser Arbeit erstmals beim Rind beschrieben werden. Die differenzielle Aktivierung der Signaltransduktionsmoleküle bei Kontrollrindern (T-bet für Th1) und BNP-Rindern (GATA3 für Th2) nach polyklonaler Leukozyten-Stimulation mit PWM konnte im Western Blot nachgewiesen werden. Diese Daten legen elementare Diskrepanzen bei der Immunreaktion von Kontroll- und Überträgerkühen nach PWM-Stimulation offen, die durchaus auch zu einer unterschiedlichen Reaktion der BNP-Kühe auf die Impfung mit PregSure BVD geführt und so zur Entstehung der pathogenen BNP-Antikörper beigetragen haben könnten. Es ist noch fraglich, ob die BNP-Kühe schon vor der Impfung diese abweichende Immunkapazität aufgewiesen haben. Ist dies der Fall, so müsste auch in der heutigen Kuhpopulation noch ein bestimmter Prozentsatz an Kühen mit diesem Immun-Phänotyp vorhanden sein, was in Zukunft weiter untersucht werden muss. Es besteht die Gefahr, dass diese Tiere nach Infektionen durch ihre abweichende Immunkapazität keine vollständige Erregerelimination bewirken können und es so zur Ausbildung persistenter Infektionen, wie zum Beispiel von BVDV, in Rinderbeständen kommt. Die weitere Untersuchung dieses abweichenden Immunphänotyps in der heutigen Kuhpopulation hat somit grundlegende Bedeutung für die Bestandsgesundheit, Tierseuchenbekämpfung und Lebensmittelsicherheit.

7 SUMMARY

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is a fatal disease affecting calves, which has occurred since 2005 and is accompanied by symptoms of haemorrhagic diathesis. A vaccination of mother cows with the vaccine PregSure BVD could be determined as etiology of BNP. After vaccination 5 – 10% of cows produced pathogenic antibodies and transferred them into their calves via colostrum. These antibodies bound to thrombocytes and leukocytes in peripheral blood of respective calves as well as to progenitor cells in bone marrow and led to their destruction. Ninety percent of affected calves died. Since pathogenesis of this fatal disease is still unclear, the goal of this study was to characterize and to compare immune reactions of vaccinated control-cows and of BNP-donors.

In a first step, we examined the binding pattern of control- and BNP-IgG to our three BNP-alloantigen candidates Filamin A, Thrombospondin-1 and Purine nucleoside phosphorylase. In western blots loaded with human proteins, no differential binding of antibodies could be detected and therefore alloantigen candidates could not be verified. Because there are also data casting doubts on MHCI alloantigen, a candidate postulated from other research groups, still no BNP-initiating alloantigen has been identified so far. Therefore, we once again characterized binding capacity of BNP-IgG, this time testing the binding to leukocytes of control- and BNP-cows. The results showed, that BNP-IgG bound equally to leukocytes of both cow phenotypes. This binding of BNP-IgG to cells of BNP-cows was contrary to the hypothesis of BNP pathogenesis, where BNP-cows do not express the BNP-target antigen themselves. Therefore, we then decided to investigate general immune responses of vaccinated control-cows, which did not develop BNP-antibodies in comparison to BNP-donor cow reactions. We knew from previous studies, that BNP-leukocytes express significantly less inhibitory CD5 molecules than leukocytes of controls. Accordingly, we investigated responses of BNP-leukocytes to polyclonal cellular stimulation. A marked hyperproliferative phenotype of the BNP-cows became evident in these studies, which pointed to a deviating reaction of the BNP-cows to immune stimulation compared to control-cows as a matter of principle. To characterize this difference in reaction on the level of proteins, a discovery proteomics experiment with unstimulated and PWM-stimulated leukocytes was carried out. Cells were split in three cellular fractions, namely plasma cell membrane, cytosol and nucleus. Using

this method, we were able to detect a total of 3690 proteins from all cell fractions. Thereby, a major difference between the two cow groups became visible in the fraction of plasma cell membrane proteins, where control-cows responded to PWM-stimulation with upregulation of 110 proteins, whereas BNP-cows upregulated only seven proteins. The upregulated proteins in leukocytes of control-cows, e.g. TLR2, indicate a regulated inflammatory Th1-immune response. In contrast, proteins upregulated in leukocytes of BNP donors after PWM-stimulation (CD103, CD85h, Galectin 3) point to regulation and to a preferential Th2-immune response. Some of these proteins are first described for cattle through this study. Differential activation of signal transduction molecules in control-cows (T-bet for Th1) and BNP-donors (GATA3 for Th2) after polyclonal stimulation with PWM could be proved with western blots.

These data demonstrate serious discrepancies in immune responses of control-cows and BNP-donors after PWM stimulation. It is absolutely possible, that these differences could have led to divergent reactions of these cows to vaccination with PregSure BVD and thus contributed to the occurrence of the pathogenic BNP-initiating antibodies. Up to now, it is still questionable whether the different immune capacity of BNP-cows was already present before respective vaccination. If this is the case, this special immunophenotype will also be present in the current cow population. This should be examined in future studies. There is the threat, that these cows cannot entirely eliminate pathogens after infections due to their immune response phenotype. This may result in persistent infections, for example of BVDV in cattle populations. Further investigation of this deviating immunophenotype in the current cow population therefore has crucial importance for cattle health management, eradication of epizootic diseases and for food safety.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdoli, R. and Najafian, N. (2014) T Helper Cells Fate Mapping by Co-stimulatory Molecules and its Functions in Allograft Rejection and Tolerance. *Int J Organ Transplant Med*, 5(3), pp. 97-110.
- Agrawal, S. and Kishore, M. C. (2000) MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother Stem Cell Res*, 9(6), pp. 795-812.
- Assad, A., Amann, B., Friedrich, A. and Deeg, C. A. (2012) Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. *Vet Immunol Immunopathol*, 147(1-2), pp. 25-34.
- Babiuk, S., Horseman, B., Zhang, C., Bickis, M., Kusalik, A., Schook, L. B., Abrahamsen, M. S. and Pontarollo, R. (2007) BoLA class I allele diversity and polymorphism in a herd of cattle. *Immunogenetics*, 59(2), pp. 167-76.
- Bai, H., Sakurai, T., Someya, Y., Konno, T., Ideta, A., Aoyagi, Y. and Imakawa, K. (2011) Regulation of trophoblast-specific factors by GATA2 and GATA3 in bovine trophoblast CT-1 cells. *J Reprod Dev*, 57(4), pp. 518-25.
- Ballingall, K. T., Nath, M., Holliman, A., Laming, E., Steele, P. and Willoughby, K. (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(1-2), pp. 128-32.
- Bastian, M., Holsteg, M., Hanke-Robinson, H., Duchow, K. and Cussler, K. (2011) Bovine Neonatal Pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine*, 29(32), pp. 5267-75.
- Bekeredjian-Ding, I., Foermer, S., Kirschning, C. J., Parcina, M. and Heeg, K. (2012) Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. *PLoS One*, 7(1), pp. e29806.
- Bell, C. R., Rocchi, M. S., Dagleish, M. P., Melzi, E., Ballingall, K. T., Connelly, M., Kerr, M. G., Scholes, S. F. and Willoughby, K. (2013) Reproduction of bovine neonatal pancytopenia (BNP) by feeding pooled colostrum reveals variable alloantibody damage to different haematopoietic lineages. *Vet Immunol Immunopathol*, 151(3-4), pp. 303-14.
- Bell, C. R., Scott, P. R., Kerr, M. G. and Willoughby, K. (2010a) Possible preventive strategy for bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec*, 167(19), pp. 758.
- Bell, C. R., Scott, P. R., Sargison, N. D., Wilson, D. J., Morrison, L., Howie, F., Willoughby, K. and Penny, C. D. (2010b) Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec*, 167(24), pp. 938-40.

- Bleharski, J. R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T. G., Ochoa, M. T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E. N., Wagner, M., Rollingshoff, M., Rea, T. H., Colonna, M., Stenger, S., Bloom, B. R., Eisenberg, D. and Modlin, R. L. (2003) Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science*, 301(5639), pp. 1527-30.
- Bluestone, J. A. and Abbas, A. K. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3(3), pp. 253-7.
- Borges, L., Hsu, M. L., Fanger, N., Kubin, M. and Cosman, D. (1997) A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol*, 159(11), pp. 5192-6.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Bridger, P. S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H. J., Reinacher, M. and Doll, K. (2011) Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol*, 141(1-2), pp. 1-10.
- Chang, C. and Gershwin, M. E. (2010) Drugs and autoimmunity--a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun*, 34(3), pp. J266-75.
- Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y. H., Ho, Y. S., DeSouza, M. M. and Wu, R. (2003) Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, 278(19), pp. 17036-43.
- Chipinda, I., Hettick, J. M. and Siegel, P. D. (2011) Haptentation: chemical reactivity and protein binding. *J Allergy (Cairo)*, 2011, pp. 839682.
- Chung, A. W., Sieling, P. A., Schenk, M., Teles, R. M., Krutzik, S. R., Hsu, D. K., Liu, F. T., Sarno, E. N., Rea, T. H., Stenger, S., Modlin, R. L. and Lee, D. J. (2013) Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis*, 207(6), pp. 947-56.
- Corbeil, L. B. (2002) Antibodies as effectors. *Vet Immunol Immunopathol*, 87(3-4), pp. 169-75.
- Dalal, I., Grunebaum, E., Cohen, A. and Roifman, C. M. (2001) Two novel mutations in a purine nucleoside phosphorylase (PNP)-deficient patient. *Clin Genet*, 59(6), pp. 430-7.
- Demasius, W., Weikard, R., Kromik, A., Wolf, C., Muller, K. and Kuhn, C. (2014) Bovine neonatal pancytopenia (BNP): novel insights into the incidence, vaccination-associated epidemiological factors and a potential genetic predisposition for clinical and subclinical cases. *Res Vet Sci*, 96(3), pp. 537-42.
- Desch, A. N., Gibbings, S. L., Clambey, E. T., Janssen, W. J., Slansky, J. E., Kedl, R. M., Henson, P. M. and Jakubzick, C. (2014) Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nat Commun*, 5, pp. 4674.

- Deutskens, F. (2012) Untersuchungen zur Ätiologie der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). *Dissertation, JLU Gießen*.
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C. M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H. J. and Rumenapf, T. (2011) Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res*, 42, pp. 97.
- Duewell, P., Kisser, U., Heckelsmiller, K., Hoves, S., Stoitzner, P., Koernig, S., Morelli, A. B., Clausen, B. E., Dauer, M., Eigler, A., Anz, D., Bourquin, C., Maraskovsky, E., Endres, S. and Schnurr, M. (2011) ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *J Immunol*, 187(1), pp. 55-63.
- Erskine, R. J., Corl, C. M., Gandy, J. C. and Sordillo, L. M. (2011) Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. *Am J Vet Res*, 72(8), pp. 1059-64.
- Euler, K. N. (2013) Identifizierung und Charakterisierung von Alloantigenen bei der Bovinen Neonatalen Panzytopenie. *Dissertation, LMU München*.
- Euler, K. N., Hauck, S. M., Ueffing, M. and Deeg, C. A. (2013) Bovine neonatal pancytopenia--comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK). *BMC Vet Res*, 9, pp. 18.
- Falet, H., Pollitt, A. Y., Begonja, A. J., Weber, S. E., Duerschmied, D., Wagner, D. D., Watson, S. P. and Hartwig, J. H. (2010) A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med*, 207(9), pp. 1967-79.
- Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K. W., Zigmond, E., Furtado, G. C., Lira, S. A. and Shakhar, G. (2013) Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, 38(3), pp. 581-95.
- Fenutria, R., Martinez, V. G., Simoes, I., Postigo, J., Gil, V., Martinez-Florensa, M., Sintes, J., Naves, R., Cashman, K. S., Alberola-Ila, J., Ramos-Casals, M., Soldevila, G., Raman, C., Merino, J., Merino, R., Engel, P. and Lozano, F. (2014) Transgenic expression of soluble human CD5 enhances experimentally-induced autoimmune and anti-tumoral immune responses. *PLoS One*, 9(1), pp. e84895.
- Forslow, A., Liu, Z. and Sundqvist, K. G. (2007) Receptor communication within the lymphocyte plasma membrane: a role for the thrombospondin family of matricellular proteins. *Cell Mol Life Sci*, 64(1), pp. 66-76.
- Foucras, G., Corbiere, F., Tasca, C., Pichereaux, C., Caubet, C., Trumel, C., Lacroux, C., Franchi, C., Burlet-Schiltz, O. and Schelcher, F. (2011) Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol*, 187(12), pp. 6564-70.

- Friedrich, A., Rademacher, G., Weber, B. K., Kappe, E., Carlin, A., Assad, A., Sauter-Louis, C., Hafner-Marx, A., Buttner, M., Bottcher, J. and Klee, W. (2009) Increase in the incidence of a bleeding disorder in voting calves due to bone marrow damage. *Tieraerztliche Umschau*, 64(10), pp. 423-431.
- Frigeri, L. G. and Liu, F. T. (1992) Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J Immunol*, 148(3), pp. 861-7.
- Froehlich, R., Hambruch, N., Haeger, J. D., Dilly, M., Kaltner, H., Gabius, H. J. and Pfarrer, C. (2012) Galectin fingerprinting detects differences in expression profiles between bovine endometrium and placentomes as well as early and late gestational stages. *Placenta*, 33(3), pp. 195-201.
- Garratty, G. (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp. 73-9.
- Ghamlouch, H., Ouled-Haddou, H., Guyart, A., Regnier, A., Trudel, S., Claisse, J. F., Fuentes, V., Royer, B., Marolleau, J. P. and Gubler, B. (2014) TLR9 Ligand (CpG Oligodeoxynucleotide) Induces CLL B-Cells to Differentiate into CD20(+) Antibody-Secreting Cells. *Front Immunol*, 5, pp. 292.
- Greinacher, A., Wesche, J., Hammer, E., Furll, B., Volker, U., Reil, A. and Bux, J. (2010) Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med*, 16(1), pp. 45-8.
- Hashiba, K., Sano, M., Nio-Kobayashi, J., Hojo, T., Skarzynski, D. J. and Okuda, K. (2014) Galectin-3 contributes to luteolysis by binding to Beta 1 integrin in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 91(1), pp. 2.
- Hennessy, E. J., Parker, A. E. and O'Neill, L. A. (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*, 9(4), pp. 293-307.
- Hsu, D. K., Chen, H. Y. and Liu, F. T. (2009) Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev*, 230(1), pp. 114-27.
- Huang, B. X. and Kim, H. Y. (2013) Effective identification of Akt interacting proteins by two-step chemical crosslinking, co-immunoprecipitation and mass spectrometry. *PLoS One*, 8(4), pp. e61430.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G. K., Niesner, U., de la Rosa, M., Schmidt, C. A., Brauer, R., Buer, J., Scheffold, A. and Hamann, A. (2004) Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 199(3), pp. 303-13.
- Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N., Akira, S. and Saito, T. (2007) Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol*, 178(11), pp. 6715-9.
- Jaskowski, J. M., Polak, M. P., Marszalek, A., Nowak, K., Frackowiak, H. and Olechnowicz, J. (2012) Bovine neonatal pancytopenia in calves in Poland. *Pol J Vet Sci*, 15(3), pp. 565-6.

- Jones, B. A., Sauter-Louis, C., Henning, J., Stoll, A., Nielen, M., Van Schaik, G., Smolenaars, A., Schouten, M., den Uijl, I., Fourichon, C., Guatteo, R., Madouasse, A., Nusinovici, S., Deprez, P., De Vlieghe, S., Laureyns, J., Booth, R., Cardwell, J. M. and Pfeiffer, D. U. (2013) Calf-level factors associated with bovine neonatal pancytopenia--a multi-country case-control study. *PLoS One*, 8(12), pp. e80619.
- Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., von Bernstorff, W. and Eberlein, T. J. (2001) Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 69(4), pp. 555-64.
- Kaltner, H., Seyrek, K., Heck, A., Sinowatz, F. and Gabius, H. J. (2002) Galectin-1 and galectin-3 in fetal development of bovine respiratory and digestive tracts. Comparison of cell type-specific expression profiles and subcellular localization. *Cell Tissue Res*, 307(1), pp. 35-46.
- Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gokmen, M. R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G. M. and Jenner, R. G. (2012) T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun*, 3, pp. 1268.
- Kao, C. Y., Huang, F., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Kim, C., Tam, L. and Wu, R. (2005) Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol*, 175(10), pp. 6676-85.
- Kaplan, M. H. (2013) Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*, 252(1), pp. 104-15.
- Kappe, E. C., Halami, M. Y., Schade, B., Alex, M., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B. A., Johne, R., Buitkamp, J., Botcher, J. and Muller, H. (2010) Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 123(1-2), pp. 31-41.
- Kasonta, R., Sauter-Louis, C., Holsteg, M., Duchow, K., Cussler, K. and Bastian, M. (2012) Effect of the vaccination scheme on PregSure(R) BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia. *Vaccine*, 30(47), pp. 6649-55.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. and Iwakura, Y. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 177(1), pp. 566-73.
- Krappmann, K., Weikard, R., Gerst, S., Wolf, C. and Kuhn, C. (2011) A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J*, 190(2), pp. 225-9.
- Kurschus, F. C., Croxford, A. L., Heinen, A. P., Wortge, S., Ielo, D. and Waisman, A. (2010) Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol*, 40(12), pp. 3336-46.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.

- Lambton, S. L., Colloff, A. D., Smith, R. P., Caldow, G. L., Scholes, S. F., Willoughby, K., Howie, F., Ellis-Iversen, J., David, G., Cook, A. J. and Holliman, A. (2012) Factors associated with bovine neonatal pancytopenia (BNP) in calves: a case-control study. *PLoS One*, 7(5), pp. e34183.
- Laming, E., Melzi, E., Scholes, S. F., Connelly, M., Bell, C. R., Ballingall, K. T., Dagleish, M. P., Rocchi, M. S. and Willoughby, K. (2012) Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived hematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through in vitro culture of bone marrow biopsies. *BMC Res Notes*, 5, pp. 599.
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H. and Lord, G. M. (2013) T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(11), pp. 777-89.
- Lee, D. J., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Guo, B., Hernandez, M., Rea, T. H., Cheng, G., Colonna, M. and Modlin, R. L. (2007) LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol*, 179(12), pp. 8128-36.
- Lee, J., Moon, C., Kim, J., Jung, C., Lee, K. H., Joo, H. G., Ahn, M. and Shin, T. (2009) Immunohistochemical localization of galectin-3 in the granulomatous lesions of paratuberculosis-infected bovine intestine. *J Vet Sci*, 10(3), pp. 177-80.
- Legrand, C., Thibert, V., Dubernard, V., Begault, B. and Lawler, J. (1992) Molecular requirements for the interaction of thrombospondin with thrombin-activated human platelets: modulation of platelet aggregation. *Blood*, 79(8), pp. 1995-2003.
- Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. I., Kuwabara, I., Chi, E. Y. and Henderson, W. R., Jr. (1995) Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 147(4), pp. 1016-28.
- Liu, S., Jia, H., Hou, S., Zhang, G., Xin, T., Li, H., Yuan, W., Guo, X., Gao, X., Li, M., Wu, J. and Zhu, H. (2014) Recombinant TB10.4 of *Mycobacterium bovis* induces cytokine production in RAW264.7 macrophages through activation of the MAPK and NF-kappaB pathways via TLR2. *Mol Immunol*, 62(1), pp. 227-234.
- Lu, H. K., Mitchell, A., Endoh, Y., Hampartzoumian, T., Huynh, O., Borges, L., Geczy, C., Bryant, K. and Tedla, N. (2012) LILRA2 selectively modulates LPS-mediated cytokine production and inhibits phagocytosis by monocytes. *PLoS One*, 7(3), pp. e33478.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), pp. 145-51.
- Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M. and Oikawa, M. (2013) Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet Res Commun*, 37(1), pp. 43-9.

- Marshall-Clarke, S., Downes, J. E., Haga, I. R., Bowie, A. G., Borrow, P., Pennock, J. L., Grecis, R. K. and Rothwell, P. (2007) Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 282(34), pp. 24759-66.
- Matyas, G. R., Mayorov, A. V., Rice, K. C., Jacobson, A. E., Cheng, K., Iyer, M. R., Li, F., Beck, Z., Janda, K. D. and Alving, C. R. (2013) Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine*, 31(26), pp. 2804-10.
- Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2), pp. 135-45.
- Miernyk, J. A. and Thelen, J. J. (2008) Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J*, 53(4), pp. 597-609.
- Newman, M. J. and Hines, H. C. (1980) Stimulation of maternal anti-lymphocyte antibodies by first gestation bovine fetuses. *J Reprod Fertil*, 60(1), pp. 237-41.
- Obaid, J. M., Abo El-Nazar, S. Y., Ghanem, A. M., El-Hadidi, A. S. and Mersal, B. H. (2014) Expression of CD55 on Red Blood Cells of beta-Thalassemia Patients. *Hemoglobin*, pp. 1-6.
- Ordenez-Rueda, D., Lozano, F., Sarukhan, A., Raman, C., Garcia-Zepeda, E. A. and Soldevila, G. (2009) Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol*, 39(8), pp. 2233-47.
- Papaneophytou, C. P. and Kontopidis, G. (2014) Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. *Protein Expr Purif*, 94, pp. 22-32.
- Pardon, B., Steukers, L., Dierick, J., Ducatelle, R., Saey, V., Maes, S., Vercauteren, G., De Clercq, K., Callens, J., De Bleecker, K. and Deprez, P. (2010) Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis*, 57(3), pp. 135-46.
- Pastille, E., Bardini, K., Fleissner, D., Adamczyk, A., Frede, A., Wadwa, M., von Smolinski, D., Kasper, S., Sparwasser, T., Gruber, A. D., Schuler, M., Sackaguchi, S., Roers, A., Muller, W., Hansen, W., Buer, J. and Westendorf, A. M. (2014) Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res*.
- Penny, C. D., Bell, C., Morrison, L., Howie, F. and Willoughby, K. (2009) Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *Vet Rec*, 164(24), pp. 762.
- Perrin, P. J., Davis, T. A., Smoot, D. S., Abe, R., June, C. H. and Lee, K. P. (1997) Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *Immunology*, 90(4), pp. 534-42.
- Pham, H. L., Ross, B. P., McGeary, R. P., Shaw, P. N., Hewavitharana, A. K. and Davies, N. M. (2006) Saponins from Quillaja saponaria Molina: isolation, characterization and

- ability to form immuno stimulatory complexes (ISCOMs). *Curr Drug Deliv*, 3(4), pp. 389-97.
- Platt, R., Coutu, C., Meinert, T. and Roth, J. A. (2008) Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhoea virus vaccine in beef cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 122(1-2), pp. 8-15.
- Polese, L., De Franchis, G., Scarpa, M., Sturniolo, G. C., Ruffolo, C., Norberto, L., Frego, M., D'Amico, D. F. and Angriman, I. (2007) B1a lymphocytes in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis*, 22(9), pp. 1005-11.
- Reil, A., Keller-Stanislawski, B., Gunay, S. and Bux, J. (2008) Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang*, 95(4), pp. 313-7.
- Reyes, N. J. and Saban, D. R. (2014) T helper subsets in allergic eye disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 14(5), pp. 477-84.
- Saegusa, J., Hsu, D. K., Chen, H. Y., Yu, L., Fermin, A., Fung, M. A. and Liu, F. T. (2009) Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol*, 174(3), pp. 922-31.
- Salinovich, O. and Montelaro, R. C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 156(2), pp. 341-7.
- Sanchez-Miguel, C., McElroy, M. and Walsh, E. (2010) Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland. *Vet Rec*, 166(21), pp. 664.
- Sano, H., Hsu, D. K., Apgar, J. R., Yu, L., Sharma, B. B., Kuwabara, I., Izui, S. and Liu, F. T. (2003) Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest*, 112(3), pp. 389-97.
- Sauter-Louis, C., Carlin, A., Friedrich, A., Assad, A., Reichmann, F., Rademacher, G., Heuer, C. and Klee, W. (2012) Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany. *Prev Vet Med*, 105(1-2), pp. 49-58.
- Schroter, P., Kuiper, H., Holsteg, M., Puff, C., Haas, L., Baumgartner, W., Ganter, M. and Distl, O. (2011) [Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 124(9-10), pp. 390-400.
- Schumann, D. (2011) Bovine neonatale Pancytopenie: Laborexperimentelle Untersuchungen im Rahmen der Ursachenforschung. *Dissertation, LMU München*.
- Seggewiss, R., Lore, K., Greiner, E., Magnusson, M. K., Price, D. A., Douek, D. C., Dunbar, C. E. and Wiestner, A. (2005) Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*, 105(6), pp. 2473-9.

- Sjolander, A., van't Land, B. and Lovgren Bengtsson, K. (1997) Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol*, 177(1), pp. 69-76.
- Sousa, M. M., Steen, K. W., Hagen, L. and Slupphaug, G. (2011) Antibody cross-linking and target elution protocols used for immunoprecipitation significantly modulate signal-to noise ratio in downstream 2D-PAGE analysis. *Proteome Sci*, 9, pp. 45.
- Stabel, J. R. and Khalifeh, M. S. (2008) Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 126(3-4), pp. 211-9.
- Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C. and Klinman, D. M. (2011) TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*, 29(17), pp. 3341-55.
- Sutavani, R. V., Bradley, R. G., Ramage, J. M., Jackson, A. M., Durrant, L. G. and Spendlove, I. (2013) CD55 costimulation induces differentiation of a discrete T regulatory type 1 cell population with a stable phenotype. *J Immunol*, 191(12), pp. 5895-903.
- Tabbekh, M., Mokrani-Hammani, M., Bismuth, G. and Mami-Chouaib, F. (2013) T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses. *Oncoimmunology*, 2(1), pp. e22841.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, pp. 335-76.
- Torres-Aguilar, H., Blank, M., Jara, L. J. and Shoenfeld, Y. (2010) Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 10(1), pp. 8-17.
- Truong, M. J., Gruart, V., Kusnierz, J. P., Papin, J. P., Loiseau, S., Capron, A. and Capron, M. (1993a) Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J Exp Med*, 177(1), pp. 243-8.
- Truong, M. J., Gruart, V., Liu, F. T., Prin, L., Capron, A. and Capron, M. (1993b) IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 23(12), pp. 3230-5.
- Turner, J. D., Faulkner, H., Kamgno, J., Cormont, F., Van Snick, J., Else, K. J., Grecis, R. K., Behnke, J. M., Boussinesq, M. and Bradley, J. E. (2003) Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. *J Infect Dis*, 188(11), pp. 1768-75.
- Urban, J. F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Collins, M. and Finkelman, F. D. (1998) IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*, 8(2), pp. 255-64.

- Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A. and Luscombe, N. M. (2009) A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*, 10(4), pp. 252-63.
- Willoughby, K., Gilray, J., Maley, M., Dastjerdi, A., Steinbach, F., Banks, M., Scholes, S., Howie, F., Holliman, A., Baird, P. and McKillen, J. (2010) Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec*, 166(14), pp. 436-7.
- Wilson, S. M. and Wilkie, B. N. (2007) B-1 and B-2 B-cells in the pig cannot be differentiated by expression of CD5. *Vet Immunol Immunopathol*, 115(1-2), pp. 10-6.
- Wisniewski, J. R., Zielinska, D. F. and Mann, M. (2011) Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Anal Biochem*, 410(2), pp. 307-9.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. and Tedder, T. F. (2008) A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), pp. 639-50.
- Yoshimoto, K., Kurasawa, T., Suzuki, K. and Takeuchi, T. (2014) [Involvement of alphaEbeta7 (CD103) in the pathogenesis of autoimmune diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 37(3), pp. 171-5.
- Youinou, P., Jamin, C. and Lydyard, P. M. (1999) CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today*, 20(7), pp. 312-6.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L. T. and Bluestone, J. A. (2009) Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol*, 21(3), pp. 281-5.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, pp. 445-89.
- Zhu, P., Jiang, W., Cao, L., Yu, W., Pei, Y., Yang, X., Wan, B., Liu, J. O., Yi, Q. and Yu, L. (2010) IL-2 mRNA stabilization upon PMA stimulation is dependent on NF90-Ser647 phosphorylation by protein kinase CbetaI. *J Immunol*, 185(9), pp. 5140-9.
- Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H. Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kawakami, T., Lilly, C. M. and Liu, F. T. (2004) Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*, 165(6), pp. 2045-53.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Cornelia Deeg bedanken. Sie hat es mir ermöglicht, in der Erforschung der Pathogenese einer ausnehmend interessanten und brisanten Erkrankung zu promovieren. Dabei stand sie fast rund um die Uhr, 365 Tage im Jahr für jegliche Fragen zur Verfügung. Ich weiß dieses außerordentliche Engagement sehr zu schätzen und möchte mich ganz herzlich dafür bedanken!

Des Weiteren möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger und Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel meinen Dank für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und den Arbeitsplatz aussprechen, der mir im Rahmen der Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Tierphysiologie zur Verfügung gestellt wurde.

Dr. Stefanie Hauck aus dem Helmholtz Zentrum München gab mir die Möglichkeit dort einige Versuche, auf denen diese Dissertation basiert, durchzuführen. Dabei konnte ich einige neue Techniken der Proteomanalytik erlernen. Bei proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen hatte sie immer ein offenes Ohr und konnte Licht in mein Dunkel der Datenbankanalysen bringen. Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing danken, der mir die Arbeit in der Abteilung Proteomanalytik des Helmholtz Zentrum München überhaupt ermöglicht hat.

Mein Dank für die finanzielle Förderung dieses Projektes und meiner Doktorarbeit gilt der H. Wilhelm Schaumann Stiftung. Sie gewährte mir ein Doktorandenstipendium ohne welches ich diese Dissertation nicht hätte anfertigen können. Ich bin froh der Stiftung in dieser Arbeit grundlegende Erkenntnisse zum Immunsystem von Rindern präsentieren zu können.

Auch bei der Tierseuchenkasse Bayern möchte ich mich für die Bezuschussung unseres Projektes ganz herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Bärbli Amann und Sieglinde Hirmer. Mit ihrem Wissen und ihrer langjährigen Erfahrung konnten sie mir über alle labortechnischen Hürden hinweghelfen über die man als Labor-unerfahrener Tiermediziner so stolpert. Aber nicht nur durch ihre fachliche Unterstützung, sondern auch durch ihre herzliche Art und die aufheiternden und lustigen Gespräche haben sie mir die Zeit meiner Doktorarbeit hier am Institut sehr angenehm gemacht.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Armin Scholz, Herrn Dr. Stefan Nüske sowie den weiteren Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim. Ich durfte dort jederzeit Blutproben der Kontrollkühe entnehmen und auch eine unserer BNP-Kühe, „Baileys“, „007“ oder auch liebevoll „Miss Money Penny“ genannt, hat dort ein neues Zuhause gefunden. Dies ist tatsächlich ungemein wichtig für uns, da mit dem steigenden Alter der Kühe kaum noch BNP-Überträgerkühe existieren, es jedoch noch sehr viel zu erforschen gibt, wofür Proben einer lebenden Kuh unentbehrlich sind.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch der Familie Murr, von deren Kuhbestand wir einen Großteil unserer BNP-Proben beziehen durften. Obwohl sie mit ihrem landwirtschaftlichen Betrieb immer genug zu tun hatten, durften wir nicht nur so oft wir wollten zu Blutentnahmen kommen, sondern sie haben sich bei jeder Probenentnahme auch selbst die Zeit genommen uns zu helfen. Zusätzlich haben sie uns Erstkolostrum von vielen ihrer Tiere für Versuche zur Verfügung gestellt. Ganz herzlichen Dank!

Ein ganz liebes Dankeschön auch an die Mitarbeiter der Abteilung Proteinanalytik und der Core Facility Proteomics des Helmholtz Zentrum München: Dr. Juliane Merl-Pham, Jennifer Behler, Nicole Senninger und Fabian Gruhn. Bei Methoden, die mir zunächst noch fremd waren, verloren sie nie die Geduld sie mir zu erklären und hatten stets hilfreiche Antworten auf meine zahlreichen Fragen.

Ein riesiger Dank geht an meine Arbeitskollegen Dr. Roxane Degroote, Dr. Margarete Swadzba und Dr. Christoph Szober, an meine Vorgängerin Dr. Kerstin Euler und meine Nachfolgerin Karina Lutterberg sowie an unsere Laborfee Ute Klein. Ihr seid super Kollegen und ich habe mich in dieser Arbeitsgruppe immer sehr wohl gefühlt. Ich konnte jederzeit auf Eure geistige und praktische Hilfe und Eure Unterstützung zählen. Großprojekte meisterten wir immer gemeinsam und mit einem Problem war man nie allein. Vielen, vielen Dank Euch allen, Ihr seid super!

Besonders bedanken möchte ich mich hier bei meinen beiden Kolleginnen Patrizia Uhl und Nina Burkhardt, die mich in den letzten Monaten meiner Doktorarbeit begleitet haben. Ihr zwei seid wirklich die besten Kollegen und Freundinnen, die man sich nur wünschen kann, und ich werde euch sehr vermissen, wenn unsere beruflichen Wege sich irgendwann einmal trennen. Ich danke Euch für all die lustigen Gespräche und Situationen, Eure aufmunternden Worte, die immer zur richtigen Zeit kamen, die fachlichen Diskussionen, die mich häufig ein gutes Stück weiter gebracht haben und den obligatorischen „Kaffee(?)“ mit oder ohne Kuchen. Ihr wart mein Fels in der Brandung in den letzten drei Monaten!

Abschließend möchte ich meiner Familie danken. Meine Eltern haben es mir überhaupt erst ermöglicht Tiermedizin in München zu studieren und mir alle Möglichkeiten im Leben offen gehalten. Danke, dass Ihr mich bei allem so unterstützt habt und mir immer die Wahl gelassen habt das zu tun was mir Spaß macht und mich interessiert. Mein Verlobter Robin hat ein riesengroßes Dankeschön verdient, nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern vor allem für die vielen lebenserhaltenden Maßnahmen in den letzten drei Monaten, wie einkaufen gehen und die ausgiebigen Rückenmassagen nach 16-Stunden-Tagen vor dem Computer. Er hat meine Launigkeit und die verlängerten Arbeitszeiten in der letzten Zeit gelassen ertragen und mir im Gegenzug einen Heiratsantrag gemacht. Ich danke Dir für deine Unterstützung und den Rückhalt den Du mir gibst, ich weiß ich kann immer auf Dich zählen.