

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Cornelia A. Deeg

Identifizierung und Charakterisierung von Alloantigenen bei der Bovinen Neonatalen Panzytopenie

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

von
Nina Kerstin Euler
aus
Schlächtern

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Familie.

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
A	Ampere
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ACK-Puffer	Ammonium-Chlorid-Lyse-Puffer
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BS3	Bissulfosuccinimidyl Suberat
BSA	Bovines Serum Albumin
BNP	Bovine Neonatale Panzytopenie
BVD(V)	Bovine Virus Diarrhoe (Virus)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	Erkennungsmolekül an der Oberfläche von Zellen (<i>engl.</i> Cluster of differentiation)
cDNA	Komplementäre Deoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> complementary deoxyribonucleic acid)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>engl.</i> Collision induced dissociation)
cm	Zentimeter (10 ⁻²)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton

Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dGTP	Desoxyguanosin Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced-Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Engl.	Englisch
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>engl.</i> Fetal calf serum)
FDR	Falschpositivrate (<i>engl.</i> False discovery rate)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo-Puffer	Fluoreszenz-Puffer
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNA	Humanes Neutrophilen-Alloantigen
HPLC	High-performance liquid chromatography
HSPB1	Hitzeschockprotein Beta 1 (früher: Hitzeschock 27 kDa Protein)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
i.v.	intra venös
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	Flüssigchromatografie (<i>engl.</i> Liquid chromatography)

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar
m/z-Verhältnis	Masse-Ladungsverhältnis
mA	Milliampère
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>engl.</i> Matrix-assisted laser-desorption/ionisation)
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MFI	Bindungsintensität (<i>engl.</i> Mean fluorescence intensity)
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mgf	Mascot generic file
MHC	Histokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> Major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter (10 ⁻³)
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹)
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutleukozyten

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween Lösung
PCV	Porcines Circovirus
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (Antibiotikum)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Massenspektren der jeweiligen Peptide (<i>engl.</i> Peptide mass fingerprinting)
PMT	Photodetektor (<i>engl.</i> Photomultiplier Tube)
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP(-T)	Polyvinylpyrrolidone(-Tween Lösung)
Q1 - 4	Quadrant 1 - 4
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> Relative centrifugal force)
RhD	Rhesus-D-Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (<i>engl.</i> Severe combined immunodeficiency)
SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> Standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TEMED	NNNN'-Tetra-methylethylendiamin
TOF	Flugzeitanalysator (<i>engl.</i> time of flight)
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (<i>engl.</i> Transfusion-related acute lung injury)
V	Volt
v/v	Volumenprozentige Lösung (<i>engl.</i> Volume to Volume)
W	Watt
w/v	Gewichtsprozentige Lösung (<i>engl.</i> Weight per volume)
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WGA	Wheat Germ Agglutinin

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	2
2.1 Auftreten der BNP	2
2.1.1 Geographische Verteilung der BNP	2
2.1.2 Namensgebung der BNP	3
2.1.3 Untersuchungen zu prädisponierenden Faktoren	4
2.2 Klinische, pathologische und histopathologische Anzeichen der BNP	5
2.2.1 Klinisches Erscheinungsbild der BNP	5
2.2.2 Subklinische Verläufe	6
2.2.3 Hämatologische Veränderungen	6
2.2.4 Pathologische Befunde bei der BNP	7
2.2.5 Histopathologische Besonderheiten.....	8
2.3 Ätiologie der BNP	9
2.4 Pathogenese der BNP	12
2.4.1 Untersuchungen zur Pathogenese	12
2.4.2 Experimentell induzierte BNP.....	12
2.5 Proteomische Methoden zur Identifizierung unbekannter Auto- und Alloantigene	18
2.5.1 1D PAGE und Western Blot.....	19
2.5.2 2D PAGE und Western Blot.....	20
2.5.3 Phagen-Display	21
2.5.4 Immunpräzipitation.....	22
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Puffer und Lösungen	24
3.1.1 Puffer und Lösungen zur Probenaufbereitung.....	24
3.1.2 Lösungen für MDBK-Zellen.....	26
3.1.3 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung	26
3.1.4 Puffer und Lösungen für die Membranproteinpräparation	26

3.1.5 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	28
3.1.6 Färbelösungen	32
3.1.7 Puffer und Lösungen für den Western Blot	34
3.1.8 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation	36
3.1.9 Puffer und Lösungen zur Anreicherung von Oberflächenproteinen	37
3.1.10 Puffer und Lösungen für In-Solution-Verdau	41
3.1.11 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse	42
3.1.12 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	42
3.1.13 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	43
3.2 Probenvorbereitung	44
3.2.1 Gewinnung der Blutproben	45
3.2.2 Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut	45
3.2.3 Gewinnung von PBL aus Vollblut mittels Erythrozytenlyse	46
3.2.4 MDBK-Zellen.....	46
3.2.5 Zählung der gewonnenen Zellen	47
3.2.6 Membranproteinpräparation	47
3.2.7 Aufbereitung des Impfstoffs PregSure BVD	48
3.2.8 Aufbereitung von Zellen für die PAGE.....	48
3.2.9 Aufbereitung der Proben für die IP	49
3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate	49
3.4 SDS-PAGE	50
3.4.1 2D Gelelektrophorese	50
3.4.2 1D Gelelektrophorese	52
3.4.3 Färbung von SDS-Gelen	53
3.4.4 Western Blot	55
3.4.5 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung	55
3.4.6 Immunoblot	56
3.5 Immunpräzipitation	57
3.5.1 Präzipitation von Proteinen	57
3.5.2 Chloroform-Methanol-Fällung.....	58

3.6 Anreicherung von Oberflächenproteinen	58
3.6.1 Biotinylierung der Oberflächenproteine	58
3.6.2 Anreicherung der Zelloberflächenproteine	59
3.6.3 Proteinextraktion.....	60
3.6.4 Aufreinigung und Konzentration der Peptide mittels PepClean Säulen	60
3.7 Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie	61
3.7.1 Entfärben von SDS-Gelen und Verdau der Proteine	61
3.7.2 In-Gel-Verdau.....	62
3.7.3 In-Solution-Verdau	62
3.7.4 Ansäuern der Peptide.....	62
3.7.5 Analyse im Massenspektrometer	63
3.7.6 Qualitative Auswertung mit Scaffold.....	67
3.7.7 Quantitative Auswertung mit Progenesis	67
3.7.8 Suche von Orthologen und Paralogen	68
3.8 Durchflusszytometrie	68
3.8.1 Vorbereiten der Antikörper.....	69
3.8.2 Markieren der Leukozytenpopulationen.....	69
3.8.3 Detektion der Zellen mit dem FACSCanto II System	70
3.8.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	71
3.9 Immunzytochemie	71
3.10 Statistische Auswertung	72
4 ERGEBNISSE	74
4.1 Identifikation potenzieller Kandidatenantigene aus dem Gesamtproteom von Kälberthrombozyten und PBL	74
4.1.1 Immunglobuline aus Seren und Kolostren von BNP-Überträgerkühen detektieren Thrombozytenproteine gesunder Kälber.....	74
4.1.2 Auftrennung und Darstellung des Thrombozytenproteoms gesunder Kälber	76
4.1.3 Identifikation targetierter Thrombozytenproteine mittels Massenspektrometrie	78
4.1.4 Detektion von Bindungen der BNP-Ig an PBL gesunder Kälber	79
4.1.5 Auftrennung und Darstellung des Proteoms von PBL gesunder Kälber	80

4.1.6 Identifikation von Zielproteinen aus PBL mittels Massenspektrometrie	82
4.2 Anreicherung von Membranproteinen und Identifikation potenzieller Alloantigene	83
4.2.1 Darstellung der Membranproteine von Thrombozyten und PBL mittels 1D PAGE	83
4.2.2 Ig von BNP-Überträgerkühen binden an Membranproteine von Thrombozyten und PBL gesunder Kälber	83
4.3 Mittels Immunpräzipitation wurden Alloantigene in PBL- und MDBK-Zellysat sowie im Impfstoff PregSure BVD detektiert	86
4.4 Nachweis von MDBK-Zellrückständen in der assoziierten BVD-Vakzine	90
4.4.1 Proteinzusammensetzung von PregSure BVD gleicht der von MDBK-Zellysat	91
4.4.2 Mehrere Alloantigenkandidaten sind in PregSure BVD vorhanden	92
4.5 Differenzielle Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche von Thrombozyten und PBL	93
4.6 Nähere Charakterisierung des von Ig targetierten Alloantigens	96
4.6.1 Leukozytenpopulationen weisen unterschiedlich starke Expression des Alloantigens auf	96
4.6.2 Expressionsintensität des Alloantigens variiert zwischen den einzelnen Lymphozytensubpopulationen	98
4.6.3 Das BNP-Alloantigen wird von MDBK-Zellen auf der Plasmamembran und intrazellulär exprimiert	104
4.7 Eingrenzung der potenziellen Alloantigenkandidaten aus einer Vielzahl an alloreaktiven Proteinen	106
5 DISKUSSION	108
6 ZUSAMMENFASSUNG	136
7 SUMMARY	138
8 LITERATURVERZEICHNIS	140
DANKSAGUNG	151

1 EINLEITUNG

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine Erkrankung, die im Jahr 2006 erstmals in Erscheinung trat und von der neugeborene Kälber im Alter von bis zu vier Wochen betroffen sind (Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010, Sanchez-Miguel et al., 2010, Ballingall et al., 2011, Friedrich et al., 2011, Sauter-Louis et al., 2012). Die Kälber weisen eine hochgradige Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Knochenmarksdepletion auf, was zur Ausbildung von multiplen Hämorrhagien auf der Haut und auf Schleimhäuten führt (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b). Die Letalität der Erkrankung beträgt 90% und die Kälber müssen meist aufgrund ihres sehr schlechten Allgemeinbefindens eingeschläfert werden oder sterben an den Folgen der massiven Blutungen (Pardon et al., 2010). Dabei handelt es sich um ein durch Alloantikörper vermitteltes Geschehen (Pardon et al., 2011). Die der Erkrankung zugrunde liegende Pathogenese ist jedoch bislang ungeklärt. Die Symptome sind durch Verabreichung von Kolostrum einer BNP-Mutterkuh an ein gesundes Kalb, das von einer Nicht-BNP-Kuh stammt, reproduzierbar (Friedrich et al., 2011). Mit dem Kolostrum werden Alloantikörper übertragen, die nach Immunisierung der Muttertiere mit einem inaktivierten Bovine Virus Diarrhoe (BVD)-Impfstoff entstehen und sich gegen zelluläre Antigene des Kalbes richten (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Pardon et al., 2011). Die Vakzine wurde während des Herstellungsprozesses unzureichend aufgereinigt und ist durch Bestandteile einer bovinen Nierenzelllinie (Madin Darby Bovine Kidney-Zellen) kontaminiert, die homologe Proteine exprimiert und zur Virusvermehrung verwendet wurde (Bastian et al., 2011). Die Alloantikörper binden bei den betroffenen Kälbern besonders an die im Blut zirkulierenden Thrombozyten und Leukozyten, sowie an hämatopoetische Progenitorzellen im Knochenmark und bewirken eine Zerstörung dieser körpereigenen Zellen (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Assad et al., 2012, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012).

Um die exakten Pathogenesemechanismen bei der BNP klären zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, das Protein zu kennen, gegen das die Alloantikörper gerichtet sind. Daher war es das Ziel dieser Studie, Kandidaten für das pathogenetisch relevante BNP-Alloantigen zu identifizieren.

2 LITERATUR

2.1 Auftreten der BNP

2.1.1 Geographische Verteilung der BNP

Im Jahr 2006 wurde erstmals ein gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese ungeklärter Ursache bei neugeborenen Kälbern in Bayern beobachtet (Friedrich et al., 2011). Die ersten Fälle traten schon im Jahr zuvor auf, konnten allerdings erst im Nachhinein mit BNP in Zusammenhang gebracht werden (Bastian et al., 2011). Auf die Fälle in Bayern folgten vermehrt Berichte von erkrankten Kälbern im gesamtdeutschen Raum, jedoch blieb die Anzahl deutlich unter den in Bayern beobachteten Fällen (Kasonta et al., 2012). Annähernd zeitgleich zum Ausbruch in Deutschland häufte sich das Auftreten auch in anderen europäischen Ländern, wie Belgien, den Niederlanden, Frankreich, Großbritannien, Irland, Luxemburg, Italien, Spanien, Ungarn und Polen (Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010, Sanchez-Miguel et al., 2010, Friedrich et al., 2011, Jaskowski et al., 2012, Sauter-Louis et al., 2012). Bis Ende des Jahres 2010 waren in Europa bereits insgesamt über 4000 an BNP erkrankte Kälber bekannt, wobei knapp 3000 Fälle alleine in Deutschland gemeldet wurden (Bastian et al., 2011). Im Sommer 2011 wurden die ersten Fälle von BNP auch außerhalb Europas beobachtet, diesmal in Neuseeland (Laming et al., 2012). Im selben Jahr wurde außerdem ein Fallbericht aus Kanada veröffentlicht, in dem bei einem Kalb BNP-ähnliche Symptome beschrieben wurden (Bastian et al., 2011). Da das Kalb jedoch gut auf eine Behandlung ansprach, wurde keine Knochenmarksbiopsie durchgeführt und somit kein Nachweis über eine Knochenmarksdepletion erbracht (Gosselin et al., 2011), was in Verbindung mit dem Alter der Tiere als Goldstandard zur Diagnose von BNP angesehen wird (Sauter-Louis et al., 2012).

Vereinzelt kam es schon vor dem Ausbruch der BNP zu hämorrhagischer Diathese mit Knochenmarksbeeinträchtigung bei neugeborenen Kälbern (Ammann et al., 1996, Shimada et al., 2007, Friedrich et al., 2011). In Japan trat 2007 ein Fall von idiopathischer hämorrhagischer Diathese bei einem elf Tage alten Holstein Kalb auf

(Shimada et al., 2007). Das Tier zeigte bei der Einlieferung in die Klinik eine nicht-regenerative Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie und verstarb elf Tage später durch Verbluten aus einer Injektionsstelle (Shimada et al., 2007). In der pathologischen Untersuchung wurde eine Knochenmarksaplasie vorgefunden und letztendlich wurde ein kongenitaler Zusammenhang diagnostiziert (Shimada et al., 2007). Ebenso wurde im Jahr 2008 ein 16 Tage altes Japanisches Schwarzbild Kalb mit den gleichen Symptomen in die Tierklinik der Universität für Landwirtschaft und Veterinärmedizin in Obihiro, Japan, eingeliefert (Fukunaka et al., 2010). Nach drei Tagen wurde es euthanasiert und in der pathologischen Untersuchung wurde ebenfalls ein aplastisches Knochenmark diagnostiziert (Fukunaka et al., 2010). Obwohl bisher von keiner Assoziation mit BNP ausgegangen wird, da keine Häufung der Fälle in Japan berichtet wurde (Sauter-Louis et al., 2012), lässt die große Übereinstimmung der klinischen und pathologischen Befunde dieser Kälber einen Zusammenhang mit BNP offen (Fukunaka et al., 2010).

2.1.2 Namensgebung der BNP

Charakteristischerweise sind Kälber bis zu einem Alter von vier Wochen von der Erkrankung betroffen (Kappe et al., 2010). Die ersten klinischen Anzeichen, die von Tierärzten oder den Tierhaltern an erkrankten Tieren wahrgenommen werden, sind meist Petechien am Flotzmaul und den Schleimhäuten, blutige Diarrhoe, Meläna oder unstillbare Blutungen an den Ohrmarkeneinzugsstellen, Injektionsstellen oder nach Insektenstichen (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b). Angelehnt an diese auffallende Klinik gab man der Krankheit vorerst die unterschiedlichsten Namen, wie „Haemorrhagic Disease Syndrome“ (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Kappe et al., 2010), „(Idiopathic) Haemorrhagic Diathesis“ (Pardon et al., 2010, Ballingall et al., 2011), „Bleeding Calf Syndrome“ (Bell et al., 2010b), „Bleeding Disturbances in Neonatal Calves“ und nicht zuletzt „Neonatal Haemorrhagic Diathesis“ (Pardon et al., 2010). Bei einem Symposium im Dezember 2009 in Marseille, Frankreich einigten sich die beteiligten Tierärzte dann auf den Namen „Bovine Neonatale Panzytopenie“ und die Diagnose-Kriterien: Auftreten von multiplen äußeren und inneren Blutungen infolge Thrombozytopenie mit

Leukozytopenie und Knochenmarksdepletion bei Kälbern in einem Alter von bis zu vier Wochen (Friedrich et al., 2011).

2.1.3 Untersuchungen zu prädisponierenden Faktoren

Bislang stellte sich keine Rasse oder Nutzungsrichtung als besonders empfänglich für die Erkrankung heraus (Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010, Ballingall et al., 2011, Deuskens et al., 2011, Friedrich et al., 2011, Lambton et al., 2012). In Europa waren Tiere unterschiedlicher Rassen simultan an BNP erkrankt (Friedrich et al., 2009). Zu den betroffenen Rassen zählen unter anderem Holstein-Friesian, Weißblaue Belgier, Braunvieh, Charolais, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Aberdeen Angus, Montbéliard sowie Kreuzungen aus diversen Rassen (Sauter-Louis et al., 2012). Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen (Pardon et al., 2010, Deuskens et al., 2011, Lambton et al., 2012, Sauter-Louis et al., 2012). Die Letalität beträgt unabhängig von der Behandlung etwa 90% (Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010). Im Frühjahr 2009 starben neun von zehn erkrankten Kälbern in einer schottischen Rinderherde innerhalb von 24 bis 38 Stunden nach dem Auftreten der ersten klinischen Symptome (Bell et al., 2010b). Es wurde jedoch auch vereinzelt über subklinische, sowie über wenige milde Verläufe berichtet (Pardon et al., 2010, Deuskens et al., 2011). Obwohl die Inzidenz klinischer BNP bei etwa 0,3% liegt, kam es in einzelnen betroffenen Betrieben zu einer Häufung von Fällen (Bastian et al., 2011, Sauter-Louis et al., 2012). Verschiedene Untersuchungen beschrieben, dass auf Betrieben mit BNP zwischen fünf und zehn Prozent der Kühe die Erkrankung bei ihren Kälbern auslösten (Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010). Des Weiteren variierte die Zeitspanne, in der die Erkrankung auf den verschiedenen Betrieben auftrat. So gab es Betriebe, bei denen es in jedem Jahr zu Neuerkrankungen kam, bei anderen nur in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, bei wiederum anderen zeigten sich erst im übernächsten Jahr erneut Fälle von an BNP erkrankten Kälbern (Pardon et al., 2010).

2.2 Klinische, pathologische und histopathologische Anzeichen der BNP

2.2.1 Klinisches Erscheinungsbild der BNP

Charakteristische Merkmale für die BNP sind das gemeinsame Auftreten multipler innerer und äußerer Blutungen, Thrombozytopenie, Leukozytopenie und eine Knochenmarksdepletion (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009). Die betroffenen Kälber weisen individuell unterschiedlich stark ausgeprägte Anzeichen einer generalisierten hämorrhagischen Diathese auf. Das Allgemeinbefinden kann zu Beginn der Erkrankung noch uneingeschränkt sein, verschlechtert sich jedoch häufig rapide mit dem Fortschreiten der Krankheit (Friedrich et al., 2009, Bell et al., 2010b). Erste klinische Symptome sind blasse Schleimhäute, Petechien an den Schleimhäuten, wie beispielsweise in der Maulschleimhaut, an den Skleren und Konjunktiven und den Ohrmuscheln, sowie Epistaxis und Blutungen aus Maulhöhle und den Ohrmarkeneinzugsstellen (Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010, Sanchez-Miguel et al., 2010). Unstillbare Blutungen, wie beispielsweise an Injektionsstellen, nach Insektenstichen oder Traumata sind besonders hervorstechende Symptome bei der BNP. Teilweise kann die Erkrankung auch mit hohem Fieber und Dyspnoe einhergehen (Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010). Dreiundfünfzig Prozent der an BNP erkrankten Kälber, die in der internistischen Abteilung der Klinik für Großtiere der Universität Gent, Belgien (zwischen Juli 2008 und September 2009) behandelt wurden, wiesen therapieresistentes Fieber mit Temperaturen von bis zu 41°C auf (Pardon et al., 2010). Wenige Stunden bis Tage nach den ersten Anzeichen wurden Blutungen auf der Haut der Patienten sichtbar, die vermutlich eine Folge von Insektenstichen darstellten (Pardon et al., 2010). Der Verlauf der Krankheit wurde in drei Phasen eingeteilt (Pardon et al., 2010). Die Initialphase umfasste dabei 28% der mit BNP eingelieferten Tiere in diesem Zeitraum und war gekennzeichnet durch ein normales Verhalten und normalen Appetit, die rektal gemessene Körpertemperatur war jedoch bei allen Tieren in dieser Gruppe erhöht (Pardon et al., 2010). Nur ein Kalb zeigte Spontanblutungen und Petechien, ein weiteres Kalb wies Hämatome im Bereich der Jugularvene auf und zwei weitere

litten an Meläna (Pardon et al., 2010). Tiere in der zweiten Phase, ebenfalls 28% der Tiere, zeigten ein verschlechtertes Allgemeinbefinden (Pardon et al., 2010). Sie wirkten müde, wiesen vereinzelt Petechien auf und litten zeitweise an Hautblutungen sowie an Meläna (Pardon et al., 2010). In der Endphase, in der sich 44% der Tiere bei ihrer Einlieferung befanden, wirkten die Kälber überwiegend apathisch und lagen fest (Pardon et al., 2010). Charakteristische Anzeichen für diese Phase waren die blassen, mit Petechien übersäten Schleimhäute und Meläna (Pardon et al., 2010). Kälber, die an BNP erkranken, sterben zum Teil innerhalb weniger Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome oder müssen aufgrund des starken Blutverlustes und dem schlechten Allgemeinbefinden euthanasiert werden (Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010). Die Sterberate ist sehr hoch, dennoch erholen sich etwa zehn Prozent der Kälber wieder spontan von der Erkrankung (Pardon et al., 2010, Deuskens et al., 2011).

2.2.2 Subklinische Verläufe

Einige Kälber aus betroffenen Betrieben zeigten ähnliche Blutbildveränderungen, wie die erkrankten BNP-Kälber, ohne jedoch klinische Symptome aufzuweisen (Penny et al., 2009). Demnach ist davon auszugehen, dass es einen subklinischen Verlauf der Krankheit gibt (Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010, Witt et al., 2011). In Brandenburg wurde bei der hämatologischen Untersuchung von 61 neugeborenen Kälbern bei zehn dieser Tiere Abweichungen im Blutbild gefunden, aber nur sechs dieser Tiere entwickelten im weiteren Verlauf eine klinische BNP (Witt et al., 2011). Kälber, die an subklinischer BNP leiden, könnten aufgrund der Immunsuppression infolge der Leukozytopenie empfänglicher für Sekundärerkrankungen sein (Friedrich et al., 2009, Kappe et al., 2010).

2.2.3 Hämatologische Veränderungen

Die charakteristischen Blutbildveränderungen sind schon innerhalb der ersten Lebenswoche feststellbar (Witt et al., 2011). Da die Auswertungen nicht immer gleichermaßen detailliert durchgeführt wurden und zusätzlich die einzelnen Werte von Fall zu Fall sehr stark schwankten, widersprechen sich die Angaben stellenweise. Als wiederkehrende Befunde traten jedoch eine hochgradige

Thrombozytopenie (etwa null bis fünf Prozent des unteren Referenzwertes), eine mittel- bis hochgradige Leukozytopenie (zwischen null und 43% des unteren Referenzwertes) und bei einem Teil der Tiere eine aregenerative Anämie (Hämatokrit zwischen 8% bis 33% und Erythrozyten zwischen 24% bis 81% des unteren Referenzwertes) und Monozytopenie (null bis 17% des unteren Referenzwertes) auf (Friedrich et al., 2009, Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010).

Ob es bei der klinischen BNP zu einer verlängerten Prothrombinzeit sowie aktivierten partiellen Thromboplastinzeit kommt, die als Indikatoren der Gerinnungszeit herangezogen werden, ist nicht eindeutig geklärt. Während bei zwei Tieren, die am ersten Tag der Erkrankung getestet wurden, die Werte im Referenzbereich lagen (Bell et al., 2010b), war in einer anderen Studie bei allen neun getesteten Tieren die Prothrombinzeit deutlich verlängert, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit hingegen nur bei drei dieser Tiere (Kappe et al., 2010).

2.2.4 Pathologische Befunde bei der BNP

In der pathologischen Untersuchung wird letztlich das ganze Ausmaß der Erkrankung sichtbar. Die meisten makroskopischen Befunde lassen sich von der hochgradigen Thrombozytopenie ableiten. So kommt es in der Haut und Unterhaut, besonders häufig im Bereich der Gelenke, und auf den Schleimhäuten und Serosen zu unterschiedlich starken Ausprägungen von Hämorrhagien, wie Petechien, Purpura, Ekchymosen, bis hin zu Hämatomen sowie zu diffusen Blutungen in die Organe und Körperhöhlen der erkrankten Kälber (Friedrich et al., 2009, Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010). Das hämatopoetische Knochenmark der langen Röhrenknochen und des Sternums ist häufig nur blassrot und die Lymphknoten können in unterschiedlicher Ausprägung eine Lymphadenopathie aufweisen (Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010).

Fast alle Kälber (98%) wiesen Blutungen auf den serösen Oberflächen und der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts auf (Kappe et al., 2010). Außerdem traten die Hämorrhagien bei 88% der Tiere in Haut und Unterhaut auf, bei weiteren 84% waren ferner das Herz, die Meningen und die Skelettmuskulatur betroffen (Kappe et al., 2010). Fünfundvierzig Prozent der Kälber wiesen blutigen Darminhalt auf und bei 32% waren Erosionen und Ulzerationen des Labmagens nachweisbar (Pardon et al.,

2010). Die Synovia von mindestens einem Gelenk war bei 23% der Kälber sanguinös, bei weiteren 13% kam es zu einem Hämatothorax, sowie bei 5% zu einer Blutansammlung in der Bauchhöhle (Pardon et al., 2010). Einige Kälber zeigten außerdem Anzeichen eines Entzündungsgeschehens; so litten insgesamt 27% der Fälle einer Studie an einer fibrinösen oder eitrigen Pneumonie, weitere 11% wiesen Entzündungen in der Maulhöhle auf (Kappe et al., 2010).

2.2.5 Histopathologische Besonderheiten

In der Histopathologie wurde deutlich, dass die Struktur der betroffenen Gewebe intakt bleibt, und so basieren die Hämorrhagien, die auch makroskopisch bei an BNP erkrankten Kälbern sichtbar werden, auf einer Extravasation der Erythrozyten und nicht etwa auf einer Zerstörung des Gewebes (Pardon et al., 2010). Wenn Entzündungen vorlagen, dann waren diese mit weiteren Faktoren assoziiert, wie beispielsweise in einem Fall mit einer neutrophilen Vaskulitis bei einem septikämischen Kalb (Pardon et al., 2010). In einigen Fällen war eine Kapsel­fibrose von Leber, Milz oder Lunge nachweisbar (Pardon et al., 2010). Die entzündlichen Exsudate von Fällen mit fibrinöser Pneumonie enthielten neben einer großen Menge an Fibrin nur wenige neutrophile Granulozyten (Kappe et al., 2010). In histopathologischen und immunzytologischen Färbungen wurde festgestellt, dass Veränderungen des lymphatischen Gewebes eine Depletion der Milzfollikel, periarteriolen Lymphscheiden in der Milz und von Lymphknoten umfassten, wobei T- und B-Zellen gleichermaßen betroffen sein sollen (Pardon et al., 2010). In Milzabklatschpräparaten dreier Kälber fand man Immunoblasten und Plasmazellen (Pardon et al., 2010). Ein Kalb wies Makrophagen mit exzentrischem, rundem bis ovalem Kern mit auffälligem Nukleolus und fein gestricheltem basophilem Chromatin und viel vakuolisiertem Zytoplasma auf, woraus die Autoren schließen, dass es sich um aktivierte Makrophagen handelt (Pardon et al., 2010). In den Lymphknoten mehrerer Tiere wurde eine Histiozytose des medullären Sinus festgestellt (Pardon et al., 2010). In der Beschreibung des Thymusgewebes widersprechen sich die Angaben. Während in einer Studie neben Hämorrhagien keinerlei Veränderungen festgestellt werden konnten (Kappe et al., 2010), war in einer anderen Studie bei allen untersuchten Präparaten eine lymphoide Depletion vorhanden (Pardon et al.,

2010). In einigen lymphatischen Geweben waren mehrkernige Riesenzellen sichtbar, aber weder im hämatopoetischen, noch im lymphatischen Gewebe gab es Anzeichen von Einschlusskörperchen (Kappe et al., 2010).

Die bedeutendsten histopathologischen Veränderungen waren jedoch sowohl im femoralen, als auch im sternalen Knochenmark der betroffenen Kälber zu finden. Bei allen Tieren war dies fast vollständig depletiert und die myeloiden und erythroiden Zelllinien waren größtenteils durch Fettgewebe ersetzt, während im Interzellulärraum proteinhaltige Flüssigkeit und Erythrozyten zu finden waren (Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010). Nur wenige Megakaryozyten verblieben im Knochenmark und stellenweise enthielt es (wie vorher schon als aktiviert beschriebene) Makrophagen, die sowohl vereinzelt als auch in größeren Ansammlungen auftraten (Pardon et al., 2010). In wenigen Fällen waren in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten histologischen Schnitten noch kleine Inseln hämatopoetischen Gewebes vorhanden und an diesen Stellen gelegentlich auch herdförmige Degeneration und Apoptose der Vorläuferzellen sichtbar (Kappe et al., 2010). Einige (9%) betroffene Tiere wiesen eine extramedulläre Hämatopoese auf (Kappe et al., 2010). Anhand von Knochenmarksbiopsien noch lebender BNP-Kälber wurde festgestellt, dass die Depletion mit dem Verlauf der Krankheit fortschreitet (Pardon et al., 2010). Während bei Kälbern in der terminalen Phase das Knochenmark eine vollständige Aplasie aufwies, sah man in den anderen Fällen je nach Zeitpunkt der Entnahme eine unterschiedlich starke Ausprägung der Depletion (Pardon et al., 2010). Aufgrund der Depletion anderer Zelllinien dominierte der eosinophile Anteil von zwei Tieren und des Weiteren konnte eine Hämophagozytose beobachtet werden (Pardon et al., 2010).

2.3 Ätiologie der BNP

Um den Auslöser für das plötzlich gehäufte Auftreten hämorrhagischer Diathese bei neugeborenen Kälbern zu identifizieren, wurden mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen. Es konnten weder eine Beteiligung von toxischen Substanzen (beispielsweise Adlerfarn, *Pteridium aquilinum*) noch von Medikamenten (zum Beispiel Chloramphenicol) festgestellt werden, die dafür bekannt sind eine erhöhte

Blutungsneigung oder eine Knochenmarksdepletion auslösen zu können (Friedrich et al., 2009, Pardon et al., 2010). Auch strahlenbedingte Schäden des Knochenmarks wurden ausgeschlossen (Friedrich et al., 2009, Pardon et al., 2010). Ebenfalls konnte eine Infektion mit dem BVD-Virus, dem Blauzungenvirus und Epizootischem Hämorrhagie-Virus durch entsprechende Diagnostik ausgeschlossen werden (Friedrich et al., 2009, Pardon et al., 2010). Dementgegen hatten Kappe et al. bei 20% der 25 untersuchten BNP Kälber und bei 12,5% der Kontrolltiere (n = 8) ein Circovirus isolieren können (Kappe et al., 2010). Drei der Proben wurden sequenziert und stimmten zu 99% in der Sequenz mit dem Porcinen Circovirus (PCV) Typ 2b überein (Kappe et al., 2010). Daher postulierten sie, dass eine Infektion mit PCV für die BNP verantwortlich sein könnte (Kappe et al., 2010). In weiteren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen PCV 2 und BNP jedoch nicht bestätigt werden (Willoughby et al., 2010). Mehrere Forschungsgruppen diskutierten, dass ein immunmediertes Geschehen dieses Krankheitsbild bei den betroffenen Kälbern hervorruft (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b, Pardon et al., 2010). Auffallend war, dass betroffene Betriebe den inaktivierten BVD-Impfstoff PregSure BVD der Firma Pfizer Animal Health angewendet hatten (Friedrich et al., 2009) und eine Begrenzung der Krankheit auf Länder bestand, in denen dieser vermarktet wurde, während keine Fälle von BNP in europäischen Ländern auftraten, in denen die Vakzine nicht auf dem Markt war, wie beispielsweise in der Schweiz, Österreich oder Skandinavien (Bastian et al., 2011, Kasonta et al., 2012). Anhand epidemiologischer Studien bestätigte sich die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BNP und der Verwendung des Impfstoffes PregSure BVD in den betroffenen Betrieben bestand (Kasonta et al., 2012, Lambton et al., 2012, Sauter-Louis et al., 2012). Die Virusvermehrung für diesen Impfstoff fand in einer immortalisierten bovinen Nierenzelllinie (MDBK) statt und es konnte nachgewiesen werden, dass der Impfstoff mit Bestandteilen dieser Zellen verunreinigt ist (Bastian et al., 2011). Hinzu kommt, dass der Hersteller für diese Vakzine ein neuartiges Adjuvans, Procision-A, verwendete, das eine hervorragende Immunreaktion gegen das BVD Virus bewirkt (Bastian et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Kasonta et al., 2012).

Da die BNP nicht zu den meldepflichtigen Krankheiten zählt, gibt es keine offiziellen Angaben zur Inzidenz von BNP, das Auftreten infolge der Impfung mit PregSure BVD wurde aber auf weniger als 0,3% geschätzt (Bastian et al., 2011). Inzwischen ist bekannt, dass die Inzidenz von BNP vom angewandten BVD Impfschema innerhalb der einzelnen Bundesländer abhängig ist (Kasonta et al., 2012). In Niedersachsen wurde im landesweiten BVD-Bekämpfungsprogramm ein modifiziertes Impfprotokoll angewandt, bei dem nach einer Erstimpfung mit PregSure BVD die Boosterimpfungen mit einer BVD Lebendvakzine durchgeführt wurden und es traten daraufhin in diesem Bundesland sechs BNP Fälle je 100.000 verkaufter PregSure BVD-Impfdosen auf (Kasonta et al., 2012). In Bundesländern, in denen die Tiere den Herstellerangaben entsprechend durch zweimalige Applikation von PregSure BVD im Abstand von drei Wochen grundimmunisiert wurden und weitere Boosterimpfungen nach je zwölf Monaten erfolgten, wie es beispielsweise in Bayern praktiziert wurde, ist die Inzidenz deutlich höher mit etwa 100 Erkrankungen je 100.000 verkaufter Dosen PregSure BVD in Bayern (Kasonta et al., 2012). In wenigen Fällen reichte eine einzige Impfung des Muttertieres mit PregSure BVD aus, um ein Kalb mit BNP zu bekommen, aber in der Regel häufen sich die Fälle drei Jahre nach Einsatz des Impfstoffes (Kasonta et al., 2012). Dies zeigt, dass meist mehrfache Immunisierungen nötig sind, um die Erkrankung auszulösen (Kasonta et al., 2012). Die beschriebene zeitliche Verzögerung bestätigte sich auch in Neuseeland, wo im August 2011 die ersten Fälle von BNP auftraten, wiederum drei Jahre nachdem Pfizer Animal Health den Impfstoff dort auf den Markt brachte (Kasonta et al., 2012). Der Hersteller nahm den Impfstoff zunächst freiwillig sukzessive vom Markt; als erstes in Deutschland im April 2010, gefolgt vom gesamteuropäischen Markt im Juni 2010 und zuletzt auch in Neuseeland im August 2011, nachdem dort die ersten Fälle publik geworden waren. Mittlerweile wurde die Zulassung für die Vakzine in Deutschland vom Paul-Ehrlich-Institut entzogen (Bastian et al., 2011).

2.4 Pathogenese der BNP

2.4.1 Untersuchungen zur Pathogenese

Zu Beginn des gehäufteten Auftretens hämorrhagischer Diathese bei neugeborenen Kälbern war noch völlig unbekannt, welche pathogenetischen Faktoren in der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen. Großes Augenmerk wurde auf die Möglichkeit der Assoziation zwischen BNP und einem bestimmten genetischen Hintergrund gelegt (Kappe et al., 2010, Ballingall et al., 2011, Krappmann et al., 2011). In einer Studie wurde die Allel-Diversität des Major Histocompatibility Complexes (MHC) II von 43 an BNP erkrankten Kälbern und entsprechenden Kontrollen untersucht (Ballingall et al., 2011). Dieser Genlocus nimmt direkt auf Antigenpräsentation, Selbsttoleranz und Antikörperproduktion von Lymphozyten Einfluss und enthält Gene, die mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten korrelieren (Ballingall et al., 2011). Ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Allelen und BNP wurde jedoch nicht festgestellt (Ballingall et al., 2011). Außerdem wurden in einer Studie Mutationen im Gen für den Koagulationsfaktor XI untersucht, da hier bereits ein Gendefekt bekannt ist, der bei Holstein-Rassen zu einem Mangel des Faktors führt (Krappmann et al., 2011). Es gab keine Assoziation von Faktor XI Gendefekten mit BNP, aber es zeichnete sich eine Häufung von BNP-Fällen in bestimmten Rinder-Familien ab, wodurch eine gewisse genetische Prädisposition für BNP nahe gelegt wurde (Krappmann et al., 2011). So kam es in einer Versuchsrinderherde des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf bei etwa 2,2% der Kälber, die im Zeitraum von Mai 2007 bis September 2009 geboren wurden, zum Ausbruch von BNP, wobei alle betroffenen Tiere von einem bestimmten F1 Bullen einer Charolais - Deutsch Holstein - Kreuzung abstammten, während die Nachkommen anderer F1 Bullen keine BNP entwickelten (Krappmann et al., 2011).

2.4.2 Experimentell induzierte BNP

Eine bedeutende Entdeckung war die entscheidende Rolle von Kolostrum bei der Entstehung der Krankheit. Bei einem Kolostrumtränkeversuch stellte man fest, dass BNP bei Kälbern, die aus BNP-freien Betrieben stammten, durch die Gabe von

Biestmilch einer Kuh übertragen werden konnte, die bereits ein an BNP erkranktes Kalb zur Welt gebracht hatte (BNP-Kolostrum) (Friedrich et al., 2011). Während drei der sechs Kälber in dieser Studie eine klinische BNP entwickelten, wiesen zwei weitere Tiere ausschließlich Blutbildveränderungen auf und ein Kalb zeigte keinerlei Symptome von BNP (Friedrich et al., 2011). Wenn man umgekehrt Kälbern von BNP-Müttern nicht deren Kolostrum, sondern Kolostrum von Kühen ohne BNP-Vorgeschichte verabreichte, trat die BNP nicht auf (Bell et al., 2010a). Diese Versuche im Kalb zeigten als proof-of-principle die entscheidende Bedeutung des Kolostrums bestimmter Kühe (BNP-Überträger).

Um den Verlauf der Erkrankung genauer zu untersuchen, wurden daraufhin mehrere Studien durchgeführt, in denen die Erkrankung durch BNP-Kolostrum in Kälbern hervorgerufen wurde (Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012). Acht von dreizehn Kälbern (62%) aus drei verschiedenen Studien, in denen BNP bei gesunden Kälbern aus BNP-freien Betrieben induziert wurde, wiesen für die BNP charakteristische klinische Symptome auf (Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012). Diese Studien zeigten alle einen charakteristischen Verlauf der Blutwerte. Alle fünf Tiere einer Studie zeigten zunächst wenige Stunden nach Kolostrumaufnahme einen jeweils signifikanten Abfall der Thrombozyten (acht Stunden postkolostral um durchschnittlich 40% im Vergleich zu den Kontrollwerten), neutrophilen Granulozyten (vier Stunden postkolostral um etwa 75%), Lymphozyten (vier Stunden postkolostral um etwa 70%) und Monozyten (zwei Stunden postkolostral um circa 95%) (Bell et al., 2012). Daraufhin kam es zu einem leichten Anstieg der Thrombozyten (zwölf bis 24 Stunden postkolostral), Lymphozyten (acht bis 20 Stunden postkolostral), Monozyten (acht bis zwölf Stunden postkolostral) und der Neutrophilen, wobei die neutrophilen Granulozyten acht Stunden nach Kolostrumaufnahme keinen signifikanten Unterschied mehr aufwiesen und die Werte der stabkernigen Neutrophilen sogar bis zwölf Stunden postkolostral signifikant höher lagen als die der Kontrolltiere (Bell et al., 2012). Anschließend folgte ein erneuter Abfall der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten (je ab 48 Stunden postkolostral signifikant niedrigere Werte) und während die Lymphozyten und Monozyten konstant auf diesem niedrigen Wert blieben, sanken die

Thrombozytenwerte ab vier Tagen nach Kolostrumaufnahme weiter ab, bis sie zum Teil einen Wert von Null aufwiesen (Bell et al., 2012).

Innerhalb der Lymphozytenpopulation wurde in einer weiteren Studie direkt nach Kolostrumaufnahme ein Abfall von CD25⁺, CD21⁺ und γ/δ TCR⁺ Zellen festgestellt, während CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen diesen Abfall nicht aufwiesen (Laming et al., 2012). Die relativen Prozentzahlen von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen stiegen im weiteren Verlauf gegenüber den anderen Subpopulationen verhältnismäßig an (Laming et al., 2012).

Die Erythrozytenwerte und der Hämatokrit blieben bei allen Tieren unverändert und obwohl sie bei den BNP Kälbern durchschnittlich generell unter denen der Kontrolltiere lagen, war dieser Unterschied jedoch nie signifikant (Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012).

In einer *in vitro* Studie mit hämatopoetischen Vorläuferzellen von Kälbern mit experimentell hervorgerufener BNP wurde im Vergleich zu gesunden Kälbern nachgewiesen, dass sechs Tage nach Kolostrumgabe die determinierten Progenitorzellen für Erythrozyten (*engl.* Colony-forming unit erythrocytes) bei den erkrankten Kälbern gar nicht mehr zu finden waren und die Progenitorzellen für Granulozyten und Monozyten (*engl.* Colony-forming unit granulo-monocyte) in ihrer Anzahl deutlich reduziert waren (Laming et al., 2012).

Bei wiederholten Knochenmarksbiopsien aus dem Sternum von Kälbern mit induzierter BNP sah man hingegen, dass sechs Tage nach Kolostrumaufnahme alle sieben Kälber eine deutlich reduzierte Dichte hämatopoetischer Zellen zeigten, wobei nur wenige Megakaryozyten und einige Neutrophile, Eosinophile und Normoblasten zu sehen waren (Bell et al., 2012, Laming et al., 2012). Am zehnten Tag nach Kolostrumgabe wiesen fünf von sieben Kälbern mit weniger als 25% Zellanteil in den Biopstaten eine tri-lineäre Hypoplasie auf (Bell et al., 2012, Laming et al., 2012).

Pathologisch konnten interessanterweise bei allen Kälbern, die ursprünglich von gesunden Kühen stammten, zumindest leichte Läsionen, wie beispielsweise Petechien an den typischen Lokalisationen, festgestellt werden, bei zehn der Kälber wurden sogar schwerwiegende Hämorrhagien der inneren Organe und des Gastrointestinaltraktes vorgefunden (Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming

et al., 2012). Die Lymphknoten waren im Vergleich zu denen der Kontrollkälber schwerer und wiesen breitere kortikale Bereiche auf, in denen im Gegensatz zu den Kontrolltieren die Bildung definierter Sekundärfollikel nicht sichtbar war (Bell et al., 2012). Es konnten jedoch vermehrt pleomorphe und einige mehrkernige Zellen gefunden werden (Bell et al., 2012). Die Randbereiche des Thymus waren ebenfalls erweitert und wiesen viele Thymozyten auf (Bell et al., 2012).

Anhand der Femurlänge der betroffenen Kälber konnte in der pathologischen Untersuchung festgestellt werden, dass die Kälber mit induzierter BNP signifikant kleiner waren als Kontrollkälber (Laming et al., 2012).

In einem weiteren Schritt konnte die Krankheit auch durch Infusion von Serumantikörpern der BNP-Überträger in neonatalen Kälbern reproduziert werden (Foucras et al., 2011). Dabei wurde gesunden Kälbern zwei Liter einer Lösung intravenös (i.v.) infundiert, die 100 – 150 g Gesamt-IgG enthielt, das zuvor aus den Seren von BNP-Müttern präzipitiert wurde (Foucras et al., 2011). Diese Menge an infundiertem Gesamt-IgG bewirkte bei den Versuchskälbern einen vergleichbaren Anstieg der Serum-IgG Werte, wie bei gesunden Tieren kurz nach der Kolostrumaufnahme (Foucras et al., 2011). Zwei der sechs infundierten Kälber starben zwei Tage darauf an Nebenwirkungen, die direkt durch die Infusion ausgelöst wurden (Foucras et al., 2011). Die weiteren vier Kälber entwickelten klinische Anzeichen von BNP und zwei dieser Tiere mussten am Tag 15 und 17 aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert werden (Foucras et al., 2011). Alle Kälber (n = 4), die BNP-IgG infundiert bekamen, wiesen zehn Tage nach der Infusion neben den klinischen Symptomen im Vergleich zur Kontrolle auch einen signifikanten Abfall der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen im Blut auf (Foucras et al., 2011). Die beiden überlebenden Tiere entwickelten sich normal und ihre Blutwerte, sowie die Knochenmarkszusammensetzung regenerierten sich innerhalb eines Monats wieder (Foucras et al., 2011). Knochenmarksbiopsien zeigten eine deutliche Reduktion der Zellularität der betroffenen Tiere (Foucras et al., 2011). Hiervon waren hämatopoetische Vorläuferzellen der Erythrozyten, Megakaryozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie Monozyten betroffen, während

eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen unbeeinträchtigt waren (Foucras et al., 2011).

Da Zellen im Blut offensichtlich ein Angriffsziel für die übertragenen Alloantikörper darstellen, wurde näher untersucht, welche Zellen targetiert werden. Um die Bindung der Serumantikörper von BNP-Überträgern an Blutzellen neugeborener Kälber von BNP-Müttern zu untersuchen, induzierte man BNP auch bei Kälbern von bekannten BNP-Überträgern (Bridger et al., 2011). Leukozyten von den BNP-Kälbern und von Kontrollkälbern wurden mit Seren von BNP-Überträgern und Kontrollkühen inkubiert und die Bindungsstärke von IgG auf deren Oberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen (Bridger et al., 2011). Dabei wurde die mittlere Bindungsintensität (*engl.* Mean fluorescence intensity, MFI) der Fluoreszenz-markierten sekundären anti-IgG-Antikörper an die gebundenen BNP-IgG auf Lymphozyten und Monozyten von der MFI auf Granulozyten unterschieden (Bridger et al., 2011). Es konnte festgestellt werden, dass Zellen von BNP-Kälbern im Vergleich zu Zellen von Kontrollkälbern signifikant mehr IgG auf ihrer Oberfläche binden und dass Lymphozyten sowie Monozyten von BNP-Kälbern mehr IgG auf ihrer Oberfläche hatten als die Granulozyten (Bridger et al., 2011).

In dieser Studie zeigten zwei der vier Kälber, die BNP-Kolostrum erhalten hatten, nach sieben und 13 Tagen klinische Symptome (Bridger et al., 2011). Eines dieser beiden verstarb 13 Tage nach Kolostrumaufnahme, eines erholte sich innerhalb von einer Woche wieder und zwei Kälber, Zwillinge, zeigten gar keine äußeren Auffälligkeiten (Bridger et al., 2011). In der Durchflusszytometrie wurde getestet, ob die peripheren Blutzellen der Kälber eine Bindung von IgG auf ihrer Oberfläche aufwiesen und wie sich diese im Verlauf der Erkrankung verhielt (Bridger et al., 2011). Dabei wurden nur die Lymphozyten und Monozyten getestet, da diese als repräsentativ für die Populationen betroffener Zellen im Blut angesehen wurden (Bridger et al., 2011). Bereits sechs Stunden nach Kolostrumaufnahme wiesen bis zu 100% der Lymphozyten und Monozyten von zwei Kälbern IgG auf ihrer Oberfläche auf (Bridger et al., 2011). Ein Kalb mit 100% IgG positiven Lymphozyten und Monozyten, verstarb 13 Tage postkolostral; ein Kalb mit 95% positiven, zeigte nur milde klinische Symptome 13 – 15 Tage postkolostral und erholte sich wieder von der

Erkrankung (Bridger et al., 2011). Die beiden Zwillinge, die im Verlauf der Studie keine klinischen Symptome entwickelten, zeigten nur eine Bindung von 19 – 30% der Lymphozyten und Monozyten (Bridger et al., 2011). Die Unterschiede im Ausprägungsgrad der Erkrankung der einzelnen Tiere korrelierten demnach mit der Bindungsintensität der kolostralen IgG an die Zellen (Bridger et al., 2011).

Mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung auf Knochenmarksausstrichen wurde dann untersucht, ob die Alloantikörper auch direkt an Knochenmarksvorläuferzellen binden und diese damit das Zielantigen ebenfalls exprimieren (Pardon et al., 2011). Dabei zeigte sich, dass alle kernhaltigen Vorläuferzellen auf ihrer Oberfläche mit den Fluoreszenz-markierten Serum-IgG reagierten, wovon jedoch Megakaryozyten ausgenommen zu sein schienen (Pardon et al., 2011).

Anhand einer immunzytologischen Studie wurde gezeigt, dass die BNP-Alloantikörper der IgG₁ Subklasse angehören, und die Bindungsaffinität der Alloantikörper zu den Leukozyten nicht von der Maturität der Zellen abhängt (Assad et al., 2012). Außerdem banden die IgG₁-Antikörper aus BNP-Mutterseren in der Immunzytologie unabhängig von Alter und Rasse der Spendertiere zu 100% an Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten, jedoch nur an wenige lymphoide Zellen, wobei in dieser Population besonders eine Affinität zu CD21 positiven Zellen nachgewiesen wurde (Assad et al., 2012). Das Bindungsmuster der Alloantikörper zeigte eine Expression des Antigens sowohl auf der Zellmembran, als auch intrazytoplasmatisch (Assad et al., 2012).

Bisher ist für die der Krankheit zu Grunde liegende Pathogenese bekannt, dass die durch den Impfstoff induzierten Alloantikörper im Plasma der BNP-Kühe vorhanden sind und während der Kolostrumproduktion ins Euter transferiert werden (Foucras et al., 2011, Assad et al., 2012). Nach der Kolostrumaufnahme kommt es in den Kälbern zur Zerstörung intravasaler Thrombozyten und in unterschiedlicher Ausprägung ebenfalls zur Zerstörung von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten sowie einer Abnahme hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark (Bridger et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012).

Das Bindungsmuster der Alloantikörper deutet bisher auf ein Alloantigen (oder eventuell auch mehrere Alloantigene) hin, das sowohl auf der Zelloberfläche als auch

im Zellinneren der im Blut zirkulierenden Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark zu finden ist (Assad et al., 2012, Laming et al., 2012). Die unterschiedliche Bindungsintensität spricht dafür, dass das Alloantigen darüber hinaus unterschiedlich stark von den verschiedenen Zellsubpopulationen exprimiert wird (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Assad et al., 2012, Bell et al., 2012).

Insgesamt reagierten alle Kälber, bei denen BNP durch Kolostrumaufnahme oder Serum-IgG-Transfer hervorgerufen wurden (n = 21). Dabei zeigten zwei Drittel der Tiere klinische Symptome, während ein Drittel subklinisch betroffen war und individuell verschieden ausgeprägt entweder Blutbildveränderungen oder in der pathologischen Untersuchung charakteristische Auffälligkeiten aufwies. Etwa 69% der Tiere, die nicht aufgrund des Versuchsaufbaus planmäßig zur Sektion euthanasiert wurden (n = 16), starben im Verlauf der Studien oder mussten wegen ihres schlechten Allgemeinbefindens, sowohl als Folge der Blutungsstörungen als auch von Infektionen, euthanasiert werden. Nur etwa 31% der Tiere überlebten die BNP und erholten sich innerhalb einiger Wochen. Daraus ist zu entnehmen, dass BNP eindeutig durch Kolostrumaufnahme übertragen wird. Da alle in diesen Studien getesteten Kälber zumindest subklinisch davon betroffen waren, sollten vermutlich alle Kälber als generell empfänglich angesehen werden.

2.5 Proteomische Methoden zur Identifizierung unbekannter Auto- und Alloantigene

Bei der Erforschung von Auto- und Alloimmunkrankheiten ist es wichtig zu wissen, gegen welche Antigenstrukturen sich die Antikörper richten, damit man einen genaueren Einblick in die zugrundeliegenden Pathogenesemechanismen erhält, was wiederum die Basis zur Erforschung von Frühdiagnose- und Therapiemöglichkeiten bildet. Zur Identifizierung unbekannter Auto- oder Alloantigene haben sich mehrere Methoden bewährt, die jeweils Vor- und Nachteile in sich bergen, sich jedoch in der Kombination weitestgehend ergänzen (Puccetti und Lunardi, 2010, Katsumata et al., 2011, Swadzba et al., 2012).

2.5.1 1D PAGE und Western Blot

Die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D SDS-PAGE) in ihrer heutigen Form wurde bereits Anfang der siebziger Jahre von Laemmli beschrieben (Laemmli, 1970). Diese Methode ermöglicht es, komplexe Gemische von Proteinen nach Denaturierung durch Natriumdodecylsulfat (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli, 1970). Zur Identifikation unbekannter Antigene kann so die Proteinzusammensetzung von Zelllysaten oder Körperflüssigkeiten gesunder und kranker Individuen anhand von entsprechend gefärbten Gelen verglichen werden, wie beispielsweise bei der sensitiven Silberfärbung zur qualitativen Übersicht (Zhao et al., 2012) oder der kolloidalen Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung zur quantitativen Analyse des Proteoms (Dyballa und Metzger, 2009). Zudem können mittels Western Blot die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran überführt und diese durch Inkubation mit den entsprechenden Auto- oder Alloantikörperhaltigen Lösungen, wie beispielsweise verdünntem Serum, detektiert werden (Saulot et al., 2002, Swadzba et al., 2012). Mittels Chemilumineszenz lassen sich die gebundenen Antikörper mit Enzym-markierten sekundären Antikörpern sichtbar machen und gegebenenfalls quantifizieren (Saulot et al., 2002). Die entsprechend gebundenen Proteine können anschließend in der Massenspektrometrie identifiziert werden (Hauck et al., 2010). Diese Methode ist besonders geeignet, um sich einen ersten Überblick über die Vielfalt reaktiver Proteine zu verschaffen, da sie es ermöglicht, eine große Anzahl von Proben innerhalb kurzer Zeit zu untersuchen (Bilalic et al., 2010, Mari et al., 2010). Weitere Vorteile der 1D SDS-PAGE sind außerdem, dass sich große Mengen von Proteinen auf einmal auftrennen lassen und auch Proteine mit hohen Molekulargewichten in das Gel einlaufen, wie etwa Di- oder sogar Polymere, wenn diese nicht vorher durch weitere Zusätze, wie beispielsweise Dithiothreitol (DTT) reduziert wurden (Ong und Pandey, 2001). Außerdem bietet sie neben der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch die Möglichkeit, stark saure und stark basische Proteine sowie stark hydrophobe Moleküle, wie zum Beispiel Membranproteine, darzustellen (Ong und Pandey, 2001). Ein erheblicher Nachteil hingegen ist die Überlagerung von Proteinen

mit gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichen pH-Werten (Ong und Pandey, 2001). Ebenso ist es schwierig, post-translationale Modifikationen der einzelnen Proteine, wie zum Beispiel unterschiedliche Phosphorylierungen oder Isoformen, anhand von 1D Gelen zu unterscheiden, wenn diese dem gleichen Molekulargewicht entsprechen, und glykosylierte Proteine können zu einem Verschmieren der Banden führen (Ong und Pandey, 2001). Des Weiteren können einige Proben aufgrund der verwendeten Puffer oder anderer Substanzen, die eine Auftrennung der Proteine im Gel behindern, nicht korrekt in das Gel einlaufen oder müssen aufgrund einer zu niedrigen Proteinkonzentration erst angereichert werden (Mari et al., 2010). Ein Nachteil, der bei der Detektion von Auto- oder Alloreaktionen zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, ist, dass durch die Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Proteine (Laemmli, 1970) konformationsabhängige Antikörperbindungen verhindert werden. In Kombination mit anderen proteomischen Methoden ist die 1D SDS-PAGE jedoch auch heute noch ein wertvoller Bestandteil von Work-Flows zur Identifikation neuer Auto- oder Alloantigene (Deeg et al., 2006, Swadzba et al., 2012).

2.5.2 2D PAGE und Western Blot

Die zweidimensionale (2D) PAGE ist eine unverzichtbare Variante zur Auftrennung und Darstellung von Proteinen aus Lysaten und Suspensionen (Carrette et al., 2006, Rabilloud et al., 2010). Diese Methode kam Mitte der siebziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts auf und basiert darauf, Proteingemische sowohl in der sogenannten ersten Dimension anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI), als auch in der zweiten Dimension ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen (MacGillivray und Rickwood, 1974, O'Farrell, 1975). Anhand von Färbemethoden, wie der sensitiven Silberfärbung oder der quantitativen kolloidalen Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung, lässt sich das Proteom verschiedener Proben darstellen (Westermeier und Schickle, 2009). Nach der Anwendung des Western Blottings können Antikörperreaktionen gegen unbekannte Antigene aus Lysaten visualisiert und quantifiziert werden (Deeg et al., 2006). Einen zentralen Stellenwert nimmt im Anschluss an diese Methode wieder die massenspektrometrische Identifikation der auffälligen Proteine ein (Deeg et al., 2006, Swadzba et al., 2012, Zipplies et al.,

2012). Nachteil der 2D PAGE ist es, dass sie weder große Proteine, noch stark basische Proteine oder Proteine, deren isoelektrischer Punkt außerhalb des pI Bereiches der ersten Dimension liegt, detektieren kann (Westermeier und Schickle, 2009, Rabilloud et al., 2010). Ein weiterer erheblicher Nachteil besteht darin, dass sich die stark hydrophoben Membranproteine nicht analysieren lassen, da diese während der isoelektrischen Fokussierung präzipitieren und nicht ins Gel einlaufen (Westermeier und Schickle, 2009, Rabilloud et al., 2010). Der größte Vorteil bei der Arbeit mit 2D Gelen ist, dass man die bestmögliche Auftrennung von komplexen Proteingemischen erhält und dass sich auch post-translationale Modifikationen und Isoformen von Proteinen differenzieren lassen (Westermeier und Schickle, 2009). Damit stellt die 2D PAGE eine wertvolle Ergänzung in der Erforschung von Auto- oder Alloantigenen verschiedener Immunkrankheiten dar.

2.5.3 Phagen-Display

Unbekannte Antigene lassen sich auch mit Hilfe des Phage-Display-Systems identifizieren (Puccetti und Lunardi, 2010, Aghabeigi et al., 2012). Diese Methode wurde 1985 erstmals von Smith et al. beschrieben (Smith, 1985). Dabei kann man sogenannte Peptid- oder Proteinbibliotheken erstellen, indem man transformierte Bakterien mit Bakteriophagen infiziert und diese Bakteriophagen im Bakterium wiederum mit den gewünschten Proteinen ausgestattet werden (Puccetti und Lunardi, 2010). Diese Bakteriophagen exprimieren dann ein an ihre Hüllproteine gekoppeltes Antigen auf ihrer Oberfläche (Smith, 1985). Erkennt ein Antikörper, der beispielsweise aus Seren erkrankter Individuen stammt, ein Peptid dieser Bibliothek und somit einen Bakteriophagen, so kann dieses Peptid anhand verschiedener Methoden, wie zum Beispiel der Immunpräzipitation (IP), Immunzytochemie oder Immunhistochemie weiter charakterisiert und anschließend identifiziert werden (Hoogenboom et al., 1998). Eine Variation dieses Prinzips ist es, cDNA von Antikörperfragmenten, die etwa aus Lymphozyten der erkrankten Individuen stammen, in Bakteriophagen einzubauen und infolge dessen auf deren Oberfläche exprimieren zu lassen (Aghabeigi et al., 2012). Dabei entsteht eine sogenannte Antikörperbibliothek mit einem großen Spektrum an Phagen mit unterschiedlichen Antikörperspezifitäten, aus der relevante Auto- oder Alloantikörper beispielsweise mit

Zelllysate-gecoateten Phagen-Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) selektiert und durch einen anti-Phagen Antikörper sichtbar gemacht werden können (Aghabeigi et al., 2012). Außerdem kann die Antikörperspezifität hier ebenfalls mittels IP, Immunzytochemie oder Immunhistochemie genauer bestimmt werden (Hoogenboom et al., 1998). Der Vorteil bei beiden Varianten des Phagen-Displays ist es, dass die unbekannt Antigene in ihrer natürlichen Konformation vorliegen und konformationsabhängige Epitope nicht zerstört werden, wie es etwa beim Western Blot der Fall sein kann (Pillay, 2004). Außerdem bleibt die Aktivität des Proteins erhalten und es kann eine Vielfalt von Proteinen oder Antikörpern einer Bibliothek relativ einfach gescreent werden, im Vergleich zu anderen Verfahren, wie beispielsweise einer cDNA Bibliothek (Pillay, 2004). Ein großer Nachteil, wie bei vielen rekombinanten Techniken ist, dass post-translationale Modifikationen an Proteinen, wie zum Beispiel Glykosylierungen, von den Wirtsorganismen, wie *Escherichia coli*, nicht korrekt oder gar nicht gesetzt werden können (Li und Caberoy, 2010). Gerade diese Modifikationen spielen jedoch häufig eine Rolle bei der Entwicklung von Auto- oder Alloimmunkrankheiten (Marth und Grewal, 2008). Für manche solcher Modifikationen kann ein weiterer Schritt angeschlossen werden, indem beispielsweise nachträglich eine Phosphorylierung durch eine Proteinkinase katalysiert wird (Pillay, 2004), aber für viele entscheidende Modifikationen ist dies nicht möglich.

2.5.4 Immunpräzipitation

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung unbekannter Auto- oder Alloantigene bietet die IP (Katsumata et al., 2011). Das Prinzip der IP besteht darin, dass anhand von Antikörpern spezifische Antigene aus einem Gemisch von Proteinen präzipitiert werden können (Kaboord und Perr, 2008). Dabei werden Antikörper mit ihren Fc-Regionen an mit Protein G oder Protein A beschichteten Kügelchen gebunden, die sogenannten Beads, die aus Sepharose oder magnetischen Mikropartikeln (Magnetic Beads) bestehen (Kaboord und Perr, 2008). Während die an Sepharose Beads gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation vom Rest der Probe isoliert werden können, erfolgt dies bei der magnetischen Variante einfach anhand eines Magneten (Kaboord und Perr, 2008). Im Anschluss an die Präzipitation werden

die Komplexe von den Beads eluiert und denaturiert (Kaboord und Perr, 2008). Auto- oder Alloantigene lassen sich bei dieser Methode beispielsweise anhand von Serumantikörpern erkrankter Individuen präzipitieren und im Anschluss mittels Western Blot oder Massenspektrometrie identifizieren (Kaboord und Perr, 2008, Katsumata et al., 2011). Ein Vorteil bei der Anwendung der IP zur Identifikation unbekannter Auto- oder Alloantigene ist es, dass sich in einem Experiment mehrere Antigene gleichzeitig detektieren lassen (ten Have et al., 2011). Außerdem ist diese Methode sehr sensitiv, wodurch sich auch Proteine präzipitieren lassen, die nur in geringen Mengen in der Probe vorkommen (Sousa et al., 2011). Des Weiteren können die Proteine, abhängig von der Aufbereitung der Proben, in ihrer natürlichen post-translationalen Form vorliegen und somit von den Antikörpern in ihrer spezifischen Konformität erkannt und präzipitiert werden (Kaboord und Perr, 2008). Allerdings kann die Affinität der Antikörper *in vitro* von der Affinität unter physiologischen Umständen abweichen und zu einer Rivalität mehrerer Proteine um die Bindungsstellen führen (ten Have et al., 2011). Ein weiterer erheblicher Nachteil liegt darin, dass die unspezifische Bindung von Proteinen, zum Beispiel an die Matrix der Beads, häufig zu falsch positiven Ergebnissen führt (Sousa et al., 2011), weshalb eine vergleichende Analyse gesunder gegenüber erkrankter Individuen zur Identifikation potenzieller Antigenkandidaten unerlässlich ist (Katsumata et al., 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Puffer und Lösungen

3.1.1 Puffer und Lösungen zur Probenaufbereitung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

NaCl ¹ (136,9mM)	8,00 g
Kaliumchlorid (2,6mM)	0,20 g
Kaliumdihydrogenphosphat (1,4mM)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,1mM)	1,45 g
ad 1000 ml Aqua dest.	

Lysepuffer 1

Harnstoff ² (9M)	27,00 g
Thioharnstoff ³ (2M)	7,60 g
CHAPS ⁴ (4%)	2,00 g
DTT ⁵ (65mM)	0,50 g
ad 50 ml Aqua bidest.	

Bei Raumtemperatur (RT) fünf Stunden rühren und daraufhin aliquotieren.

Lagerung bei -20°C. Direkt vor Gebrauch 0,1 ml Aqua bidest. pro ml Lysepuffer 1 zusetzen.

¹ Alle nicht anders markierten Chemikalien stammen von AppliChem, Darmstadt.

² GE Healthcare, Freiburg

³ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁴ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁵ Serva, Heidelberg

Ammonium-Chlorid-Lyse-Puffer (ACK-Puffer)

Ammoniumchlorid (0,15M)	8,29 g
Kaliumhydrogencarbonat (10mM)	1,00 g
Na ₂ -EDTA (0,1mM)	37,20 mg
ad 1000 ml Aqua dest., pH auf 7,2 – 7,4 einstellen.	
Lagerung bei 4°C.	

Natrium-Citrat Lösung 4% (w/v)

Natrium-Citrat ⁶	4,00 g
ad 100 ml Aqua dest.	

Acid-Citrat-Dextrose (ACD) Lösung

Natrium-Citrat ⁷ (117mM)	34,41 g
Glukose ⁸ (111mM)	20,00 g
Zitronensäure ⁹ (78mM)	15,00 g
ad 1000 ml Aqua dest.	

Modifizierte Tyrode Lösung

NaCl (134mM)	7,83 g
Na ₂ HPO ₄ (0,34mM)	48,00 mg
Kaliumchlorid (2,9mM)	222,00 mg
NaHCO ₃ (12mM)	1,01 g
HEPES (20mM)	4,77 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O (1mM)	0,20 g
ad 100 ml Aqua dest., pH auf 7,3 einstellen.	
Glukose ¹⁰ (5mM)	0,90 g
(erst kurz für Gebrauch hinzufügen)	

⁶ Merck Millipore, Darmstadt

⁷ Merck Millipore, Darmstadt

⁸ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁹ Roth, Karlsruhe

¹⁰ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.2 Lösungen für MDBK-Zellen

RPMI Medium

RPMI 1640 Medium mit Glutamin¹¹

+ 1% Penicillin/Streptomycin¹² (Pen/Strep)

+ 10% fötales Kälberserum (FCS)¹³

Trypsin/EDTA

10x Trypsin/EDTA¹⁴ 5,00 ml

ad 50 ml steriles Aqua bidest.

3.1.3 Puffer und Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford Reagenzien

Bradford Reagenz, gebrauchsfertig¹⁵.

Bovines Serum Albumin (BSA)-Stammlösung

BSA 4,00 g

ad 10 ml Aqua dest. Aliquotieren und bei -20°C lagern.

Salzsäure 1M

Salzsäure 1M, gebrauchsfertig.

3.1.4 Puffer und Lösungen für die Membranproteinpräparation

EDTA Stock 0,5M, pH 8,0

EDTA 18,62 g

ad 100 ml Aqua bidest.

+ 2g Natrium Hydroxid Plätzchen, auf Eis rühren bis gelöst und pH auf 8,0 einstellen.

¹¹ Invitrogen, Karlsruhe

¹² Biochrom, Berlin

¹³ Biochrom, Berlin

¹⁴ Biochrom, Berlin

¹⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

HEPES Stock 1M, pH 7,4

HEPES 23,83 g

ad 100 ml Aqua bidest. und pH auf 7,4 einstellen.

Bei 4°C lagern.

5M Natriumhydroxid

Natriumhydroxid 10,00 g

ad 50 ml Aqua bidest. Auf Eis rühren bis gelöst.

Puffer A

NaCl (2M) 5,84 g

1M HEPES, pH 7,4 (10mM) 500,0 µl

0,5M EDTA, pH 8,0 (1mM) 100,0 µl

ad 50 ml Aqua bidest.

Puffer B

Na₂CO₃ (0,1M) 529,95 mg

0,5M EDTA, pH 8,0 (1mM) 100,0 µl

ad 50 ml Aqua bidest. und pH auf 11,3 einstellen.

Puffer C

Harnstoff¹⁶ (4M) 12,01 g

NaCl (100mM) 292,20 mg

1M HEPES, pH 7,4 (10mM) 500,0 µl

0,5M EDTA, pH 8,0 (1mM) 100,0 µl

ad 50 ml Aqua bidest.

¹⁶ GE Healthcare, Freiburg

3.1.5 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Acrylamid-Lösung

Acrylamide-Bis Lösung 33%, gebrauchsfertig¹⁷.

Tris-HCl-Puffer 1M, pH 6,8

Tris ¹⁸ (1M)	12,11 g
-------------------------	---------

ad 100 ml Aqua bidest.

pH auf 6,8 einstellen.

Äquibrierungslösung

1M Tris-HCl ¹⁹ pH 6,8	50,00 ml
----------------------------------	----------

Glycerin, Wasserfrei	300,00 ml
----------------------	-----------

Harnstoff ²⁰ (6M)	360,00 g
------------------------------	----------

SDS (1,8%)	18,00 g
------------	---------

ad 1000 ml Aqua bidest.

Bromphenolblau-Lösung²¹

etwas Bromphenolblau²²-Pulver in Aqua bidest. lösen.

Rehydrierungslösung

Gesamtvolumen Probe + Lysepuffer 1	210,0 µl
------------------------------------	----------

Pharmalyte 3-10 ²³	2,2 µl
-------------------------------	--------

Bromphenolblau ²⁴ -Lösung	2,2 µl
--------------------------------------	--------

¹⁷ Serva, Heidelberg

¹⁸ Serva, Heidelberg

¹⁹ Serva, Heidelberg

²⁰ GE Healthcare, Freiburg

²¹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

²² Sigma-Aldrich, Deisenhofen

²³ GE Healthcare, Freiburg

²⁴ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Abdichtgel

Aqua bidest.	400,0 µl
Acrylamid ²⁵	200,0 µl
Ammoniumpersulfat (APS)	20,0 µl
TEMED	2,0 µl

SDS-Lösung 10%

SDS (35mM)	10,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

SDS-Lösung 20%

SDS (70mM)	20,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

Laufgel (10% SDS Gel)

Aqua bidest.	4,20 ml
Gelpuffer	2,50 ml
Acrylamid ²⁶	3,30 ml
10% SDS	100,0 µl
APS	50,0 µl
TEMED	20,0 µl

Lösung 1

DTT ²⁷	300,00 mg
Äquilibriumspuffer	30,00 ml

²⁵ Serva, Heidelberg

²⁶ Serva, Heidelberg

²⁷ Serva, Heidelberg

Lösung 2

2-Jodacetamid ²⁸	1,44 g
Äquilibrierungspuffer	30,00 ml
Bromphenolblau ²⁹ -Lösung	500,0 µl

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris ³⁰ (120mM)	15,00 g
Glycin ³¹ (960mM)	72,00 g
SDS (0,05%)	5,00 g

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

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

Agarose Lösung

Agarose ³² (0,5%)	0,25 g
------------------------------	--------

ad 50 ml Elektrophoresepuffer.

Nach dem Aufkochen die Lösung auf 58°C temperieren.

Vor der Verwendung wurden zusätzlich 0,5 ml SDS-Lösung 20% zugesetzt.

APS-Lösung 10%

APS (10%)	0,10 g
-----------	--------

ad 1 ml Aqua bidest.

Bei -20°C lagern und erst kurz vor Gebrauch auftauen.

Gelpuffer, pH 8,8

Tris ³³ (1,5M)	18,15 g
---------------------------	---------

ad 100 ml Aqua bidest.

auf pH 8,8 einstellen.

²⁸ GE Healthcare, Freiburg

²⁹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

³⁰ Serva, Heidelberg

³¹ Biomol, Hamburg

³² Invitrogen, Karlsruhe

³³ Serva, Heidelberg

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris ³⁴ (0,5M)	6,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	
pH auf 6,8 einstellen.	

Trenngel 10%

Aqua bidest.	4,84 ml
Gelpuffer pH 8,8	2,50 ml
30% Acrylamidlösung ³⁵	2,66 ml
10% SDS-Lösung	100,0 µl

Sammelgel 4%

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,50 ml
30% Acrylamidlösung ³⁶	1,33 ml
10% SDS-Lösung	100,0 µl
Bromphenolblau ³⁷ -Lösung	100 µl

5x Laemmlipuffer (reduzierend)

1,5M Tris ³⁸ -HCl, pH 6,8 (250mM)	8,33 ml
20% SDS-Lösung (w/v) (5%)	12,50 ml
Glycerin, wasserfrei (v/v) (50%)	25,00 ml
500mM 2-Mercaptoethanol ³⁹	1,75 ml
ad 50 ml Aqua bidest. und etwas Bromphenolblau ⁴⁰ -Pulver hinzufügen.	
Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.	

³⁴ Serva, Heidelberg

³⁵ Serva, Heidelberg

³⁶ Serva, Heidelberg

³⁷ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

³⁸ Serva, Heidelberg

³⁹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁴⁰ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.6 Färbelösungen

3.1.6.1 Diff-Quik Färbelösung für die Zytologie

Diff-Quik Färbeset, gebrauchsfertig⁴¹.

3.1.6.2 Silberfärbung für SDS Gele

Lösung 1 + 8

100% Essigsäure	60,00 ml
Methanol, technisch	250,00 ml
ad 500 ml Aqua dest.	

150 ml von dieser Lösung abnehmen → = **Lösung 8**

zu den restlichen 350 ml

37% Formaldehyd	175,0 µl
-----------------	----------

Hinzugeben → = **Lösung 1**

Lösung 2

99% Ethanol, technisch	250,00 ml
ad 500 ml Aqua dest.	

Lösung 3

Na ₂ S ₂ O ₃ ⁴² (0,8mM)	0,03 g
ad 150 ml Aqua dest.	

Lösung 4 = Lösung 6

Aqua dest.

Lösung 5

Silbernitrat	0,30 g
ad 150 ml Aqua dest.	
+ 37% Formaldehyd	113,0 µl

⁴¹ Henry Schein Vet, Hamburg

⁴² Merck Millipore, Darmstadt

Lösung 7

Na ₂ CO ₃	6,00 g
ad 100 ml Aqua dest.	
+ Lösung 3	2,50 ml
+ 37% Formaldehyd	50,0 µl

Lösung 9

Ethanol, technisch	100,00 ml
100% Glycerin	10,00 ml
ad 500 ml Aqua dest.	

Entfärbelösungen zur Entfärbung von Silbergelatinen

Kaliumferricyanid ⁴³ (30mM)	98,80 mg
ad 10 ml Aqua bidest.	

Na ₂ S ₂ O ₃ ⁴⁴ (100mM)	248,20 mg
ad 10 ml Aqua bidest.	

3.1.6.3 Sensitive Coomassie-Färbung nach Kang et al.

Kolloidale Coomassie Färbelösung

Aluminiumsulfat 14-18 Hydrat ⁴⁵ (5%)	50,00 g
Ethanol (10%)	100,00 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250 ⁴⁶ (0,02%)	200,00 mg
85% Phosphorsäure (8%)	94,12 ml
ad 1000 ml Aqua dest.	

⁴³ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁴⁴ Merck Millipore, Darmstadt

⁴⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁴⁶ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Entfärbelösung für kolloidale Coomassie-Färbung zum Sichtbarmachen der Proteinbanden

85% Phosphorsäure (2%)	9,30 ml
Ethanol (10%)	10,00 ml
ad 100 ml Aqua dest.	

Entfärbelösung zur Entfärbung von Coomassie gefärbten Gelen vor der massenspektrometrischen Analyse

Methanol (50%)	5,00 ml
Essigsäure (12%)	1,20 ml
ad 10 ml Aqua bidest.	

3.1.7 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Anodenpuffer I 0,3 M, pH 10,4

Tris ⁴⁷	36,33 g
Methanol, technisch	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Anodenpuffer II 25mM, pH 10,4

Tris ⁴⁸	3,03 g
Methanol, technisch	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

Kathodenpuffer, pH 9,4

Tris ⁴⁹	3,03 g
e-Aminocaprinsäure	5,25 g
Methanol, technisch	200,00 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

⁴⁷ Serva, Heidelberg

⁴⁸ Serva, Heidelberg

⁴⁹ Serva, Heidelberg

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-S ⁵⁰ (0,2%)	200,00 mg
Trichloressigsäure ⁵¹ (3%)	3,00 g
ad 100 ml Aqua bidest.	

PBS-Tween Lösung (PBS-T)

Tween-20 (0,05%)	500,0 µl
ad 1000 ml PBS.	

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

Polyvinylpyrrolidone (PVP40) ⁵² (1%)	10,00 g
ad 1000 ml PBS-T.	

Enhanced-Chemilumineszenz (ECL) Lösung A

Tris ⁵³ (0,1M)	2,42 g
Luminol ⁵⁴	50,00 mg
ad 200 ml Aqua bidest. pH auf 8,6 einstellen.	
Lagerung bei 4°C.	

ECL Lösung B

Para-Hydroxycoumarinsäure ⁵⁵	110,00 mg
in 100 ml Dimethylsulfoxid lösen.	
Dunkel und bei RT lagern.	

H₂O₂ (30%)

⁵⁰ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁵¹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁵² Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁵³ Serva, Heidelberg

⁵⁴ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁵⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt:

Lösung A	1,00 ml
Lösung B	100,0 µl
H ₂ O ₂	3,0 µl

3.1.8 Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation

Dynabeads Protein G⁵⁶

5M NaCl

NaCl	29,20 g
------	---------

ad 100 ml HPLC-Wasser⁵⁷.

Lysepuffer 2

1M Tris ⁵⁸ -HCl pH 7,4 (50mM)	1,50 ml
5M NaCl (150mM)	300,0 µl
Nonidet P-40 ⁵⁹ (0,5%)	50,0 µl

ad 10 ml HPLC-Wasser⁶⁰.

Kurz vor Gebrauch mit 200 µl Proteaseinhibitor (50 x Complete, EDTA-frei⁶¹) versetzen.

Bissulfosuccinimidyl Suberat (BS3) Puffer

BS3 ⁶² (250mM)	25,00 mg
---------------------------	----------

in 174,7 µl PBS lösen.

⁵⁶ Invitrogen, Karlsruhe

⁵⁷ Merck Millipore, Darmstadt

⁵⁸ Serva, Heidelberg

⁵⁹ Roche, Penzberg

⁶⁰ Merck Millipore, Darmstadt

⁶¹ Roche, Penzberg

⁶² Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Crosslinking-Lösung

250mM BS3⁶³ (5mM) 100,0 µl
ad 5,00 ml PBS.

Quenching-Lösung

1M Tris⁶⁴-HCl pH 7,4 (50mM) 250,0 µl
ad 5,00 ml PBS.

Methanol p.a.

Chloroform

3.1.9 Puffer und Lösungen zur Anreicherung von Oberflächenproteinen

Lösung A

CaCl₂ x 2H₂O (1mM) 147,00 mg
MgCl₂ x 6H₂O (0,5mM) 102,00 mg
ad 1000 ml PBS.
pH auf pH 7,4 einstellen.

Biotinylierungsreagenz

Natrium-(meta)periodat⁶⁵ (1mM) 3,21 mg
Aminoxy-Biotin⁶⁶ (100µM) 7,74 mg
Anilin⁶⁷ (10mM, direkt vor dem Vortexen hinzugeben) 1,37 mg
in 1,5 ml eiskaltem PBS mit 1mM CaCl₂ und 0,5mM MgCl₂ pH 6,7 lösen (Vortex).

⁶³ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁶⁴ Serva, Heidelberg

⁶⁵ Merck Millipore, Darmstadt

⁶⁶ VWR, Ismaning

⁶⁷ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Glycerol

Glycerol (100mM) 9,21 mg
in 1 ml HPLC-Wasser⁶⁸ lösen.

Lösung B

Lösung A
+ 5% FCS⁶⁹

Lysepuffer 3

Nonidet P-40⁷⁰ (1%) 50,0 µl
5M NaCl (150mM) 150,0 µl
50x Complete Proteaseinhibitor (EDTA-frei)⁷¹ 10,0 µl
300mM 2-Jodacetamid⁷² (5mM) 83,3 µl
1M Tris⁷³-HCl pH 7,6 (10mM) 50,0 µl
ad 5 ml HPLC-Wasser⁷⁴.

Lösung C

Lösung A
+ 20% Lysepuffer 3

Strep-Tactin Superflow Beads⁷⁵

Lösung D

Lösung A
+ 0,5% SDS

⁶⁸ Merck Millipore, Darmstadt

⁶⁹ Biochrom AG, Berlin

⁷⁰ Roche, Penzberg

⁷¹ Roche, Penzberg

⁷² GE Healthcare, Freiburg

⁷³ Serva, Heidelberg

⁷⁴ Merck Millipore, Darmstadt

⁷⁵ IBA, Göttingen

Lösung E

Lösung D

+ 100mM DTT⁷⁶

UC Puffer

Harnstoff⁷⁷ (6M) 10,81 g

1M Tris⁷⁸-HCl, pH 8,5 (100mM) 3,00 ml

ad 27 ml HPLC-Wasser⁷⁹.

Lösung F

UC Puffer

+ 50mM 2-Jodacetamid⁸⁰

100mM Na₂CO₃

Na₂CO₃ (100mM) 1,06 g

ad 10 ml HPLC-Wasser⁸¹.

50mM NH₄HCO₃

NH₄HCO₃ 39,53 mg

ad 10 ml HPLC-Wasser⁸².

Trypsin

Trypsin⁸³ (0,5 mg/ml) 0,02 mg

in 40 µl Trypsin-Resuspensionspuffer lösen

⁷⁶ Serva, Heidelberg

⁷⁷ GE Healthcare, Freiburg

⁷⁸ Serva, Heidelberg

⁷⁹ Merck Millipore, Darmstadt

⁸⁰ GE Healthcare, Freiburg

⁸¹ Merck Millipore, Darmstadt

⁸² Merck Millipore, Darmstadt

⁸³ Promega, Mannheim

Lösung G

Trypsin⁸⁴ (2,5 µg) 5,0 µl
 ad 400 µl 50mM NH₄HCO₃.

10x G7 Puffer

Na₂HPO₄ (500mM) 889,95 mg
 ad 10 ml HPLC-Wasser⁸⁵.

Sample Buffer

Trifluoressigsäure⁸⁶ (2%) 300,0 µl
 Acetonitril⁸⁷ (20%) 3,00 ml
 ad 15 ml HPLC-Wasser⁸⁸.

Activation Solution

Acetonitril⁸⁹ (50%) 7,50 ml
 ad 15 ml HPLC-Wasser⁹⁰.

Equilibration Solution = Wash Solution

Trifluoressigsäure⁹¹ (0,5%) 125,0 µl
 Acetonitril⁹² (5%) 1,25 ml
 ad 25 ml HPLC-Wasser⁹³.

⁸⁴ Promega, Mannheim

⁸⁵ Merck Millipore, Darmstadt

⁸⁶ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁸⁷ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁸⁸ Merck Millipore, Darmstadt

⁸⁹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁹⁰ Merck Millipore, Darmstadt

⁹¹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁹² Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁹³ Merck Millipore, Darmstadt

Elution Puffer

Acetonitril⁹⁴ (70%) 3,50 ml
ad 5 ml HPLC-Wasser⁹⁵.

3.1.10 Puffer und Lösungen für In-Solution-Verdau

Ammoniumbicarbonat (ABC) Puffer

ABC (50mM) 3,95 mg
ad 1000 µl HPLC-Wasser⁹⁶.

2% RapiGest Lösung

RapiGest⁹⁷ (2%) 1,00 mg
in 50 µl HPLC-Wasser⁹⁸ lösen.

DTT Puffer

DTT⁹⁹ (100mM) 15,42 mg
in 1000 µl HPLC-Wasser¹⁰⁰ lösen.

Jodacetamid Puffer

2-Jodacetamid¹⁰¹ (300mM) 55,48 mg
in 1000 µl HPLC-Wasser¹⁰² lösen.

⁹⁴ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

⁹⁵ Merck Millipore, Darmstadt

⁹⁶ Merck Millipore, Darmstadt

⁹⁷ Waters, Eschborn

⁹⁸ Merck Millipore, Darmstadt

⁹⁹ Serva, Heidelberg

¹⁰⁰ Merck Millipore, Darmstadt

¹⁰¹ GE Healthcare, Freiburg

¹⁰² Merck Millipore, Darmstadt

3.1.11 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse

Matrix

α -Cyano-4-hydroxycimtsäure ¹⁰³	2,50 mg
Acetonitril ¹⁰⁴ (70%)	700,0 μ l
Trifluoressigsäure ¹⁰⁵ (0,1%)	1,0 μ l
ad 1 ml HPLC-Wasser ¹⁰⁶ .	

Puffer A

Acetonitril ¹⁰⁷ (2%)	20,00 ml
Ameisensäure ¹⁰⁸ (0,1%)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser ¹⁰⁹ .	

Puffer B

Acetonitril ¹¹⁰ (98%)	980,00 ml
Ameisensäure ¹¹¹ (0,1%)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser ¹¹² .	

3.1.12 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenzpuffer (Fluo-Puffer)

BSA	5,00 g
Natriumazid (10%)	500,0 μ l

ad 500 ml PBS.

Bei 4°C lagern.

¹⁰³ Bruker Daltonics, Bremen

¹⁰⁴ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁰⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁰⁶ Merck Millipore, Darmstadt

¹⁰⁷ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁰⁸ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁰⁹ Merck Millipore, Darmstadt

¹¹⁰ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹¹¹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹¹² Merck Millipore, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat Puffer

NaHCO₃ (0,1M) 42,00 g

in 5 l Aqua dest. lösen. Den pH auf 8,0 einstellen.

Biotinylierungspuffer

Biotinamidohexanosäure N-hydroxysuccinimidester¹¹³ 1,00 mg

in 1 ml Dimethylsulfoxid lösen.

3.1.13 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

4',6-Diamidin-2-phenylindol¹¹⁴ (DAPI)

Waschpuffer

PBS-T

Blockierlösung

PBS-T

+ 1% BSA

+ 5% Schafserum

¹¹³ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹¹⁴ Invitrogen, Karlsruhe

3.2 Probenvorbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine periphere Blutleukozyten (PBL)- und Thrombozytenbank erstellt, die insgesamt Blutproben von 58 gesunden Kälbern und 32 gesunden Kühen sowie von zwei an BNP erkrankten Kälbern und 13 BNP-Überträgerkühen umfasst. Die Blutproben stammen zum Teil von rekonvaleszenten Kälbern, die nie Anzeichen von Blutungsstörungen gezeigt hatten. Diese wurden in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität in München entnommen. Die Blutproben der anderen gesunden Kälber stammen von Tieren, die dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim gehörten. Die Proben der zwei an BNP erkrankten Kälber wurden uns freundlicherweise von der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität in München zur Verfügung gestellt. Die BNP wurde bei den beiden Kälbern anhand der festgelegten Kriterien, Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Knochenmarksdepletion, diagnostiziert (Friedrich et al., 2009, Pardon et al., 2010, Sauter-Louis et al., 2012). Zwanzig Kühe stammten aus einem bayerischen Milchviehbetrieb und wurden mindestens zweimal mit dem inaktivierten Impfstoff PregSure BVD immunisiert. Zehn dieser Tiere hatten im Vorfeld mindestens ein an BNP erkranktes Kalb zur Welt gebracht, die Proben der anderen zehn Kühe wurden als Kontrollen eingesetzt. Die restlichen Blutproben von Kühen wurden im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim entnommen. Die verwendeten Serumproben stammten ebenfalls von diesen Tieren. Kolostren wurden von insgesamt 17 BNP-Überträgern sowie von 30 Kontrollkühen gewonnen. Sowohl die Serumproben, als auch die Kolostrumproben stammen aus verschiedenen Betrieben und wurden von den Besitzern zur Verfügung gestellt.

Alle Spendertiere waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung klinisch gesund. Die Kühe erhielten des Weiteren zur peripartalen Zeit keine Medikation und die Neugeborenen wurden auf natürlichem Weg entwickelt. Die Blutprobenentnahme von gesunden Rindern auf landwirtschaftlichen Betrieben ist bei der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer: AZ 55.2-1-54-2532.3-22-12 angezeigt.

3.2.1 Gewinnung der Blutproben

Thrombozyten und PBL wurden aus Vollblutproben von 103 gesunden Rindern gewonnen. Die Kälber waren zwischen zwei Tagen und sieben Wochen alt und die Kühe im Alter von drei bis sieben Jahren. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch gesund und erhielten keine Medikation.

Den Rindern wurde nach Desinfektion der Injektionsstelle etwa 40 – 60 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen. Je nach weiterer Präparation wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:10 mit einer 4%igen Natrium-Citrat-Lösung (siehe Kapitel 3.1.1) versetzt oder in Serumprobenröhrchen¹¹⁵ abgefüllt. Die Blutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei RT gelagert.

3.2.2 Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut

Zu je 9 ml des mit Natrium-Citrat versetzten Blutes wurde 1 ml auf 38°C erwärmte ACD Lösung hinzugegeben und anschließend bei RT und 300 rcf für 20 Minuten (min) zentrifugiert. Daraufhin wurde das plättchenreiche Plasma abgenommen und in ein neues Röhrchen¹¹⁶ überführt. Das plättchenreiche Plasma wurde anschließend bei RT und 1000 rcf für 5 min zentrifugiert. Daraufhin setzten sich die Thrombozyten als Pellet ab. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml modifizierter Tyrode-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl ACD Lösung wurde das Pellet zweimal mit insgesamt 10 ml modifizierter Tyrode-Lösung gewaschen und zwischen den Waschschritten jeweils bei RT und 1000 rcf für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen wurden die Thrombozyten in modifizierter Tyrode-Lösung resuspendiert und gezählt. Zum Schluss wurden die Zellen bei RT und 10000 rcf für 2 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden daraufhin mit Lysepuffer 1 versetzt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

¹¹⁵ Sarstedt, Nürnberg

¹¹⁶ Sarstedt, Nürnberg

3.2.3 Gewinnung von PBL aus Vollblut mittels Erythrozytenlyse

Das mit Natrium-Citrat versetzte Blut wurde in einem Verhältnis von 1:3 mit PBS verdünnt. Nach Zentrifugation (RT, 500 rcf, 20 min, ohne Bremse) wurde der Überstand bis auf etwa 0,5 bis 1 ml abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde daraufhin in 10 ml 4°C kaltem ACK-Puffer resuspendiert und 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in ein 50 ml Probenröhrchen¹¹⁷ mit 30 ml PBS überführt und zentrifugiert (RT, 500 rcf, 10 min, ab hier immer mit eingeschalteter Bremse). Das Pellet wurde erneut mit 10 ml ACK-Puffer versetzt, inkubiert und gewaschen (RT, 500 rcf, 10 min). Anschließend wurde das Pellet in kaltem PBS resuspendiert, zweimal mit PBS gewaschen (RT, 500 rcf, 10 min) und nach dem letzten Waschschrift erneut in kaltem PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Die resuspendierten Zellen wurden dann entweder für die Oberflächenbiotinylierung, beziehungsweise für die Durchflusszytometrie verwendet oder abzentrifugiert (4°C, 500 rcf, 10 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert (in Lysepuffer 1 gelöst oder als Pellet).

3.2.4 MDBK-Zellen

MDBK-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Falko Steinbach, Veterinary Laboratories Agency - Weybridge New Haw, Addlestone, Großbritannien) wurden in RPMI 1640 Medium¹¹⁸, angereichert mit 10% FCS¹¹⁹ und 1% Pen/Strep¹²⁰ (siehe Kapitel 3.1.2), bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator¹²¹ kultiviert. Zum Ablösen der MDBK-Zellen wurden verbleibende Mediumreste in den Zellkulturflaschen¹²² durch Spülen mit lauwarmem PBS entfernt, die Zellen mit

¹¹⁷ Sarstedt, Nürnberg

¹¹⁸ Invitrogen, Karlsruhe

¹¹⁹ Biochrom, Berlin

¹²⁰ Biochrom, Berlin

¹²¹ Heraeus Instruments, München

¹²² Sarstedt, Nürnberg

Trypsin/EDTA¹²³ bei 37°C 10 min inkubiert, in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen (4°C, 500 rcf, 10 min). Das entstandene Zellpellet wurde in kaltem PBS resuspendiert und die Suspension zum Zählen der Zellen und zur Herstellung zytologischer Präparate verwendet. Für die Lyse der Zellen und für die Proteinexpressionsanalyse mittels Massenspektrometrie wurden die Zellen erneut pelletiert und direkt weiter verarbeitet.

3.2.5 Zählung der gewonnenen Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden je 10 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau¹²⁴ vermischt und 10 µl von dem Gemisch in eine Neubauer-improved Zählkammer¹²⁵ gegeben.

Zur Bestimmung der Zellzahl von PBL und MDBK wurden innerhalb der 25 Gruppenquadrate jeweils die Zellen aus fünf diagonal angeordneten Gruppenquadraten gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurde diese Anzahl Zellen mit 5×10^4 und aufgrund der Verdünnung mit Trypanblau zusätzlich mit 2 multipliziert. Dementsprechend wurde die Zellzahl wie folgt berechnet: Gezählte Zellen $\times 5 \times 10^4 \times 2 =$ Zellzahl pro ml.

Zur Bestimmung der Anzahl von Thrombozyten wurde eines der 25 Gruppenquadrate ausgezählt. Demzufolge ergab sich die Anzahl durch folgende Berechnung: Gezählte Zellen $\times 25 \times 10^4 \times 2 =$ Zellzahl pro ml.

3.2.6 Membranproteinpräparation

Zur Isolierung der membranständigen Proteinfraktion aus Thrombozyten und PBL wurden zum entsprechenden Zellpellet je 800 µl Puffer A (siehe Kapitel 3.1.3) und 20 µl 50x Proteaseinhibitor (Complete, EDTA-frei¹²⁶) hinzugegeben. Nach Zerkleinerung der Zellen durch Vortexen und mehrmaliges Aufziehen und Auslassen durch eine 21 Gauge Kanüle¹²⁷, wurden die Proben bei 4°C und 15700 rcf für 30 min zentrifugiert

¹²³ Biochrom, Berlin

¹²⁴ Biochrom, Berlin

¹²⁵ NeoLab, Heidelberg

¹²⁶ Roche, Penzberg

¹²⁷ Roth, Karlsruhe

und der Überstand abgenommen. Erfolgte eine unzureichende Zerkleinerung, wurden die Proben vor dem Zentrifugationsschritt in den QIAshredder Zellysat Homogenisator¹²⁸ überführt und bei RT und 16100 rcf für 2 min zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde in 800 µl Puffer B gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut bei 4°C und 15700 rcf für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dieser Inkubationsschritt wiederholt. Daraufhin wurde das Pellet in 800 µl Puffer C resuspendiert und ebenfalls bei 4°C und 15700 rcf für 30 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet vorsichtig und unter Sichtkontrolle (damit das Pellet sich nicht von der Gefäßwand löst und versehentlich verloren geht) mit 1 ml Aqua bidest. gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert oder mit Lysepuffer 1 versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.7 Aufbereitung des Impfstoffs PregSure BVD

Proteinpräzipitation mittels Aceton

Da der Impfstoff in löslicher Form vorlag, wurden die enthaltenen Proteine über Nacht bei -20°C mit Aceton präzipitiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (4°C, 15000 rcf, 20 min), das daraus resultierende Pellet in Aqua bidest. gelöst und zur späteren Auftrennung mittels 1D SDS-PAGE weiterverarbeitet.

Proteinfällung mittels Hexan/Ether Lösung

Für die IP wurde 1 ml des Impfstoffs mit 4 ml eiskaltem Aceton versetzt und zwei Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 15000 rcf, 1 min) wurde der Überstand abgenommen, das entstandene Pellet in einer 3:5 n-Hexan/Ether Lösung gelöst und anschließend erneut zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.2.8 Aufbereitung von Zellen für die PAGE

Zur späteren Auftrennung der Proteine in der 1D und 2D Gelelektrophorese wurden die Proteine der verschiedenen Proben durch Zugabe von Lysepuffer 1 gelöst. Je

¹²⁸ Qiagen, Hilden

nach Größe der Pellets wurden die Thrombozyten-, PBL- oder Membranpräparationen mit 200 µl bis 1,5 ml Lysepuffer 1 gelöst. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.9 Aufbereitung der Proben für die IP

Für die IP wurden Pellets von PBL, MDBK und gefältem PregSure BVD je nach Größe in 300 µl bis 1,5 ml Lysepuffer 2 (siehe Kapitel 3.1.8) gelöst. Daraufhin wurden die Proben bei 4°C für eine Stunde langsam auf einem Rotationsrad inkubiert und anschließend bei 4°C und 16100 rcf für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß¹²⁹ überführt und bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss verarbeitet.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate

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

Zur Bestimmung wurden 5 µl der Probe in je zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte¹³⁰ pipettiert. Die Eichkurve wurde anhand eines 0,4%igen BSA Standards erstellt und in Konzentrationen von 0 (Negativkontrolle), 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 mg/ml gemessen. Nachdem in jede zu bestimmende Vertiefung 250 µl Bradford-Reagenz¹³¹ zugefügt wurden, folgte eine 10 minütige Inkubation bei RT. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Dazu diente ein vollautomatisch arbeitendes, Mikroprozessor gesteuertes Lesegerät¹³². Die

¹²⁹ Sarstedt, Nürnberg

¹³⁰ Sarstedt, Nürnberg

¹³¹ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹³² Tecan, Crailsheim

Nettoabsorption der Probe wurde aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung und Abzug der Negativkontrolle berechnet. Anhand der Eichgerade ließ sich anschließend die Proteinkonzentration bestimmen und entsprechend der verwendeten Probenmenge berechnen.

3.4 SDS-PAGE

3.4.1 2D Gelelektrophorese

Das Prinzip der 2D PAGE beruht auf der Auftrennung von komplexen Proteingemischen nach dem pI , also nach dem für jedes Protein charakteristischen pH-Wert, bei dem die Summe seiner Ladungen null entspricht, und dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine. Das daraus resultierende Proteinmuster ist einzigartig für jede biologische Probe.

Bei der Auftrennung nach dem pI in der ersten Dimension wandern saure und basische Proteine in einem elektrischen Feld an eine bestimmte Stelle im Trärgel. Die Auftrennung nach der Molekülmasse erfolgt in der zweiten Dimension, wobei große Proteine im Verlauf der Elektrophorese weniger weit wandern als kleine. Somit ergibt sich im fertigen Gel eine Proteinverteilung bei der sich große, saure Proteine oben links und kleine, basische Proteine unten rechts befinden.

3.4.1.1 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Proteine aus lysierten Thrombozyten und PBL wurden mittels Rehydrierung auf ein Trärgel (Immobiline DryStrip pH 3-11¹³³ NL (IPG-Strip), 11 cm) übertragen, indem die Proben mit Lysepuffer 1 zu einem konstanten Volumen aufgefüllt und mit Pharmalyte¹³⁴, einer Trägersubstanz für die isoelektrische Fokussierung (IEF), versetzt wurden. Zudem wurde Bromphenolblau¹³⁵ (siehe Kapitel 3.1.5) als Indikator zugegeben.

Die Lösung wurde im Thermomixer bei 23°C und 1200 rpm für 10 min gemischt und anschließend zu je 210 µl in die Vertiefungen einer Quellkammer (= Reswelling Tray)

¹³³ GE Healthcare, Freiburg

¹³⁴ GE Healthcare, Freiburg

¹³⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

verteilt. Die IPG-Strips¹³⁶ wurden dann, unter Vermeidung von Luftblasenbildung, mit der Gelfläche nach unten auf die Rehydrierungslösung aufgelegt und vorsichtig mit entgastem Paraffinöl überschichtet, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs aus dem Puffer zu vermeiden. Nach einer Quellzeit von mindestens 5 Stunden erfolgte die IEF in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit¹³⁷. Die rehydrierten IPG-Strips¹³⁸ wurden dabei mit der Gelseite nach oben so in eine der Vertiefungen auf dem Streifenhalter positioniert, dass die saure Seite zur Kathode und die basische Seite zur Anode zeigte und anschließend großzügig mit entgastem Paraffinöl überschichtet. Die IEF lief über 18 Stunden mit folgenden Einstellungen am Amersham EPS 3501 XL Electrophoresis Power Supply¹³⁹:

Stufe 1:	2h / 150V / 2mA / 5W
Stufe 2:	3h / 300V / 2mA / 5W
Stufe 3:	13h / 1000V / 2mA / 5W

Nach Ablauf der IEF wurden die IPG-Strips¹⁴⁰ entweder direkt für die zweite Dimension vorbereitet oder zur späteren Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.4.1.2 SDS PAGE (zweite Dimension)

SDS Gele, bestehend aus einem Abdichtgel, auf das das Laufgel (10% SDS Gel) geschichtet wurde, wurden in einem Serva BlueVertical 102 Elektrophoresesystem¹⁴¹ gegossen. Während die Gele aushärteten, wurden die IPG-Strips¹⁴² jeweils zehn Minuten in Lösung 1 und Lösung 2 äquilibriert. Um überschüssigen Puffer zu entfernen, wurden die IPG-Strips¹⁴³ nach der Äquilibration kurz in Aqua bidest.

¹³⁶ GE Healthcare, Freiburg

¹³⁷ GE Healthcare, Freiburg

¹³⁸ GE Healthcare, Freiburg

¹³⁹ GE Healthcare, Freiburg

¹⁴⁰ GE Healthcare, Freiburg

¹⁴¹ Serva, Heidelberg

¹⁴² GE Healthcare, Freiburg

¹⁴³ GE Healthcare, Freiburg

gewaschen, dann auf das Gel passend zugeschnitten und vorsichtig unter Vermeidung von Luftblaseneinschlüssen auf das SDS Gel aufgelegt. Die IPG-Strips¹⁴⁴ wurden schließlich luftdicht mit Agarose¹⁴⁵ überschichtet.

Die Elektrophorese lief bei 4°C und unter Sichtkontrolle mit folgenden Einstellungen am BP 500 Plus Power Supply¹⁴⁶:

Stufe 1: 30 min / 60 V / 80 mA / 1 W

Stufe 2: 3 h / 175 V / 120 / mA / 10 W

Nachdem die Bromphenolblaufront das Abdichtgel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele entweder gefärbt (Silber oder kolloidales Coomassie) oder geblottet.

3.4.2 1D Gelelektrophorese

Bei der 1D Gelelektrophorese werden die Proteine entsprechend der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970) nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei laufen Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit in das Gel ein. Dementsprechend liegen größere Moleküle im Gel weiter oben und kleinere Moleküle weiter unten. Die verwendeten Gele wurden in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer¹⁴⁷ in einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm gegossen. Zur Auspolymerisierung der Gele wurden direkt vor dem Gießen jeweils noch 50 µl 10% APS und 20 µl TEMED zugefügt.

Unmittelbar nach dem Einfüllen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu gewährleisten und um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol

¹⁴⁴ GE Healthcare, Freiburg

¹⁴⁵ Invitrogen, Karlsruhe

¹⁴⁶ Serva, Heidelberg

¹⁴⁷ BioRad, München

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 Probenaschen in das noch flüssige Sammelgel eingefügt.

Die jeweiligen Proben wurden mit Laemmli-Puffer in einem Endverhältnis von 1:3 verdünnt. Membranproteinpräparationen wurden daraufhin für 30 min bei RT inkubiert, die anderen Proben wurden bei 95°C für 5 min im Thermomixer (750 rpm) erhitzt. Zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine im Gel wurden in eine der Probenaschen 7 µl PageRuler Prestained Protein Ladder¹⁴⁸ gegeben und in die restlichen Taschen jeweils das der gewünschten Proteinmenge entsprechende Volumen der einzelnen Proben. Nach dem Überführen der Gele in die Elektrophoresekammern und Befüllen mit Elektrophoresepuffer wurden die Kammern an das Power Pac Basic Power Supply¹⁴⁹ angeschlossen.

Die Proben liefen bei RT mit 12,5 mA pro Gel in das Sammelgel ein und nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Amperezahl schrittweise um je 10 mA bis auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am unteren Gelrand angekommen war.

3.4.3 Färbung von SDS-Gelen

3.4.3.1 Qualitative Silberfärbung

Anhand der Silberfärbung lassen sich Proteine mit einer Sensitivität von 0,3 – 10 ng qualitativ beurteilen (Switzer et al., 1979).

Die Gele wurden langsam schüttelnd durch schrittweise Inkubation in neun verschiedenen Lösungen gefärbt (siehe Kapitel 3.1.6). Dabei wurden die Lösungen durch die jeweils nachfolgende ersetzt. Zuerst wurden die Gele durch zweimalige Inkubation für 20 min in Lösung 1 fixiert. Daraufhin wurden sie dreimal für je 10 min in Lösung 2 inkubiert. Nach anschließender Inkubation für zwölf Sekunden (sec) in Lösung 3, wurden die Gele zweimal kurz in Aqua bidest. gewaschen. Die

¹⁴⁸ Thermo Fisher Scientific, Bonn

¹⁴⁹ BioRad, München

Silberimprägnierung erfolgt durch eine Inkubationszeit von 20 min in Lösung 5. Nach erneutem Waschen in Aqua bidest. wurden die Proteine anhand von Lösung 7 sichtbar gemacht. Die Inkubationszeit war hier variabel und die Färbereaktion musste rechtzeitig durch Lösung 8 abgestoppt werden. In Lösung 8 inkubierten die Gele für mindestens 10 min, bevor sie durch die anschließende Inkubation für 20 min in Lösung 9 konserviert wurden.

3.4.3.2 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang et al.

Diese Methode der kolloidalen Coomassie-Färbung ermöglicht die quantitative Beurteilung von Proteinen mit einer Sensitivität von 1 ng Protein (Kang et al., 2002). Anschließend an die Gelelektrophorese wurden die Gele dreimal 10 min in Aqua bidest. gewaschen. Daraufhin wurden sie über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Aqua bidest. für je 10 min wurden die Gele je nach Intensität des entstandenen Hintergrundes in Entfärbelösung zur Sichtbarmachung der Proteinbanden inkubiert. Zuletzt wurden die Gele in Aqua bidest. gewaschen.

3.4.3.3 Konservierung gefärbter Gele

Die Gele wurden zur Aufbewahrung falten- und luftblasenfrei zwischen zwei großzügig befeuchteten Zellglasbögen¹⁵⁰ ausgestrichen. Diese trockneten in einen Plastikrahmen eingespannt für mindestens 24 Stunden bei 4°C und wurden darauffolgend für mindestens 24 Stunden bei RT gelagert. Nach Entfernung des Rahmens wurden die überhängenden Zellophanreste entfernt und die Gele bis zur weiteren Verwendung in Klarsichtfolien aufbewahrt. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die entsprechenden Spots oder Banden aus den Gelen ausgeschnitten, entfärbt und einem In-Gel-Verdau unterzogen (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2).

¹⁵⁰ DETI, Meckesheim

3.4.4 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran¹⁵¹ transferiert. Beim Semi-dry-Elektroblotting mittels Blue Flash-L Elektroblogger¹⁵² werden die Proteine durch ein diskontinuierliches Puffersystem überführt. Nachdem die Blotpapiere¹⁵³ und die PVDF-Membran¹⁵⁴ auf die Größe des Gels zugeschnitten wurden, wurden diese auf der Anoden-Graphitplatte des Elektroblogger übereinander geschichtet. Zuerst wurden zwei Blotpapiere¹⁵⁵ in Anodenpuffer I (siehe Kapitel 3.1.7) getränkt und störende Luftblasen zwischen den Papieren mit einer Glaspipette ausgestrichen. Darauf wurde ein in Anodenpuffer II getränktes Blotpapier¹⁵⁶ geschichtet und erneut eventuell eingeschlossene Luftblasen zwischen den Lagen ausgestrichen. Anschließend wurde die in Methanol und Aqua dest. getränkte PVDF-Membran¹⁵⁷ aufgelegt und darauf das SDS-Gel platziert. Zuletzt wurden drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blotpapier¹⁵⁸ darauf geschichtet und erneut die Luftblasen ausgestrichen. Nach dem Aufsetzen der Kathoden-Graphitplatte wurde der Elektroblogger an ein BP 500 Plus Power Supply¹⁵⁹ angeschlossen und die Proteine mit einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² Gel innerhalb von 40 min auf die Membran transferiert.

3.4.5 Überprüfung des Proteintransfers mittels Ponceau-Färbung

Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran¹⁶⁰ zu überprüfen, wurde die Membran 10 min in Ponceau-Färbelösung inkubiert. Die Ponceau-Färbung hat eine

¹⁵¹ GE Healthcare, Freiburg

¹⁵² Serva, Heidelberg

¹⁵³ Roth, Karlsruhe

¹⁵⁴ GE Healthcare, Freiburg

¹⁵⁵ Roth, Karlsruhe

¹⁵⁶ Roth, Karlsruhe

¹⁵⁷ GE Healthcare, Freiburg

¹⁵⁸ Roth, Karlsruhe

¹⁵⁹ Serva, Heidelberg

¹⁶⁰ GE Healthcare, Freiburg

Sensitivität von 250 – 500 ng Protein (Salinovich und Montelaro, 1986). Die Proteinbanden wurden durch Entfernen der Hintergrundfärbung durch dreimaliges Waschen in Aqua bidest. sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die komplette Entfärbung der Membran durch Waschen mit PBS-T.

3.4.6 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 1D Membranen in Streifen geschnitten, die 2D Membranen blieben vollständig. Daraufhin wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert (Kolostrum oder Serum von Kühen in einer Verdünnung von 1:700000 in PBS-T für die 2D Blots und 1:1000 für die 1D Blots). Nach erneutem Waschen der Membranen für dreimal 10 min mit PBS-T, erfolgte die Inkubation entweder mit einem Peroxidase (POD)-konjugierten Kaninchen anti-bovinem IgM μ -Kette oder einem POD-konjugierten Kaninchen anti-bovinem IgG-F(c)¹⁶¹ jeweils in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-T für 1 Stunde bei RT. Überschüssiger, nicht gebundener sekundärer Antikörper wurde durch sechs Waschschritte á 10 min mit PBS-T entfernt. Die Lumineszenz der POD-markierten Proteine wurde anhand ECL detektiert. Dafür wurden die Membranen 2 min bei RT in der frisch angesetzten ECL-Lösung (siehe Kapitel 3.1.7) inkubiert und in eine Röntgenkassette eingelegt. Die Röntgenfilme (Euromed Plus green sensitive¹⁶²) wurden je nach Intensität der Signale zwischen 15 sec und 15 min belichtet und anschließend entwickelt.

Die Blotmembranen wurden nach Entfernen der ECL-Lösung durch Waschen in Aqua bidest. getrocknet und in Klarsichtfolien aufbewahrt.

¹⁶¹ BioMol GmbH, Hamburg

¹⁶² Christiansen, Planegg

3.5 Immunpräzipitation

3.5.1 Präzipitation von Proteinen

Bei der IP wurden Antikörper aus dem Kolostrum von Kühen gewonnen, indem deren Fc-Regionen an Protein G beschichtete magnetische Beads gebunden wurden. Daraufhin ließen sich diejenigen Proteine, für die die kolostralen Antikörper spezifisch waren, aus verschiedenen Proben anreichern. Dazu wurden 100 µl Dynabeads Protein G¹⁶³ in Reaktionsgefäße¹⁶⁴ überführt und dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Die magnetische Fixierung der Beads an die Wand des Reaktionsgefäßes¹⁶⁵ in einem dafür vorgesehenen Ständer mit Magneten ermöglichte eine problemlose Entfernung der Überstände zwischen den Waschschritten. Die abschließend in 500 µl PBS suspendierten Beads wurden dann 1 Stunde bei 4°C auf einem Rotationsrad mit einem 10 µg IgG entsprechenden Volumen an BNP-Überträgerkolostrum oder als Negativkontrolle mit dem Kolostrum einer gesunden Kuh inkubiert. Als weitere Negativkontrolle diente eine Inkubation mit 10 µg gereinigtem bovinem IgG¹⁶⁶. Anschließend wurden die Beads einmal mit 500 µl PBS wie oben beschrieben gewaschen und durch Inkubation mit 300 µl Crosslinking-Lösung für 2 Stunden bei 4°C die Bindung der schweren und leichten Ketten der Antikörper an die Oberfläche der Beads verstärkt. Die Reaktion wurde durch Inkubation der Beads mit 500 µl Quenching-Lösung für eine Stunde bei 4°C gestoppt. Nach einem erneuten Waschschriff mit 200 µl PBS wurden die Beads über Nacht mit je 1 mg Proteinlysate (entsprechendes Volumen) bei 4°C inkubiert, um spezifische Proteine zu binden. Danach wurden die Beads einmal mit 200 µl PBS gewaschen und nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß¹⁶⁷ in 50 µl 2x Laemmli-Puffer resuspendiert. Durch Erhitzen für 15 min bei 70°C wurden die

¹⁶³ Invitrogen, Karlsruhe

¹⁶⁴ Sarstedt, Nürnberg

¹⁶⁵ Sarstedt, Nürnberg

¹⁶⁶ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁶⁷ Sarstedt, Nürnberg

Proteine von den Beads eluiert und zuletzt der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß¹⁶⁸ überführt.

3.5.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Zu 40 µl des Eluats wurden 160 µl Methanol hinzugefügt und die Mischung vorsichtig gevortext. Daraufhin wurden die Proben kurz bei RT und 9000 rcf für 1 min abzentrifugiert und mit 40 µl Chloroform versetzt. Die Probe wurde erneut vorsichtig gevortext und abzentrifugiert (RT, 9000 rcf, 1 min). Anschließend wurden 120 µl HPLC-Wasser¹⁶⁹ hinzugefügt und stark gevortext, bis die Lösung milchig wurde. Die Proben wurden bei RT und 9000 rcf 2 min zentrifugiert, wodurch sich eine proteinhaltige Interphase bildete. Der Überstand wurde bis etwa 2 mm über der Interphase abgenommen und verworfen. Nach Zugabe von 120 µl Methanol und Vortexen wurden die Proben erneut zentrifugiert (RT, 15000 rcf, 2 min). Der Überstand wurde vorsichtig unter Sichtkontrolle entfernt und das weiße, flockige Präzipitat bis zur vollständigen Verflüchtigung des Methanols unter dem Abzug gelagert. Daraufhin wurde entweder direkt mit dem In-Solution-Verdau (siehe Kapitel 3.7.3) und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Peptide begonnen oder die Präzipitate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Anreicherung von Oberflächenproteinen

3.6.1 Biotinylierung der Oberflächenproteine

Für die Proteinexpressionsanalyse und die Beschreibung des Oberflächenproteoms wurden Proteine der Plasmamembran von frisch präparierten Thrombozyten, PBL und MDBK-Zellen angereichert. Dafür wurden jeweils 2×10^6 Zellen zweimal mit 10 ml eiskalter Lösung A (siehe Kapitel 3.1.9) gewaschen (4°C, 500 rcf, 10 min). Anschließend wurden die entstandenen Zellpellets in 100 µl Biotinylierungsreagenz mit je 77,4 µg Biotin resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln über Kopf

¹⁶⁸ Sarstedt, Nürnberg

¹⁶⁹ Merck Millipore, Darmstadt

rotierend inkubiert. Die Biotinylierung wurde durch fünfminütige Inkubation mit Glycerol in einer Endkonzentration von 1mM bei 4°C gestoppt. Die Zellen wurden schließlich einmal mit Lösung B und einmal mit Lösung A gewaschen (4°C, 400 rcf, 10 min).

3.6.2 Anreicherung der Zelloberflächenproteine

Die gewaschenen Pellets aus Kapitel 3.6.1 wurden in 250 µl Lysepuffer 3 resuspendiert und die Proteinstruktur durch Inkubation bei 4°C für 30 min über Kopf rotierend zerstört. Im Anschluss an diesen Schritt wurden die Lysate bis zur weiteren Präparation bei -20°C gelagert. Nachdem die Lysate wieder aufgetaut waren, folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 2800 rcf und 16000 rcf bei 4°C für je 10 min, wobei die Überstände jeweils in neue Reaktionsgefäße¹⁷⁰ überführt wurden. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis von 1:5 mit Lösung A verdünnt. 100 µl Strep-Tactin Superflow Beads¹⁷¹ wurden mit Low Retention Pipettenspitzen¹⁷² in LoBind Reaktionsgefäße¹⁷³ pipettiert, kurz invertiert und dreimal mit 1 ml Lösung C gewaschen (RT, 1000 rcf, 1 min). Zur Bindung der Biotin-markierten Oberflächenproteine an die Streptavidin-beschichteten Beads wurden die Proben auf die gewaschenen Beads gegeben und bei 4°C für 90 min langsam über Kopf rotierend inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte, einmal mit 600 µl Lösung C und einmal mit 600 µl Lösung D, (RT, 1000 rcf, 1 min). Daraufhin wurden die Proben bei RT für 20 min mit Lösung E inkubiert und erneut abzentrifugiert (RT, 1000 rcf, 1 min). Nach dem Waschen mit 600 µl UC Puffer wurden die Proben mit 600 µl Lösung F bei RT für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (RT, 1000 rcf, 1 min) wurden die Proben fünfmal mit je 600 µl der folgenden Lösungen in gegebener Reihenfolge gewaschen: UC Puffer, 5M NaCl, 100mM Na₂CO₃, Lösung A und HPLC-Wasser¹⁷⁴ (RT, 1000 rcf, 1 min).

¹⁷⁰ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

¹⁷¹ IBA, Göttingen

¹⁷² Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

¹⁷³ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

¹⁷⁴ Merck Millipore, Darmstadt

3.6.3 Proteinextraktion

Die Beads wurden über Nacht bei 37°C mit 400 µl Lösung G verdaut. Das Enzym Trypsin spaltet Proteine an der Peptidbindung nach Arginin und Lysin, und so entstehen genau definierte Proteinfragmente. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (RT, 1000 rcf, 1 min) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße¹⁷⁵ überführt (= Überstand 1). Daraufhin wurden die Beads mit 400 µl 50mM NH₄HCO₃-Lösung gewaschen, abzentrifugiert und mit Überstand 1 zusammengeführt. Die Beads wurden erneut dreimal gewaschen (400 µl Lösung A, 400 µl HPLC-Wasser¹⁷⁶ und 200 µl 1x G7 Puffer; RT, 1000 rcf, 1 min), und die Überstände dekantiert. Anschließend folgte die Spaltung N-glykosidischer Bindungen mittels Verdau durch 500 Einheiten Glycerol-freie PNGase F¹⁷⁷ in 200 µl 1x G7 Puffer für fünf Stunden bei 37°C. Die Proben wurden zentrifugiert (RT, 1000 rcf, 1 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt (= Überstand 2). Nach dem letzten Waschen der Beads mit 200 µl 1x G7 Puffer, wurde der Überstand mit Überstand 2 zusammengeführt.

3.6.4 Aufreinigung und Konzentration der Peptide mittels PepClean Säulen

Die abgespaltenen Peptide wurden mittels Pierce PepClean C18 Spin Columns¹⁷⁸ gereinigt und konzentriert. Diese Säulen enthalten ein C-18 Granulat, an das die Peptide binden um später konzentriert und gereinigt eluiert werden zu können. Die Säulen wurden in ein LoBind Reaktionsgefäß¹⁷⁹ platziert und zwischen den folgenden Schritten bei RT und 1500 rcf für 30 sec zentrifugiert. Zuerst wurden die Proben in einem Verhältnis von 3:4 mit Sample Buffer verdünnt und die Säulen durch viermaliges Waschen mit je zweimal 200 µl Activation Solution und zweimal 200 µl Equilibration Solution vorbereitet. Die Proben wurden anschließend auf die Säulen

¹⁷⁵ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

¹⁷⁶ Merck Millipore, Darmstadt

¹⁷⁷ New England Biolabs, Frankfurt/Main

¹⁷⁸ Thermo Fisher Scientific, Bonn

¹⁷⁹ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

überführt, durch die Matrix zentrifugiert und dies mit dem Durchfluss wiederholt. Daraufhin wurden die Säulen zweimal mit 200 µl Wash Solution gewaschen und in ein neues LoBind Reaktionsgefäß¹⁸⁰ gestellt. Im Anschluss wurden die Peptide durch zweimaliges Waschen mit je 20 µl Elution Buffer eluiert. Anschließend wurden die Proben einem In-Solution-Verdau (siehe Kapitel 3.7.3) unterzogen und massenspektrometrisch analysiert.

3.7 Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie

3.7.1 Entfärben von SDS-Gelen und Verdau der Proteine

Spots und Banden, die massenspektrometrisch analysiert werden sollten, wurden mit einem Skalpell¹⁸¹ aus den gefärbten Gelen ausgeschnitten. Die Zellglasbögen¹⁸², zwischen denen die Gele aufbewahrt wurden, konnten dabei nach der Rehydrierung der Gelstücke in je 100 µl Aqua bidest. entfernt werden.

3.7.1.1 Entfärbung der Silber gefärbten Gele

Die Silber gefärbten Gele wurden mit einer 30mM Kaliumferricyanid-Lösung und einer 100mM Natriumthiosulfat-Lösung entfärbt. Die Lösungen wurden vor dem Gebrauch frisch hergestellt und zu gleichen Teilen gemischt. Daraufhin wurden je 100 µl der Entfärbelösung in eine 96-Loch-Polystyrol-Platte¹⁸³ gegeben und die Gelstücke bis zur sichtbaren Entfärbung inkubiert. Die Lösung wurde durch sechs Waschschriffe entfernt: einmal für eine Minute und zweimal für 5 min in HPLC-Wasser¹⁸⁴ sowie dreimal für je 15 min in 40% Acetonitril¹⁸⁵.

¹⁸⁰ Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

¹⁸¹ NeoLab, Heidelberg

¹⁸² DETI, Meckesheim

¹⁸³ Nunc, Wiesbaden

¹⁸⁴ Merck Millipore, Darmstadt

¹⁸⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.7.1.2 Entfärbung der Coomassie gefärbten Gele

Die mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gele wurden mit der entsprechenden Entfärbelösung für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse entfärbt. Dafür wurden die Gelstücke je nach Proteinkonzentration für mindestens 30 min in der Entfärbelösung inkubiert und anschließend dreimal 15 min in Aqua bidest. gewaschen.

3.7.2 In-Gel-Verdau

Die Proteine aus den entfärbten Gelen wurden mit Trypsin verdaut, welches Peptide an der Peptidbindung nach Arginin und Lysin spaltet, wodurch genau definierte Proteinfragmente entstehen. Zu diesem Zweck wurde Trypsin¹⁸⁶ 1:50 mit einer 1mM Tris-HCl-Lösung (pH 9,5) verdünnt (entspricht 0,5 µg/µl) und die Gelstücke je nach Proteinkonzentration mit bis zu 10 µl Trypsin-Lösung über Nacht bei 37°C verdaut.

3.7.3 In-Solution-Verdau

Die Präzipitate aus der IP wurden in 30 µl ABC Puffer (siehe Kapitel 3.1.10) resuspendiert und nach Zugabe von 3 µl RapiGest¹⁸⁷ und 2 µl DTT Puffer bei 60°C für 10 min unter Schütteln in einem Thermoshaker inkubiert. Daraufhin kühlten sie etwa 5 min auf RT ab und es wurde 1 µl Jodacetamid Puffer hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen folgte eine Inkubation bei RT für 30 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Proteine je nach Proteinkonzentration mit bis zu 5 µg Trypsin über Nacht bei 37°C verdaut.

3.7.4 Ansäuern der Peptide

Die Peptide wurden am nächsten Tag durch Hinzufügen von 2 µl konzentrierter HCl (32%) angesäuert und bei RT für 10 min im Dunkeln inkubiert, um das störende Detergenz RapiGest auszufällen. Die Proben wurden in Polypropyleneinsätze überführt und in 2 ml Reaktionsgefäße gestellt. Durch Zentrifugation bei RT und 13000 rcf für 30 min entstanden drei Phasen. Die peptidhaltige Interphase wurde

¹⁸⁶ Promega, Mannheim

¹⁸⁷ Waters, Eschborn

abgenommen und entweder direkt massenspektrometrisch analysiert oder bis zur Analyse auf -20°C gelagert.

3.7.5 Analyse im Massenspektrometer

Die verdauten Peptide wurden entweder mittels MALDI-TOF peptide mass fingerprinting und MS/MS in einem MALDI-TOF/TOF Tandem Massenspektrometer (ABI4700 Proteomics Analyzer¹⁸⁸) oder mittels MC-MS/MS in einem Ultimate3000 nano HPLC System online gekoppelt an ein LTQ OrbitrapXL¹⁸⁹ Massenspektrometer mit einer Nano Spray Ionenquelle analysiert.

3.7.5.1 Analyse mittels MALDI-TOF/TOF

Die Identifizierung der Proteine aus den 1D und 2D PAGE Proben erfolgte mittels MALDI-TOF/TOF. Anhand der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) wurden die Analytmoleküle ionisiert. Je 0,5 µl Probe wurden auf einem Probenhalter mit 0,5 µl der Matrix (siehe Kapitel 3.1.11) gemischt. Durch Verdunsten des Lösungsmittels ko-kristallisierten die Analytmoleküle mit den Molekülen der Matrix. Anschließend wurde der Probenhalter in das Massenspektrometer eingelegt und die Kristalle wurden nach Erzeugung eines Hochvakuums mit einem UV-Laser beschossen. Ein Flugzeitanalysator (TOF-Analysator, *engl.* time-of-flight) trennte die durch den Laserimpuls gebildeten und innerhalb der Ionenquelle beschleunigten Ionen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) auf. Das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung ist dabei proportional zu dem Quadrat der Flugzeit. Das Signal der Ionen wurde anhand eines Sekundärelektronenvervielfachers verstärkt und mit einem Transientenrekorder digitalisiert, um die Ionen zu detektieren. Die Kalibrierung und Analyse des digitalen Signals erfolgte durch ein Datenverarbeitungsprogramm, nachdem das Signal eingelesen wurde. Anschließend wurden die Massenspektren der jeweiligen Peptide (*engl.* Peptide mass fingerprinting, PMF) gemessen und eine Sequenzanalyse der im PMF signalstärksten Peptide durchgeführt (MS/MS).

¹⁸⁸ Applied Biosystems, Darmstadt

¹⁸⁹ Thermo Scientific, Dreieich

Die Spektren im positiven Ionen Reflektor Modus entsprachen den Mittelwerten von je 2500 Laserschüssen und die Analyse erfolgte daraufhin anhand externer Kalibrierung. Die Standardpeptide für die Kalibrierung waren Angiotensin-2-acetat mit einer monoisotopischen Masse des [M+H]⁺ Ionensignals bei 1046,54 Da, Substanz P (1347,74 Da), Bombesin (1619,82 Da) und ACTH 18-3 (2465,20 Da)¹⁹⁰. Innerhalb des Massenbereichs von 800 – 4000 kDa erfolgte die Bestimmung der monoisotopischen Peakmassen mit einer minimalen relativen Intensität automatisch. Während Trypsin-Autolyse-Peaks und Matrixionensignale von der Erfassung ausgeschlossen wurden, wurden bis zu sieben der intensivsten Ionensignale, die eine relative Intensität von mehr als 30 aufwiesen (Signal zu Rauschen Verhältnis), automatisch als Precursor für die MS/MS-Erfassung ausgewählt. Jeweils 4000 Spektren wurden im MS/MS positiven Ionenmodus bei 1 kV Kollisionsenergie, einem Druck der Kollisionsgasluft von $1,6 \times 10^{-6}$ torr und vorgegebener Kalibrierung gemittelt.

3.7.5.2 Datenbanksuche für die mittels MALDI-TOF/TOF identifizierten Peptide

Die kombinierten PMF- und MS/MS-Peptid-Massenlisten wurden anhand der MASCOT Datenbank Suchmaschine¹⁹¹ (Matrix Science, Version 2.3), die in eine GPS-Explorer Software integriert war, mit Einträgen aus den öffentlichen Proteindatenbanken verglichen. Die jeweiligen Peptide wurden anhand der Ensembl-Rind-Datenbank¹⁹² (Version 70, 2013) identifiziert. Die Parameter waren wie folgt vorgegeben: 65 ppm Massentoleranz für Peptide, 0,8 Da Fragmenttoleranz, Trypsinschnitt, maximal eine nicht geschnittene Trypsinspaltstelle, sowie Carbamidomethylierung als feste Modifikation und Oxidation von Methionin und Deamidierung von Asparagin und Glutamin als variable Modifikation. Ein Protein wurde als identifiziert definiert, wenn der MASCOT Score signifikant war ($p < 0,05$). Die verwendete Datenbank ist über das World Wide Web frei zugänglich: Ensembl:<http://www.ensembl.org/index.html>.

¹⁹⁰ Alle Kalibrationspeptide stammen von Sigma-Aldrich, Deisenhofen

¹⁹¹ <http://www.matrixscience.com/>

¹⁹² <http://www.ensembl.org/index.html>

3.7.5.3 Analyse mittels LC-MS/MS

Das HPLC System umfasst eine Nano Trap Säule¹⁹³ (100 µm i.d. x 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100 Å Material) und eine analytische Säule¹⁹⁴ (75 µm i.d. x 15 cm, Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100 Å Material). Anschließend an den In-Solution-Verdau wurden je 20 µl einer Probe automatisch injiziert und in 5% Puffer B und 95% Puffer A mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min auf die Nano Trap Säule¹⁹⁵ geladen.

Die Peptide wurden nach 5 min eluiert und anhand der analytischen Säule¹⁹⁶ durch einen Gradienten von 5 – 50% Puffer B bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 nl/min über eine Zeit von 140 min aufgetrennt. Peptide, die auf der Säule verblieben, wurden durch einen kurzen Gradienten von 50 – 100% Puffer B innerhalb von 5 min eluiert. Die Analyse der eluierten Peptide erfolgte direkt nach der Nano Spray Ionisierung in einem LTQ OrbitrapXL¹⁹⁷ Massenspektrometer. Dabei wurden nach der Aufnahme aller Peptidmassen pro Zyklus die zehn intensivsten Peptidionen aus dem Orbitrap MS Vorscan für die Fragmentanalyse in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Eine Intensität von mindestens 100 und eine minimal doppelte Ladung des Peptides wurden als Auswahlkriterien vorgegeben. 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-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 bereits fragmentierte Ion wurde durch Ausschluss für weitere 30 sec von einer erneuten Fragmentierung ausgeschlossen (dynamic exclusion).

¹⁹³ Dionex, Idstein

¹⁹⁴ Dionex, Idstein

¹⁹⁵ Dionex, Idstein

¹⁹⁶ Dionex, Idstein

¹⁹⁷ Thermo Scientific, Dreieich

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

Die aufgenommenen MS/MS-Spektren wurden zur Identifikation der Peptide mit Mascot¹⁹⁸ (Matrix Science, Version 2.3) aus der 1D und 2D PAGE mit der Ensembl-Rind-Datenbank¹⁹⁹ (Version 70, 2013) abgeglichen. Für die Analyse der Impfstoffe wurde die Datenbank um Virusproteine aus der UniProt Datenbank²⁰⁰ erweitert. Dabei wurde die Peptidtoleranz auf 10 ppm und die Fragmentationstoleranz auf 0,6 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. Dabei wurde maximal eine nicht geschnittene Spaltstelle erlaubt. Anhand der in Mascot integrierten Decoy-Datenbanksuche wurde die Falschpositivrate (*engl.* False discovery rate, FDR) abgeschätzt (bei einer minimalen Ionen-Punktzahl von 30 und einem Signifikanzgrenzwert von $p < 0,01$) und kleiner 1% gehalten. Es wurden nur Proteine mit mindestens einem Peptid, dessen Fragmentspektrum das Protein als bestmögliche Übereinstimmung ergab, und Peptide mit einer Ionen-Punktzahl von > 30 mit einbezogen.

Zuletzt wurde der minimale Wert der Ionen-Punktzahl bei Proteinen, deren Identifikation nur über ein Peptid erfolgte, von 30 auf 50 erhöht, um die Identifikationssicherheit zu maximieren.

Alle verwendeten Datenbanken sind über das World Wide Web frei zugänglich:

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

UniProt: www.uniprot.org

¹⁹⁸ <http://www.matrixscience.com>

¹⁹⁹ <http://www.ensembl.org/index.html>

²⁰⁰ www.uniprot.org

3.7.6 Qualitative Auswertung mit Scaffold

Die Identifikationen aus der MALDI-TOF/TOF wurden mit der Scaffold-Software²⁰¹ analysiert. Dabei wird zur Berechnung einer einfachen Wahrscheinlichkeit für die Peptididentifikationen aus den Mascot Ergebnissen der PeptideProphet Algorithmus verwendet. Für die Analyse wurden die Suchergebnisse in die Scaffold Software importiert und anhand der gleichen Datenbanken und Modifikationen analysiert, die für die Datenbanksuche verwendet wurden. Anschließend wurde die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Peptididentifizierung auf mindestens 80%, die Mindestanzahl der Peptididentifikationen pro Protein auf 2 und die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Proteinidentifizierung auf mindestens 95% festgelegt.

3.7.7 Quantitative Auswertung mit Progenesis

Zur quantitativen Auswertung der Daten wurden die aufgenommenen MS/MS-Spektren in die Progenesis-Software²⁰² importiert und die verschiedenen Proben innerhalb eines Projektes 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. Nachdem die Spektren über die Ladungen normalisiert wurden, konnten die Spektren für die Datenbanksuche aus der Progenesis-Software²⁰³ als Mascot Generic file (mgf) exportiert werden. Anhand der in Mascot integrierten Decoy-Datenbanksuche wurde bei der Suche in dem angehängten mgf-Datensatz (bei einer minimalen Ionen-Punktzahl von 30 und einem Signifikanzgrenzwert von $p < 0,01$) eine FDR von weniger als 1% berechnet. Es wurden nur Proteine mit mindestens einem Peptid einbezogen, wenn die bestmögliche Übereinstimmung des Fragmentspektrums des jeweiligen Peptids das Protein ergab, sowie Peptide mit einer Ionen-Punktzahl von > 30 und anschließend in die Progenesis-Software reimportiert. Zuletzt wurde der

²⁰¹ <http://www.proteomesoftware.com>

²⁰² Nonlinear Dynamics

²⁰³ Nonlinear Dynamics

minimale Wert der Ionen-Punktzahl bei Proteinen, deren Identifikation nur über ein Peptid erfolgte, von 30 auf 50 erhöht, um die Identifikationssicherheit zu maximieren.

3.7.8 Suche von Orthologen und Paralogen

Einträge, die nicht direkt einem validierten Rinderprotein zugeordnet werden konnten, wurden in der frei verfügbaren Ensembl-Rind-Datenbank²⁰⁴ (Version 70, 2013) entsprechenden Orthologen oder Paralogen zugeordnet. Falls dies nicht möglich war, wurden Homologe der Proteinsequenzen anhand des NCBI BLAST Algorithmus²⁰⁵ identifiziert.

3.8 Durchflusszytometrie

PBL wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, nach Erythrozytenlyse isoliert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) phänotypisiert.

Folgende primäre Antikörper wurden zur Phänotypisierung eingesetzt:

Antikörper	Isotyp	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
CD4	Maus IgG ₁	anti Rind	1:100	Serotec ²⁰⁶
CD8	Maus IgG _{2a}	anti Rind	1:50	Serotec ²⁰⁷
CD14	Maus IgG ₁	anti Rind	1:100	Serotec ²⁰⁸
CD21	Maus IgG ₁	anti Rind	1:50	Serotec ²⁰⁹
CD172a	Maus IgG ₁	anti Rind	1:5	VMRD ²¹⁰
Kontrollserum	-	-	1:1000	-
Überträgerserum	-	-	1:1000	-

²⁰⁴ <http://www.ensembl.org/index.html>

²⁰⁵ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

²⁰⁶ Serotec, Düsseldorf

²⁰⁷ Serotec, Düsseldorf

²⁰⁸ Serotec, Düsseldorf

²⁰⁹ Serotec, Düsseldorf

²¹⁰ Qiagen, Leipzig

Folgende sekundäre Antikörper wurden zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt:

Markierung	Host	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
FITC	Ziege	anti Maus IgG ₁	1:200	Santa Cruz ²¹¹
FITC	Ziege	anti Maus IgG _{2a}	1:200	Santa Cruz ²¹²
FITC	Schaf	anti Rind IgG ₁	1:50	Serotec ²¹³
PE	Ziege	anti Maus IgG ₁	1:200	Santa Cruz ²¹⁴

3.8.1 Vorbereiten der Antikörper

Zum Markieren der Serumantikörper mit Biotin²¹⁵ wurden die unbehandelten Seren über Nacht in 0,1M NaHCO₃ (pH 8,0) (siehe Kapitel 3.1.12) dialysiert. In der letzten Stunde vor der Biotinylierung wurde der pH-Wert auf 9,0 eingestellt. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration auf 1 mg/ml eingestellt und 1 ml Serum mit 100 µl Biotinylierungspuffer bei RT für eine Stunde in einem Glasgefäß rührend inkubiert. Anschließend wurde das biotinylierte Serum über Nacht gegen PBS dialysiert. Die markierten Seren wurden bei 4°C aufbewahrt.

Die primären Antikörper wurden in Kombination mit einem isotypspezifisch passenden, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten sekundären Antikörper (siehe Liste sekundäre Antikörper) eingesetzt.

3.8.2 Markieren der Leukozytenpopulationen

Zunächst wurden die gewonnenen PBL in PBS suspendiert und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Delle in eine 96-Loch Rundbodenplatte einpipetiert, dann abzentrifugiert (4°C, 800 rcf, 10 sec), kräftig dekantiert und die verbleibenden Zellpellets mit einem der oben aufgelisteten primären Antikörpern pro Delle 30 min bei 4°C inkubiert.

Es folgten zwei Waschschrte (Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren in Fluo-Puffer) und anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden

²¹¹ Santa Cruz, Heidelberg

²¹² Santa Cruz, Heidelberg

²¹³ Serotec, Düsseldorf

²¹⁴ Santa Cruz, Heidelberg

²¹⁵ Sigma-Aldrich, Deisenhofen

sekundären Antikörper²¹⁶ (siehe Liste sekundäre Antikörper) oder Streptavidin-Alexa 647²¹⁷ (Verdünnung 1:200 in Fluo-Puffer) für biotinylierte Seren inkubiert (4°C, 30 min). Die Inkubationsschritte erfolgten ab dem Einsatz der fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper im weiteren Verlauf abgedunkelt. Damit waren die Einfachfärbungen abgeschlossen.

Für die Doppelfärbungen erfolgten nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wiederum zwei Waschschrte. Die entstandenen Leukozytenpellets wurden daraufhin in den entsprechenden Antikörper-Lösungen (siehe Liste primäre Antikörper) in Fluo-Puffer verdünnt resuspendiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über 30 min bei 4°C, gefolgt von zwei Waschschrten und der Inkubation mit dem entsprechenden FITC- gekoppelten, sekundären Antikörpern²¹⁸ (4°C, 30 min). Darauf folgten wiederum zwei Waschgänge. Schlussendlich wurden die Zellpellets in je 200 µl Fluo-Puffer resuspendiert und in FACS Röhren mit vorgelegten 200 µl Fluo-Puffer überführt (Endvolumen 400 µl).

Für alle Messungen wurden entsprechende Isotypkontrollen erstellt.

3.8.3 Detektion der Zellen mit dem FACSCanto II System

Das optische System des FACSCanto II²¹⁹ besteht aus einer Exzitationsquelle mit drei Lasern: blau (488 nm), rot (633 nm) und violett (405 nm). Die Laseranregungsoptik illuminiert die fluoreszenzmarkierten Zellen in der zu messenden Probe und die Lasersammeloptik lenkt die Lichtstreuung sowie die emittierten Fluorchrom-spezifischen Fluoreszenzsignale über Spektralfilter zu den Detektoren. Die unterschiedlichen Emissionsspektren der eingesetzten Fluorochrome werden an verschiedenen Detektoren registriert und ermöglichen so eine Phänotypisierung der untersuchten Zellen.

²¹⁶ Invitrogen, Karlsruhe

²¹⁷ Invitrogen, Karlsruhe

²¹⁸ Santa Cruz, Heidelberg

²¹⁹ Becton Dickinson, Heidelberg

Die fluoreszenzmarkierten Leukozyten wurden mit einer Sample Flow Rate von 10 bis 120 μl pro Minute aus den FACS Röhren in das FACSCanto II System²²⁰ eingespeist und passierten durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette die Laser im optischen System. Bei passender Wellenlänge wurden die Elektronen der Fluorochrome angeregt und somit energiereicher. Nach Beendigung der Anregung fielen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Diese für jedes Fluorchrom spezifische Emissionsspektrum wurde über einen Photodetektor (photomultiplier tube, PMT) mit optischem Filter registriert, in elektrische Impulse umgewandelt und anschließend über einen Analog-Digital-Wandler graphisch dargestellt.

3.8.4 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die detektierten Zellen sind im Dot Plot als Punktwolke dargestellt (Abb. 4.7 – 4.9), mit den Parametern FITC (x-Achse) und Streptavidin-Alexa 647 (y-Achse). Jeder Punkt repräsentiert jeweils eine im optischen System registrierte Zelle. Der Plot ist in vier Quadranten unterteilt, Q1 – Q4.

Im unteren linken Quadranten (Q3) sind nicht-Fluorchrom-gekoppelte Zellen angezeigt, wohingegen Zellen, die nur mit einem der FITC-markierten Antikörper reagiert haben, im unteren rechten Quadranten (Q4) dargestellt sind. Lymphozyten, an die eines der Streptavidin-Alexa 647-gekoppelten Seren gebunden hat, sind im oberen linken Quadranten (Q1) zu sehen. Im oberen rechten Quadranten (Q2) wird nur dann eine detektierte Zelle angezeigt, wenn sie beide Fluorchrom-Antikörper gebunden hat.

3.9 Immunzytochemie

Um das Bindungsmuster von BNP-auslösenden Immunglobulinen (Ig) zu analysieren, wurden je circa 5×10^4 MDBK-Zellen auf einem Objektträger²²¹ ausgestrichen. Nach Fixierung für 10 min in eiskaltem Aceton wurden die gut getrockneten Ausstriche in PBS-T rehydriert. Anschließend wurden die Ausstriche

²²⁰ Becton Dickinson, Heidelberg

²²¹ Mediatec, Burgdorf

mit einer Lösung aus 1% BSA und 5% Schafserum in PBS-T (siehe Kapitel 3.1.13) bei RT für 40 min blockiert. Es folgte eine Inkubation mit Rinderserum in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T mit 1% BSA über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Ausstriche dreimal mit PBS-T gewaschen und bei RT für 30 min mit dem FITC-markierten sekundären Antikörper (Schaf anti-bovines IgG₁²²²) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS-T mit 1% BSA inkubiert. Die Antikörperreste wurden durch drei weitere Waschschrte mit PBS-T entfernt. Zur Kenntlichmachung der Plasmazellmembran-assoziierten Proteine wurde eine Doppelfärbung der Zellen mit Biotin-markiertem Wheat Germ Agglutinin (WGA²²³) durchgeführt. Dafür wurden 5 µg WGA in 1 ml PBS-T mit 1% BSA gelöst und die Ausstriche bei RT für 4 Stunden inkubiert. Nach Entfernen der Lektinreste durch dreimaliges Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Alexa 647²²⁴ in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T mit 1% BSA bei RT für 30 min. DAPI²²⁵ wurde zur Kernfärbung in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Die Ausstriche wurden mit Fluorescent Mounting Medium²²⁶ eingedeckelt. Die Auswertung und Dokumentation des Bindungsmusters der Antikörper an MDBK-Zellen erfolgte mit dem Mikroskop Axio Imager M31²²⁷ und der Software AxioVision 4²²⁸.

3.10 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Anreicherung von Proteinen durch kolostrale Antikörper in der IP und der Auswertung der differenziellen Proteinexpressionsanalyse von Thrombozyten- und PBL-Oberflächenproteinen wurde der Student's *t*-Test angewandt.

Für die Auswertung der Daten aus dem Durchflusszytometer wurde der prozentuale Anteil Zellen ermittelt, der in einer bestimmten Population IgG von BNP-

²²² Serotec, Düsseldorf

²²³ Biozol, Eching

²²⁴ Invitrogen, Karlsruhe

²²⁵ Invitrogen, Karlsruhe

²²⁶ DAKO, Hamburg

²²⁷ Carl Zeiss, Oberkochen

²²⁸ Carl Zeiss, Oberkochen

Überträgerkühen auf der Oberfläche gebunden hatte. Zum Vergleich der Bindung von Alloantikörpern an die Oberfläche von Leukozytenpopulationen und Lymphozytenpopulationen wurden die Mittelwerte der Daten der BNP-Überträger- und der Kontrollgruppe berechnet. Daraufhin wurden die Werte anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung geprüft. Der Test war sowohl für die Granulozyten-, Monozyten- und Lymphozytenpopulation, als auch innerhalb der Lymphozytenpopulation für die CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD21⁺ B-Zellen, signifikant. Somit lag keine Normalverteilung der Daten vor und die statistische Auswertung erfolgte demnach mit dem Mann-Whitney-Test.

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifikation potenzieller Kandidatenantigene aus dem Gesamtproteom von Kälberthrombozyten und PBL

4.1.1 Immunglobuline aus Seren und Kolostren von BNP-Überträgerkühen detektieren Thrombozytenproteine gesunder Kälber

Mittels 2D PAGE wurden Thrombozytenproteine aus Vollblut von gesunden Kälbern aufgetrennt, um zu testen, ob Ig der BNP-Überträgerkühe Proteine als Alloantigen erkennen und binden. In der ersten Dimension erfolgte die Separation anhand des isoelektrischen Punktes der Proteine auf einem 11 cm langen IPG-Streifen mit einem nichtlinearen Gradienten von pH 3 – 11. Daraufhin wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch ein zehnprozentiges SDS-Gel in einem Bereich von etwa 11 – 170 kDa hochauflösend aufgetrennt. Zur Durchführung von 2D Western Blots wurden 100 µg Thrombozytenlysat von drei gesunden Kälbern aufgetrennt und mit Seren von Kontrollkühen (n = 5) und Überträgertieren (n = 7), sowie Kolostren von je vier Kontrolltieren und BNP-Überträgern inkubiert. Um zu differenzieren, ob die Immunreaktionen durch IgM oder IgG spezifische Antikörper vermittelt werden, wurden die 2D Blots mit zwei unterschiedlichen sekundären, POD-markierten Antikörpern inkubiert. Während nach der Inkubation mit Kaninchen anti-bovinem IgM µ-Kette keine Signale sichtbar wurden, zeichneten sich nach der Inkubation mit einem sekundären, POD-markierten Kaninchen anti-bovinem IgG F(c)-Antikörper deutliche Reaktionen bei den BNP-Überträgern ab (Abb. 4.1). Demzufolge sind die Alloantikörper Immunglobuline der Klasse G (IgG), weshalb wir alle folgenden Experimente mit Antikörpern gegen bovines IgG durchführten. Die Versuche mit den Kontrollseren und –kolostren dienten wiederum dazu, Hintergrundreaktionen zu erfassen, um diese als Alloantigen-Kandidaten ausschließen zu können. Es gab keinen Unterschied bei den Reaktionen in Western Blots zwischen Seren und Kolostren der jeweiligen untersuchten Gruppe. Die BNP-Alloantikörper waren in Serum und Kolostrum der Überträgertiere gleichermaßen nachweisbar, was bedeutet, dass die kolostralen Antikörper aus dem Serum stammen und erst

während der Kolostrumbildung ins Euter transferiert werden. Blots, die mit Überträgerseren und -kolostren inkubiert wurden, zeigten deutlich mehr IgG-Bindungen (Abb. 4.1.b) als die entsprechenden Kontrollen (Abb. 4.1.a). In Abbildung 4.1 sind zwei repräsentative 2D Western Blots zu sehen, die mit Kontrollserum (Abb. 4.1.a) und Überträgerserum inkubiert wurden (Abb. 4.1.b). Insgesamt waren bei der Inkubation mit BNP-Überträger IgG sieben Signale gegen das Proteom von Thrombozyten auffällig (Abb. 4.1.b und 4.2, rote Markierung). Zwischen den Blots, die mit den einzelnen Überträger-Ig inkubiert wurden, gab es kaum Unterschiede zu sehen. Sie zeigten allesamt gegen mehrere Proteine gleichzeitig Reaktionen und wie es auch aus den beiden Blots in Abbildung 4.1 ersichtlich wird, deckten sie jeweils die meisten Reaktionen ab.

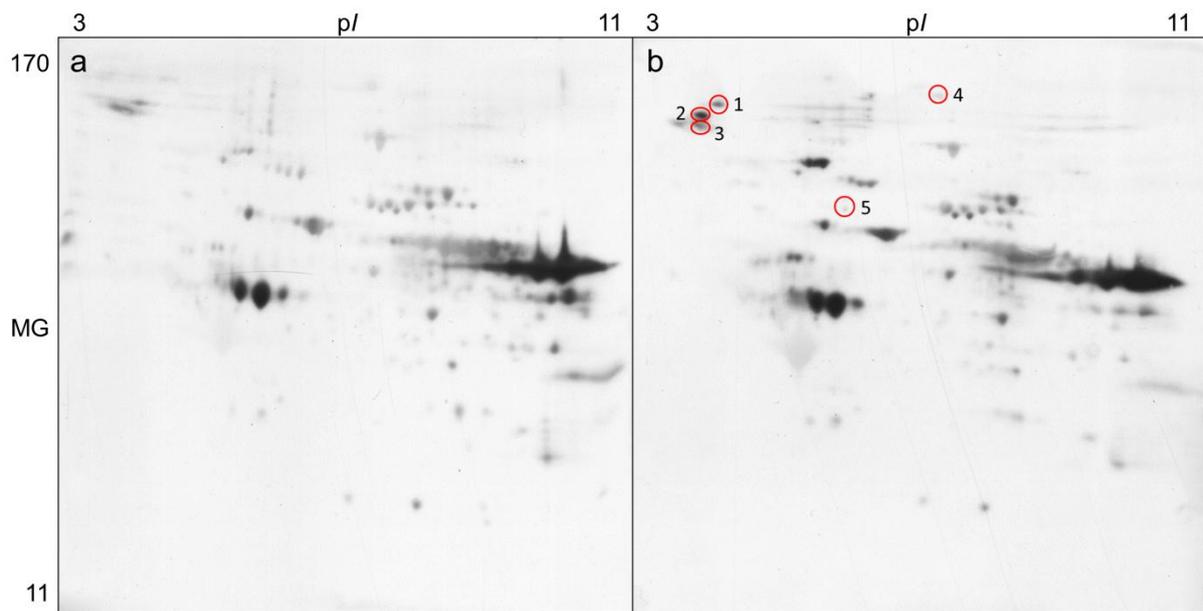


Abb. 4.1.: Repräsentative Western Blots mit je 100µg Thrombozytenlysat nach Inkubation mit Rinderseren (1:700000). Alloantikörperreaktionen wurden mit einem Peroxidase-markierten Kaninchen anti-bovinem IgG F(c)-Antikörper (Rockland; 1:10000) sichtbar gemacht. Proteine, die eine Bindung mit Überträger-Ig zeigten (b, rote Markierung), an die die Kontrollen aber nicht banden (a), wurden in der korrespondierenden Höhe aus dem Coomassie-gefärbten Mastergel (Abb. 4.2) ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Proteine sind analog zu den Spots nummeriert und in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.1.2 Auftrennung und Darstellung des Thrombozytenproteoms gesunder Kälber

Zur massenspektrometrischen Identifikation wurden 2D Gele mit je 500 µg Thrombozytenlysat eines gesunden Kalbes angefertigt, aus denen im Anschluss an die Western Blots die reaktiven Spots ausgeschnitten werden konnten (Abb. 4.2).

Die Proteine ließen sich anhand der Silberfärbung qualitativ und durch Färbung mit kolloidalem Coomassie nach Kang et al. (Kang et al., 2002) quantitativ beurteilen. Die Gele zeigten eine gleichmäßige Verteilung und gute Auftrennung der Proteine über die gesamte Laufstrecke (Abb. 4.2) und in allen angefertigten SDS-Gelen waren die dargestellten Proteinmuster gleich.

Horizontal liegen auf der linken Seite der Gele die sauren Proteine, auf der rechten Seite stellen sich folglich die basischen Proteine dar. Vertikal befinden sich im oberen Bereich Proteine mit höherem Molekulargewicht, da sie im Vergleich zu den kleineren Proteinen nicht so weit ins Gel einlaufen können. Proteine mit geringerer Masse können hingegen weiter nach unten durch die Gelstruktur wandern, bis sie sich festsetzen. Anhand der Auftrennung des Proteoms in beiden Dimensionen stellen sich große saure Proteine links oben dar, während sich kleine basische Proteine rechts unten befinden.

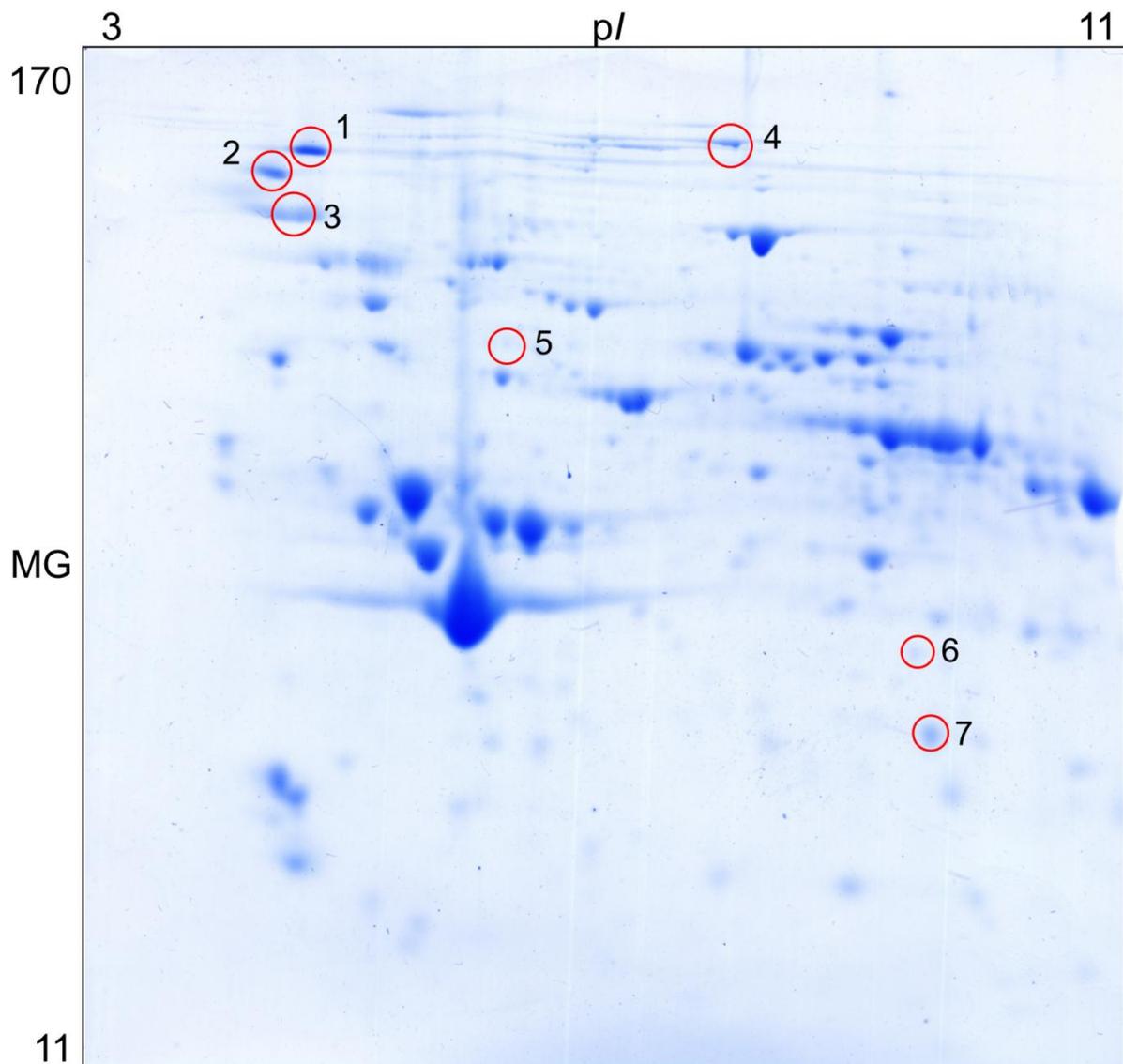


Abb. 4.2: Repräsentatives, mit kolloidalem Coomassie-gefärbtes Thrombozytenproteom eines gesunden Kalbes. 500 µg einer Thrombozytenpräparation aus Vollblut eines gesunden Kalbes wurden mittels 2D SDS-PAGE in einem zehnprozentigen Gel ihrem isoelektrischen Punkt (pI 3 – 11) und anschließend ihrem Molekulargewicht (MG, 170 – 11 kDa) entsprechend aufgetrennt. Daraufhin wurden die separierten Proteine durch Färbung mit kolloidalem Coomassie sichtbar gemacht. Spots, gegen die sich im Western Blot eine Reaktivität mit BNP-Proben zeigte (Abb. 4.1.b), aber die nicht mit Kontroll-Ig reagierten (Abb. 4.1.a), wurden in der korrespondierenden Höhe aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert (rote Markierung). Die identifizierten Proteine sind analog zu den Spots nummeriert und in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.1.3 Identifikation targetierter Thrombozytenproteine mittels Massenspektrometrie

Die korrespondierenden Spots (Abb. 4.1.b und Abb. 4.2, rote Markierungen) wurden aus einem Mastergel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die detektierten Proteine konnten eindeutig signifikant aus dem Rind (*Bos taurus*) stammend identifiziert werden und sind in Tabelle 4.1 mit ihren Proteinidentifikationen in numerischer Reihenfolge aufgelistet.

Spots Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Theoretisches		Aussage-wahrscheinlichkeit ^f
			MG ^d	pI ^e	
1	Thrombospondin-1	ENSBTAP00000002600	130	4,51	222
2	CD41 (Integrin Alpha 2b)	ENSBTAP00000010738	103	5,42	259
3	CD41 (Integrin Alpha 2b)	ENSBTAP00000010738	103	5,42	75
4	Zyxin	ENSBTAP00000023912	60	6,75	155
5	Fructose-bisphosphat Aldolase C	ENSBTAP00000017416	39	6,63	44
6	LIM und SH3 Domain Protein	ENSBTAP00000040793	30	7,05	112
7	PDZ und LIM Domain Protein 1	ENSBTAP00000014850	36	7,22	211

Tab. 4.1: Mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine aus Kälberthrombozyten, die in 2D Western Blots von Ig von BNP-Überträgertieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gebunden wurden.

a) Fortlaufende Nummer der Spots. Diese korrespondieren mit den Markierungen im Mastergel.
 b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, Januar 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Theoretisches Molekulargewicht (MG) des identifizierten Proteins in Kilodalton (kDa), e) Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) des identifizierten Proteins, f) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt.

Die 2D Western Blots erwiesen sich als geeignet, um unterschiedliche Immunreaktionen der BNP-Überträgertiere gegenüber gesunden Kontrolltieren auf Alloantigene nachzuweisen. Aus diesem Ansatz wurden Alloreaktivitäten gegen insgesamt sieben Proteinspots identifiziert, die sechs verschiedenen Proteinen entsprachen.

4.1.4 Detektion von Bindungen der BNP-Ig an PBL gesunder Kälber

Primär ist zwar für die auftretende Gerinnungsstörung bei der BNP der Untergang von Thrombozyten verantwortlich, im Blutbild erkrankter Kälber kommt es jedoch auch zu einer mittel- bis hochgradigen Leukozytopenie (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b). Daher haben wir anschließend analog zu den beschriebenen Versuchen mit Thrombozyten die gleichen Versuche mit 2D Western Blots und dem PBL-Proteom durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob BNP-Ig mit PBL reagieren, wurden Western Blots durchgeführt, die mit Ig von Kontrolltieren (Abb. 4.3.a) und BNP-Überträgern (Abb. 4.3.b) inkubiert wurden (siehe Kapitel 4.1.1). Auch hier erschienen im Western Blot Signale, die lediglich nach Inkubation mit Überträger-Ig auftraten. Im Vergleich zu den Thrombozyten-Blots wurden hingegen niedermolekulare Proteine gebunden (Abb. 4.3.b, rote Markierungen). Wie schon die Thrombozyten-Blots zeigten, wiesen die Überträgerkühe wieder viele Reaktionen gegen PBL-Proteine auf, die in unterschiedlicher Zusammenstellung immer die gleichen sieben Spots als Ziel der Alloantikörper erkannten, die deswegen zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden (Abb. 4.3.b und Abb. 4.4, rote Markierungen). Repräsentative Western Blots sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Im Vergleich zum Kontroll-Ig (Abb. 4.3.a) banden Ig des BNP-übertragenden Tieres sechs weitere Spots (Abb. 4.3.b, Spot 8 bis 13).

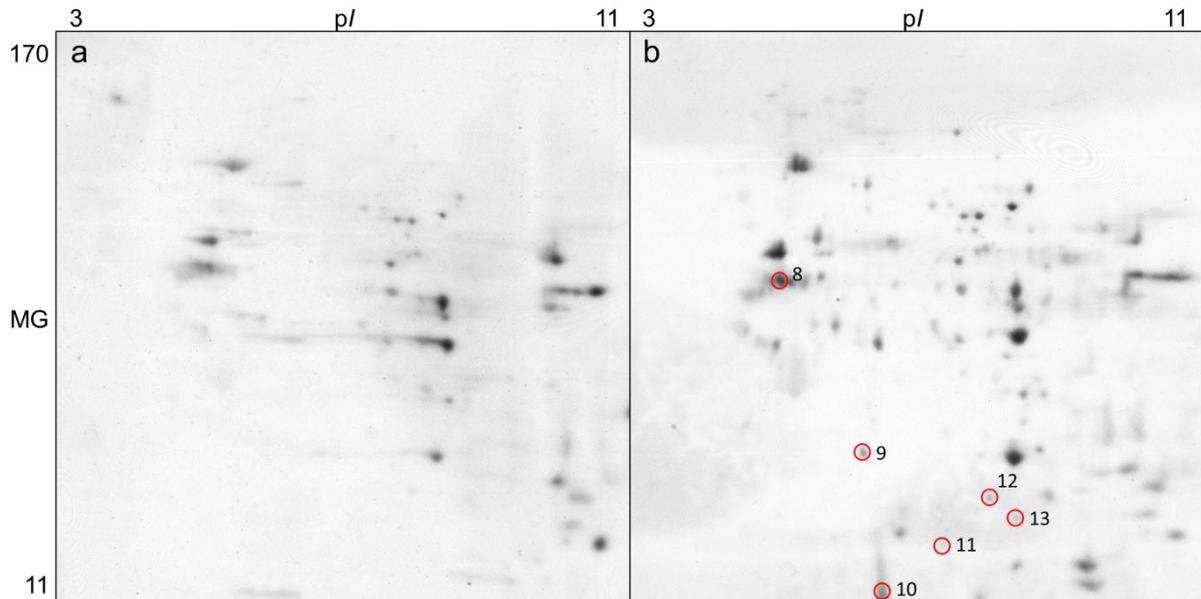


Abb. 4.3: Repräsentative Western Blots mit 100 µg Leukozytenprotein, mit Seren 1:700000 inkubiert. Alloantikörperreaktionen wurden mit einem POD-markierten Kaninchen anti-bovinem IgG F(c)-Antikörper (Rockland; 1:10000) sichtbar gemacht. Spots, die eine Reaktivität bei den Blots mit BNP-Ig zeigten (b, rote Markierung), aber nicht bei den Kontrollen reagierten (a), wurden in der korrespondierenden Höhe aus dem Coomassie-gefärbten Mastergel (Abb. 4.4) ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Proteine sind analog zu den Spots nummeriert und in Tabelle 4.2 aufgeführt.

4.1.5 Auftrennung und Darstellung des Proteoms von PBL gesunder Kälber

In Abbildung 4.4 ist ein repräsentatives Gel des PBL-Proteoms mit 500 µg PBL-Lysat eines gesunden Kalbes zu sehen. Die sieben Proteinspots, die im Western Blot durch BNP-Ig detektiert wurden, sind rot eingekreist. Auffällig ist, dass es sich dabei im Vergleich zu den im Thrombozytenproteom gebundenen Spots (Abb. 4.1.b und 4.2, rote Markierungen) um niedermolekulare Proteine handelt.

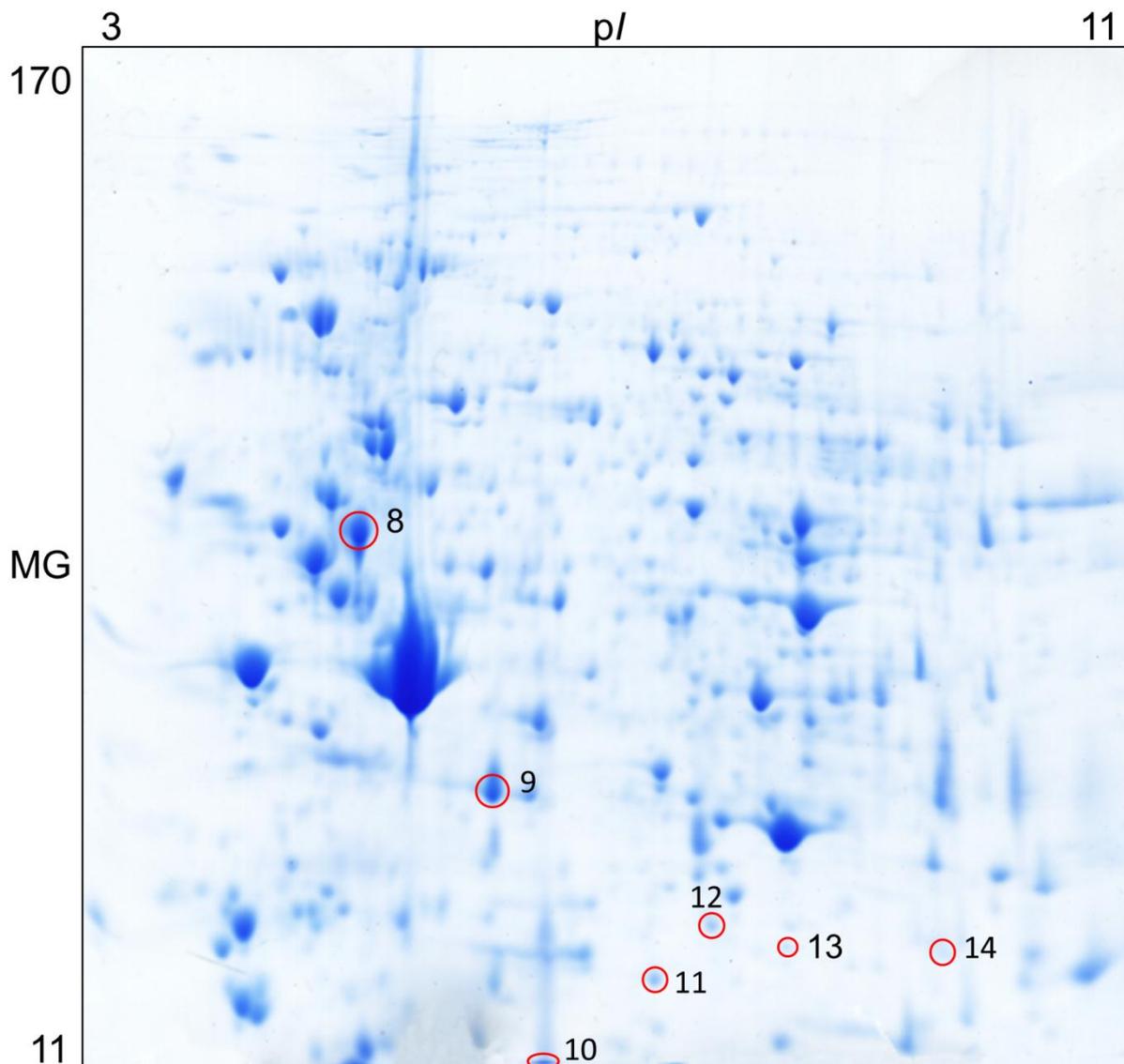


Abb. 4.4: Repräsentatives, mit kolloidalem Coomassie-gefärbtes PBL-Proteom eines gesunden Kalbes. 500 µg einer PBL-Proteinpräparation aus Vollblut eines gesunden Kalbes wurden mittels 2D SDS-PAGE in einem zehnprozentigen Gel ihrem isoelektrischen Punkt (pI 3 – 11) und anschließend ihrem Molekulargewicht (MG, 170 – 11 kDa) entsprechend aufgetrennt. Spots, die eine Reaktivität bei den Blots mit BNP-Proben zeigten, aber nicht mit Kontroll-Ig reagierten (Abb. 4.3), wurden in der korrespondierenden Höhe aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und mit dem Massenspektrometer identifiziert. Die identifizierten Proteine sind analog zu den Spots nummeriert und in Tabelle 4.2 aufgeführt.

4.1.6 Identifikation von Zielproteinen aus PBL mittels Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die korrespondierenden Spots aus einem Mastergel ausgeschnitten (Abb. 4.4, rote Markierungen) und konnten eindeutig dem Rind (*Bos taurus*) zugeordnet und signifikant identifiziert werden. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die numerische Reihenfolge stimmt mit den Markierungen in den Abbildungen 4.3.b und 4.4 überein.

Spots Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	Theoretisches		Aussagewahrscheinlichkeit ^f
			MG ^d	pI ^e	
8	Tubulin Alpha-1C Kette	ENSBTAP00000038184	50	4,73	216
9	Gamma-Aktin (Aktin, zytoplasmatisch 2)	ENSBTAP00000008132	42	5,16	220
10	Hitzeschockprotein Beta-1	ENSBTAP00000015883	23	6,03	145
11	Purin-Nukleosid-Phosphorylase	ENSBTAP00000016346	32	6,31	242
12	WD Repeat-containing Protein 82	ENSBTAP00000024225	40	6,80	215
13	Proteasom Untereinheit Alpha Typ-1	ENSBTAP00000008621	30	6,60	56
14	Actin-related Protein 2/3 Komplex Untereinheit 2	ENSBTAP00000013707	34	7,40	100

Tab. 4.2: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus Kälber-PBL, die in 2D Western Blots von Ig von BNP-Überträgertieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gebunden wurden.

a) Fortlaufende Nummer der Spots. Diese korrespondieren mit den Markierungen im Mastergel. b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, Januar 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Theoretisches Molekulargewicht (MG) des identifizierten Proteins in Kilodalton (kDa), e) Theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) des identifizierten Proteins, f) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt.

Anhand von Western Blots konnten im 2D Screening insgesamt sechs Alloantigenkandidaten aus Thrombozyten (Tab. 4.1; CD41 wurde hier aus zwei verschiedenen Spots identifiziert) und sieben Kandidaten aus PBL (Tab. 4.2) detektiert werden. Diese entsprechen 13 unterschiedlichen Kandidatenproteinen.

4.2 Anreicherung von Membranproteinen und Identifikation potenzieller Alloantigene

4.2.1 Darstellung der Membranproteine von Thrombozyten und PBL mittels 1D PAGE

Da die 2D PAGE keine Auftrennung stark hydrophober Proteine zulässt, haben wir zusätzlich Membranproteine von Thrombozyten und PBL aus dem Vollblut gesunder Kälber präpariert und angereichert, um Alloantigenkandidaten identifizieren zu können, die an Membranen exprimiert werden (Hauck et al., 2010). Wie in der zweiten Dimension der 2D PAGE wurden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht durch 1D SDS-PAGE in einem zehnpromzentigen Gel aufgetrennt. Repräsentativ ist in Abbildung 4.5 ein mit kolloidalem Coomassie nach Kang et al. (Kang et al., 2002) gefärbtes 1D Gel zu sehen, in dem 40 µg einer Thrombozytenmembranpräparation eines gesunden Kalbes separiert wurden. Das Gel zeigt eine detaillierte Auftrennung der Proteine (Abb. 4.5.d) und die dargestellten Banden waren in allen angefertigten SDS-Gelen reproduzierbar.

4.2.2 Ig von BNP-Überträgerkühen binden an Membranproteine von Thrombozyten und PBL gesunder Kälber

Im Western Blot wurde daraufhin die Antikörperbindung von Ig von Kontroll- und BNP-Kühen an Membranproteine gesunder Kälber getestet (Abb. 4.5).

Beim Vergleich der Reaktionen von Ig der Kontrollgruppe mit denen der BNP-Kühe konnten in den Membranpräparationen insgesamt sieben Proteine eindeutig identifiziert werden, die sich in ihrer Reaktivität klar voneinander abhoben. Dabei unterschieden sich die Reaktionen auf Thrombozyten- und PBL-Membranproteine nicht wesentlich voneinander. Die BNP-Überträgertiere reagierten auf viele Alloantigene im Vergleich zur Kontrolle, wie es auch schon in den 2D Blots sichtbar war (Abb. 4.1 und Abb. 4.3). In Abbildung 4.5 ist ein repräsentativer Blot mit 40 µg Thrombozytenmembranprotein dargestellt, auf dem bei der Inkubation mit BNP-Ig alle sieben Reaktionen im Vergleich zu gesunden Kontroll-Ig auftraten (Abb. 4.5.c, rote Markierung). Auf Höhe der Signale wurden die korrespondierenden Banden aus

einem mit kolloidalem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten (Abb. 4.5.c und d, rote Markierung) und massenspektrometrisch identifiziert.

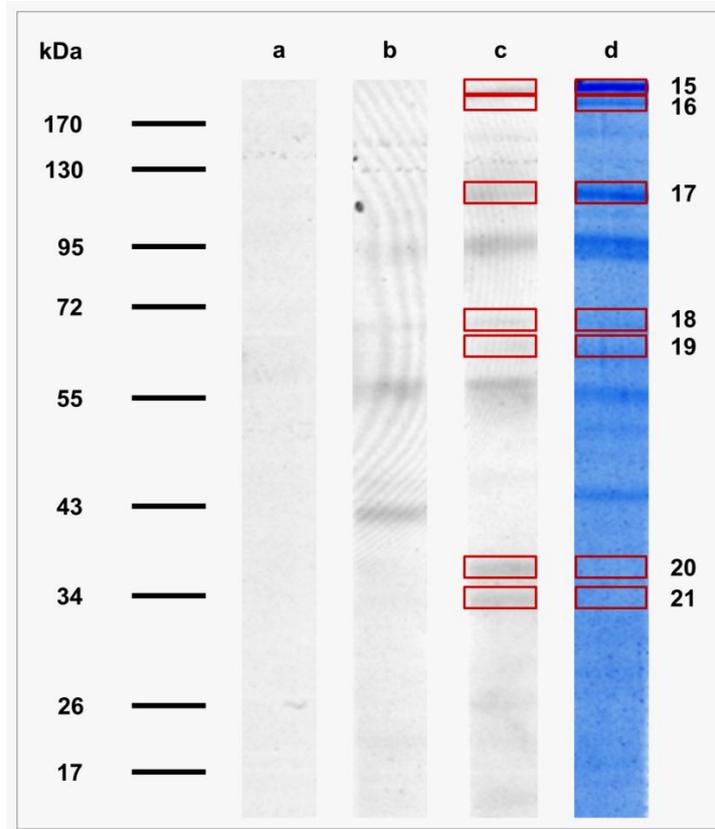


Abb. 4.5: 1D SDS-PAGE mit Thrombozytenmembranproteinen eines gesunden Kalbes. 40 µg einer Membranproteinpräparation aus Kälberthrombozyten wurden mittels 1D SDS-PAGE in einem zehnpromzentigen Gel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit Kolostren von Kühen in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert und entsprechende Antikörperreaktionen mit einem Peroxidase-markierten Kaninchen anti-bovinem IgG F(c)-Antikörper (Rockland; 1:10000) sichtbar gemacht. Banden, die einen Unterschied zwischen Kontrollen und Überträgern zeigten, wurden in der korrespondierenden Höhe aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und im Massenspektrometer identifiziert. Die identifizierten Proteine sind dem Molekulargewicht entsprechend von oben nach unten nummeriert und in Tabelle 4.3 (Kandidaten 15 bis 21) aufgeführt. Links: Marker für das Molekulargewicht in kDa.

a) Negativkontrolle (nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert), b) Kontrollkolostrum, c) Überträgerkolostrum, d) Coomassie-gefärbtes Gel. Die roten Kästen markieren die relevanten Antikörperreaktionen im Blot und die Stellen, an denen die entsprechenden Banden (15 - 21) aus den Gelen ausgeschnitten wurden.

Die detektierten Proteine wurden eindeutig aus dem Rind (*Bos taurus*) stammend identifiziert und sind in Tabelle 4.3 entsprechend den Banden in Abbildung 4.5. nummeriert aufgelistet.

Banden Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	MG ^d (kDa)	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e
15	Filamin A	ENSBTAP00000030179	281	158
16	Filamin A	ENSBTAP00000030179	281	57
17	CD41 (Integrin Alpha 2b)	ENSBTAP00000010738	103	295
18	Fibrinogen Alpha Kette	ENSBTAP00000002145	67	109
19	NADH-Cytochrom B5 Reduktase 3	ENSBTAP00000040254	34	101
20	Keratin, Typ I cytoskeletal 10	ENSBTAP00000017140	55	59
21	CD41 (Integrin Alpha 2b)	ENSBTAP00000010738	103	52

Tab. 4.3: Massenspektrometrische Identifikation von Thrombozyten- und PBL-Membranproteinen, die eine Bindung durch BNP-Ig aufweisen.

a) Fortlaufende Nummer des Alloantigenkandidaten, b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Theoretisches Molekulargewicht (MG) des identifizierten Proteins in Kilodalton (kDa), e) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt.

Anhand der 1D SDS-PAGE konnten insgesamt sieben Kandidatenbanden identifiziert werden, die fünf Proteinen entsprechen. Neben CD41 (Banden 17 und 21), welches bereits in den 2D Western Blots identifiziert wurde (Tab. 4.1, Spots 2 und 3), wurden weiterhin Filamin A (Banden 15 und 16), Fibrinogen Alpha Kette (Bande 18), NADH-Cytochrom B5 Reduktase 3 (Bande 19) und Zytokeratin-10 (Bande 20) identifiziert.

4.3 Mittels Immunpräzipitation wurden Alloantigene in PBL- und MDBK-Zelllysate sowie im Impfstoff PregSure BVD detektiert

Insgesamt konnten mit den 2D und 1D Western Blots 17 potenzielle BNP-Alloantigenkandidaten identifiziert werden. Ein Vorteil von 2D Western Blots gegenüber anderen Methoden ist, dass hier post-translationale Proteinmodifikationen dargestellt werden können. Ein erheblicher Nachteil ist hingegen die limitierte Darstellungsmöglichkeit von Membranproteinen, da diese aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften technisch nicht mit der 2D Gelelektrophorese kompatibel sind. Um auch Immunantworten gegen diese Proteine sicher erfassen zu können, wurden zusätzlich 1D Western Blots mit angereicherten Membranproteinen durchgeführt (Kapitel 4.2).

Damit auch Reaktionen gegen konformationsabhängige Epitope erfasst werden können, wurde des Weiteren die IP als Methode angewandt. Zunächst wurde die Präzipitation von Proteinen aus PBL-Lysat mittels Ig aus Kolostrum einer Kontrollkuh mit der Anreicherung durch BNP-Überträgerkolostrum verglichen. Die präzipitierten Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert und anschließend anhand von Progenesis quantitativ ausgewertet. Aufgrund der Vielzahl identifizierter Proteine fügten wir als Kriterium ein, dass die Proteine mindestens dreifach häufiger durch BNP-Ig angereichert werden mussten, um als relevantes Kandidatenprotein zu gelten. Insgesamt wurden aus dem PBL-Lysat 125 Proteine präzipitiert, von denen 17 dieses Kriterium erfüllten (Tab. 4.4, Proteine 22 - 26, 51 – 61 und 65). Zusätzlich zu den bei BNP targetierten PBL testeten wir die Immunreaktion der BNP-Alloantikörper auf die Zelllinie, auf der das Impfvirus vermehrt wurde (MDBK-Zellen) und die den Impfstoff verunreinigte (Bastian et al., 2011), sowie den auslösenden Impfstoff (PregSure BVD) selbst. Dabei erfüllten das Kriterium der 3fach höheren Anreicherung 23 von 139 Proteinen aus MDBK-Zelllysate (Tab. 4.4, Proteine 27 – 35, 51 – 60 und 62 - 65) und 20 von 118 Proteinen aus dem Impfstoff (Tab. 4.4, Proteine 36 – 50 und 61 – 65).

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse für alle 44 Proteine zusammengefasst, die in den drei Ansätzen entsprechend angereichert wurden. Daraus wird ersichtlich, dass elf Kandidaten sowohl aus PBL als auch aus MDBK präzipitiert wurden (Tab. 4.4,

Proteine 51 – 61 und 65). Zytokeratin-2e (Tab. 4.4, Protein 61) wurde aus dem Impfstoff und PBL-Lysat präzipitiert und Zytokeratin-10 (Tab. 4.4, Protein 65) überlappte mit PBL- und MDBK-Lysat. Interessanterweise wurden darüber hinaus sieben Proteine lediglich durch BNP-Ig angereichert und nicht durch Kontroll-Ig, dies waren Ubiquitin, Zytokeratin-75, Zytokeratin-17, Aldolase A, Selenium-bindendes Protein 1, ATP-Synthase Untereinheit Beta und Thrombospondin-1.

Anhand der IP konnten insgesamt 44 Alloantigenkandidaten detektiert werden. Drei der angereicherten Proteine wurden vorher bereits anhand der 2D oder 1D Blots detektiert. Diese sind Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Filamin A und Thrombospondin-1. Die Alloreaktivität der BNP-Ig gegen Purin-Nukleosid-Phosphorylase wurde bei den 2D Western Blots im PBL-Proteom festgestellt (Abb. 4.3, 4.4 und Tab. 4.2, Spot 11), während es bei der IP aus dem Impfstoff angereichert wurde (Tab. 4.4, Protein 48; etwa 57fache Anreicherung). Filamin A wurde bei den 1D Western Blots durch BNP-Ig detektiert (Abb. 4.5 und Tab. 4.3, Banden 15 und 16) und bei der IP durch das Überträgerkolostrum aus dem Impfstoff präzipitiert (Tab. 4.4, Protein 47, etwa 17fache Anreicherung). Thrombospondin-1 wurde im Vorfeld bei den 2D Western Blots mit Thrombozytenlysat durch BNP-Ig gebunden (Abb. 4.1, 4.2 und Tab. 4.1, Spot 1), in der IP wurde es aus der MDBK-Zellprobe angereichert (Tab. 4.4, Protein 35), wobei eine relevante Präzipitation ausschließlich durch BNP-Ig erfolgte, nicht durch die Kontrolle.

Zum Abschluss des Alloantigenkandidatenscreenings wurden 34 Proteine als Kandidaten identifiziert, die alle als potenzielle Alloantigene in Frage kommen (13 aus 2D Blots, vier weitere aus Membranproteinblots und 17 aus der PBL-IP).

Ergebnisse

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	PBL			MDBK			PregSure BVD		
			Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f	Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f	Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f
22	Granulin	ENSBTAP00000025056	11	814	3,2						
23	Microtubule-associated Protein 4	ENSBTAP00000021045	6	305	7,7						
24	Peptidoglycan Recognition Protein 1	ENSBTAP00000003414	7	504	9,3						
25	Ubiquitin	ENSBTAP00000010176	1	44	Unendlich						
26	Zytokeratin-75	ENSBTAP00000038262	3	111	Unendlich						
27	Zytokeratin-14	ENSBTAP00000036252				2	103	3,0			
28	40S Ribosomal Protein S5	ENSBTAP00000021268				2	105	4,0			
29	40S Ribosomal Protein S25	ENSBTAP00000027148				2	86	5,0			
30	Lactotransferrin	ENSBTAP00000001704				6	318	19,5			
31	Myosin Regulatory Leichte Kette 9	ENSBTAP00000015248				6	349	22,4			
32	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Untereinheit 1	ENSBTAP00000040899				1	61	69,2			
33	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1	ENSBTAP00000002033				1	30	190,4			
34	Peptidyl-prolyl Cis-trans Isomerase B	ENSBTAP00000022378				1	47	213,1			
35	Thrombospondin-1	ENSBTAP00000002600				1	46	Unendlich			
36	ADP/ATP Translokase	ENSBTAP00000017042							1	42	3,2
37	Calreticulin	ENSBTAP00000020111							1	59	4,0
38	Endopin 2	ENSBTAP00000011576							1	88	4,1
39	PDIA6 Protein	ENSBTAP00000002508							1	61	4,4
40	Macrophage-capping Protein	ENSBTAP00000007150							2	77	4,6
41	60S Ribosomal Protein L7a	ENSBTAP00000015358							2	125	4,6
42	CP Protein	ENSBTAP00000016137							1	67	4,8
43	Alpha-S2-casein	ENSBTAP00000006590							1	39	5,5

Ergebnisse

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	PBL			MDBK			PregSure BVD		
			Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f	Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f	Identifizierte Peptide ^d	Aussage-wahrscheinlichkeit ^e	BNP- / Kontrolle ^f
44	Keratin, Type II Cytoskeletal 59 kDa, Component IV	ENSBTAP00000040129							3	163	6,4
45	Ras-related Protein Rab-6A	ENSBTAP00000000027							1	48	8,8
46	Prohibitin	ENSBTAP00000022759							1	40	16,2
47	Filamin A	ENSBTAP00000030179							1	55	16,5
48	Purin-Nukleosid-Phosphorylase	ENSBTAP00000016346							1	54	56,9
49	Moesin	ENSBTAP00000017503							2	77	141,1
50	Aldolase A	ENSBTAP00000017177							1	112	Unendlich
51	Beta-defensin 10	ENSBTAP00000046778	3	132	6,6	3	132	7,5			
52	Platelet Factor 4	ENSBTAP00000015874	1	59	4,1	1	59	9,8			
53	Albumin	ENSBTAP00000022763	11	746	18,6	11	746	23,3			
54	Cathelicidin-2	ENSBTAP00000034497	2	131	8,6	2	131	26,2			
55	Pyroglutamin-5-carboxylat Synthetase	ENSBTAP00000015703	1	48	10,6	1	48	57,5			
56	Beta-defensin 403	ENSBTAP00000022881	1	53	5,5	1	53	87,5			
57	60S Ribosomal Protein L37a	ENSBTAP00000005015	1	76	149,1	1	76	156,2			
58	Quiescin Q6 Sulfhydryl Oxidase 1	ENSBTAP00000018869	2	73	19,4	2	73	2598,4			
59	Zytokeratin-17	ENSBTAP00000008948	4	234	Unendlich	4	234	3,6			
60	Selenium-bindendes Protein 1	ENSBTAP00000010644	1	53	Unendlich	1	53	Unendlich			
61	Zytokeratin-2e	ENSBTAP00000038253	5	333	17,4				7	181	4,6
62	Zytokeratin-19	ENSBTAP00000006450				2	108	56,4	2	118	2,1
63	Non-classical MHC Class I Antigen	ENSBTAP00000021451				1	78	2903,5	1	38	14,7
64	ATP-Synthase Untereinheit Beta, mitochondrial	ENSBTAP00000017710				1	39	Unendlich	1	31	13,1
65	Zytokeratin-10	ENSBTAP00000017139	7	452	86,6	7	452	3,3	10	608	3,7

Tab. 4.4: Proteine, die durch kolostrale Ig von BNP-Überträgerkühen aus PBL-Lysat, MDBK-Zelllysate und PregSure BVD immunpräzipitiert und massenspektrometrisch identifiziert wurden.

a) Fortlaufende Nummer, b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Anzahl der Peptide, die aus der entsprechenden Probe für das Protein identifiziert werden konnten, e) Kumulativer Aussagewahrscheinlichkeitswert (Ionen-Punktzahl), wie von Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) gegeben (addiert für alle signifikant identifizierten Peptide des Proteins). Dieser Wert ist der negativ dekadische Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem Treffer um ein Zufallsereignis handelt. In diesem Fall war ein Wert von mehr als 30 für ein einzelnes Peptid signifikant (** $p < 0,01$). f) Faktor, der sich aus den kumulativen Peptidintensitäten der durch BNP Überträgerkolostrum präzipitierten Proteine dividiert durch die kumulativen Peptidintensitäten der durch Kolostrum einer Kontrollkuh präzipitierten Proteine ergibt (gemäß Quantifizierung in Progenesis). In die Tabelle wurden Kandidaten aufgenommen, die mit Ig von BNP-Überträgern im Vergleich zur Negativkontrolle mindestens 3fach angereichert wurden. Unendlich bedeutet, dass das Protein nur durch BNP-Überträger-IgG präzipitiert wurde.

4.4 Nachweis von MDBK-Zellrückständen in der assoziierten BVD-Vakzine

Um die Liste mit zahlreichen Kandidatenproteinen einzuengen, wurden der mit BNP assoziierte Impfstoff, PregSure BVD, sowie MDBK-Oberflächenproteine näher analysiert. Da die Produktion von Alloantikörpern der Überträgerkühe auf der Verunreinigung des Impfstoffs durch MDBK-Zellbestandteile beruht, müssen diese die pathogenetisch relevanten Antigene exprimieren und so auch in die Vakzine gelangt sein. Nach Immunisierung der empfänglichen Rinder mit dem bei ihnen nicht vorhandenen Antigen in Kombination mit einem Gefahrensignal (in dem Fall das im Impfstoff vorhandene Adjuvans), bildeten die BNP-Überträgertiere die pathogenetisch relevanten Alloantikörper. Bei der Mehrzahl der mit PregSure BVD immunisierten Rinder ist das Antigen auf den eigenen Thrombozyten und PBL exprimiert und dementsprechend unterblieb die Immunreaktion. Deshalb gehen wir davon aus, dass der Impfstoff eine kanonische Sequenz des Alloantigens enthält und die Überträgertiere eine seltene Isoform davon exprimieren. Als Negativkontrolle für den BNP-Überträgerimpfstoff diente eine BVDV-Lebendvakzine (Vacoviron FS, Merial, Hallbergmoos), anhand welcher typische BVD-Vakzine-Bestandteile identifiziert werden konnten und die sich somit als Alloantigene ausschließen ließen.

4.4.1 Proteinzusammensetzung von PregSure BVD gleicht der von MDBK-Zelllysat

Zunächst analysierten wir die Proteinkonzentration der jeweils applizierten Menge der beiden Impfstoffe und ihre Proteinzusammensetzung sowie die der MDBK-Zellen. Hierzu wurden die Impfstoffe und MDBK-Lysat in einem zehnpromzentigen Gel mittels 1D SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie nach Kang et al. (Kang et al., 2002) sowie anhand einer Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 4.6.b – d).

In der Färbung mit kolloidalem Coomassie konnte eine unterschiedliche Proteinkonzentration zwischen der BVDV-Lebendvaccine Vacoviron FS und dem mit BNP-assoziierten Impfstoff PregSure BVD bestätigt werden, während in der Silberfärbung ein erheblicher Unterschied in der Proteinzusammensetzung der beiden Vakzinen dargestellt werden konnte (Abb. 4.6, b und c). Außerdem zeigte die Zusammensetzung von PregSure BVD eine erhebliche Übereinstimmung mit MDBK-Zellen, wie die Silberfärbung von MDBK-Zelllysat verdeutlichte (Abb. 4.6.c und d).

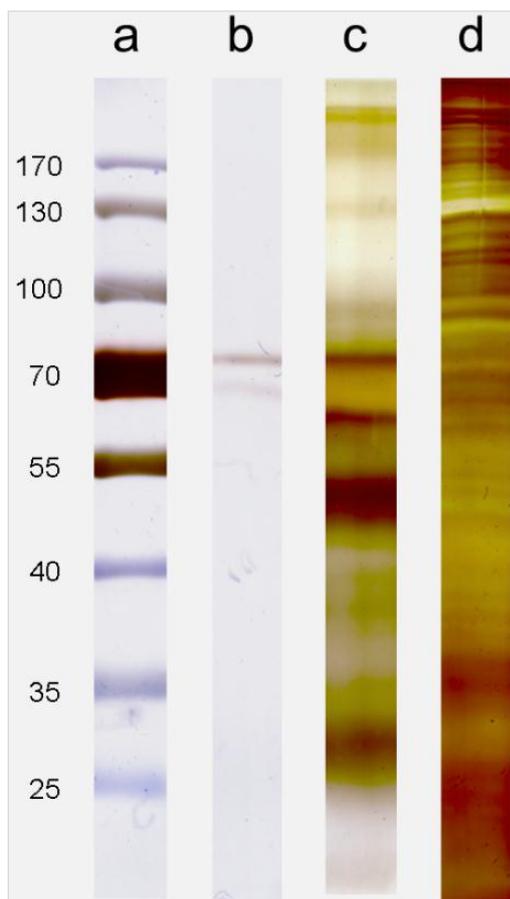


Abbildung 4.6 Proteinzusammensetzung von zwei BVD-Vakzinen und MDBK-Zelllysat. Eine Proteinmenge von 50 µg aus PregSure BVD, das äquivalente Volumen Vacoviron FS und 50 µg Protein aus MDBK-Zelllysat wurden in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinzusammensetzung anhand Silberfärbung sichtbar gemacht. In der Kontrollvaccine Vacoviron FS (b) sind kaum Banden zu sehen. PregSure BVD (c) hingegen zeigte ein großes Spektrum an Banden über das ganze Gel verteilt. MDBK-Zelllysat (d) zeigte ebenfalls ein großes Spektrum an Proteinen und glich in seiner Zusammensetzung dem mit BNP-assoziierten Impfstoff (c). a) Molekulargewichtsmarker, b) Vacoviron FS, c) PregSure BVD, d) MDBK-Zelllysat.

4.4.2 Mehrere Alloantigenkandidaten sind in PregSure BVD vorhanden

Da nur Proteine als pathogenetisch relevante Alloantigene in Frage kommen, die auch im Impfstoff vorhanden sind, analysierten wir anschließend die beiden BVD-Impfstoffe und das Oberflächenproteom von MDBK-Zellen mit dem Massenspektrometer. Die Analyse ermöglichte uns einen Abgleich zwischen unserer Kandidatenliste sowie den im Impfstoff und bei MDBK-Zellen enthaltenen Proteinen. Wie im Vergleich zu einer Lebendvakzine erwartet, konnte in PregSure BVD eine deutlich höhere Anzahl an Proteinen identifiziert werden (etwa viermal mehr), als in der Kontrollvakzine (43 Proteine). In PregSure BVD und auf MDBK-Zellen wurde auch nach Abzug der Proteine aus der Kontrolle noch eine vergleichbare Anzahl an Proteinen detektiert (142 Proteine in PregSure BVD und 154 Proteine auf MDBK-Zellen).

Insgesamt konnten fünf der 34 Kandidatenproteine durch die Proteomanalyse in PregSure BVD gefunden werden. Gamma-Aktin (Aktin, zytoplasmatisch 2), Hitzeschockprotein Beta-1 und Purin-Nukleosid-Phosphorylase wurden durch Ig von Überträgerkühen in den 2D Western Blots auf PBL-Lysat gebunden (Abb. 4.3, 4.4 und Tab.4.2, Spot 9, 10 und 11). Thrombospondin-1 wurde anhand von 2D Western Blots aus Thrombozytenlysat detektiert (Abb. 4.1, 4.2 und Tab. 4.1, Spot 1) und aus MDBK-Zelllysat präzipitiert (Anreicherung nur durch BNP-Ig; Tab. 4.4, Protein 35). Eine Bindung von BNP-Ig an Filamin A wurde bereits in 1D Western Blots nachgewiesen (Abb. 4.5 und Tab. 4.3, Banden 15 und 16). In der IP wurde es aus PregSure BVD 16,5fach angereichert (Tab. 4.4, Protein 47). Bis auf Hitzeschockprotein Beta-1 und Purin-Nukleosid-Phosphorylase konnte für alle Kandidaten eine Expression durch MDBK-Zellen nachgewiesen werden.

4.5 Differenzielle Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche von Thrombozyten und PBL

Um zu entscheiden, welches der 34 BNP-Alloantigenkandidaten als pathogenetisch relevantes Antigen in Frage kommt, wurde nachfolgend untersucht, ob ein Unterschied in der Alloantigenexpression zwischen BNP-Überträgern und Kontrollkühen vorlag. Die Alloantikörperbildung beruht darauf, dass der mit MDBK-Zellbestandteilen kontaminierte Impfstoff bei einigen der geimpften Rinder eine Immunreaktion auslöst. Unsere Studien hatten bereits gezeigt, dass Alloantikörper in den BNP-Überträgerkühen zirkulieren (Serum- und Kolostrumreaktivitäten der BNP-Überträgerkühe zeigten die gleiche Reaktivität). Da bei den BNP-Überträgerkühen keinerlei klinische Symptome auftreten, muss davon ausgegangen werden, dass sie das Alloantigen oder zumindest das Ziel-Epitop selbst nicht exprimieren.

Um dies zu untersuchen, führten wir mit BNP-Überträgerkühen sowie mit PregSure BVD-geimpften Kontrollkühen, die keine BNP bei ihren Kälbern ausgelöst hatten, eine quantitative, differenzielle Proteomanalyse ihrer Thrombozyten und PBL durch. Die Oberflächenproteine wurden anschließend massenspektrometrisch identifiziert und Unterschiede in der Expression zwischen beiden Gruppen quantitativ ausgewertet.

Auf der Oberfläche von Rinder-Thrombozyten konnten insgesamt 171 Proteine identifiziert werden. Zwölf Proteine waren beim Vergleich der Expression auf Thrombozyten von Überträgern und von Kontrollen unterschiedlich exprimiert. Interessanterweise zeigten alle differenziell exprimierten Proteine eine erhöhte Expression auf den Thrombozyten der Überträgerkühe (Tab. 4.5, Proteine 1 – 12). Der Prostaglandin F2 Rezeptor Negativ Regulator (Tab. 4.5, Protein 6) wurde außerdem nur auf Thrombozyten von Überträgerkühen exprimiert und nicht bei den Kontrollen detektiert.

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	t-Test ^d	Expression auf Thrombozyten ^e
1	Pyruvat Carboxylase, mitochondrial	ENSBTAP00000026258	0,01	▲
2	Epithelial Membran Protein 3	ENSBTAP00000023976	0,01	▲
3	ATP-abhängige Clp Protease ATP-bindende Untereinheit ClpX, mitochondrial	ENSBTAP00000011038	0,01	▲
4	CD11b (Integrin Alpha M)	ENSBTAP00000054571	0,02	▲
5	Histon H2A	ENSBTAP00000009471	0,03	▲
6	Prostaglandin F2 Rezeptor Negativ Regulator	ENSBTAP00000048973	0,03	▲ ⁺
7	Hitzeschock 70 kDa Protein 8	ENSBTAP00000017497	0,03	▲
8	Histon H3.3	ENSBTAP00000034086	0,04	▲
9	BTB (POZ) Domain Containing Protein 18	ENSBTAP00000054938	0,04	▲
10	Histon H2B	ENSBTAP00000055668	0,05	▲
11	Keratin, Typ II Cytoskeletal 7	ENSBTAP00000021516	0,05	▲
12	Complement C4-A	ENSBTAP00000042856	0,05	▲

Tab. 4.5: Massenspektrometrische Identifikation signifikant differenziell exprimierter Proteine auf Thrombozyten von BNP-Überträgerkühen (n = 3) im Vergleich zu mit PregSure BVD-geimpften Nicht-Überträgern (n = 3).

a) Fortlaufende Nummer, b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Signifikanz der differentiellen Expression der Proteine in den Proben der Überträgertiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (signifikant ab $p \leq 0,05$), e) Expression auf Thrombozyten. Der Pfeil indiziert, dass die Expression des Proteins bei Überträgerkühen im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht ist. ⁺) Das Protein wurde ausschließlich auf Thrombozyten von Überträgertieren detektiert.

Auf der Oberfläche von Rinder-PBL wurden insgesamt 179 Proteine detektiert. Bei 150 Proteinen fand sich keine unterschiedliche Expression zwischen BNP-Überträgertieren und Kontrollen. Neunundzwanzig der Proteine waren dagegen differenziell exprimiert, wobei alle eine erniedrigte Expression auf PBL der BNP-Überträgertiere aufwiesen (Tab. 4.6).

Unter den auf PBL von BNP Überträgerkühen differenziell exprimierten Proteinen waren mehrere Cluster of Differentiation (CD)-Proteine, von denen einige auch wichtige Funktionen bei der Immunantwort und der Gerinnung einnehmen (Tab. 4.6, Proteine 1, 3, 6, 8 - 12, 18, 19 und 29).

Ergebnisse

Nr. ^a	Proteinname ^b	Accession Nummer ^c	t-Test ^d	Expression auf PBL ^e
1	CD5 (T-Zell Oberflächen Glykoprotein)	ENSBTAP00000018258	<0,01	▼
2	Immediate Early Response 3-interacting Protein 1	ENSBTAP00000044053	<0,01	▼
3	CD 43 (Leukosialin)	ENSBTAP00000037201	<0,01	▼
4	CD45 (Tyrosine-Protein Phosphatase, Rezeptor-Typ C)	ENSBTAP00000013320	<0,01	▼
5	Serine/Threonine-Protein Kinase TAO2	ENSBTAP00000023163	0,01	▼
6	CD44	ENSBTAP00000015381	0,01	▼
7	Keratin, Typ I Cytoskeletal 25	ENSBTAP00000040707	0,01	▼
8	CD61 (Integrin Beta-3)	ENSBTAP00000013173	0,01	▼
9	CD58	ENSBTAP00000023836	0,02	▼
10	CD147 (Basigin)	ENSBTAP00000039862	0,02	▼
11	CD29 (Integrin Beta-1)	ENSBTAP00000021156	0,02	▼
12	CD9	ENSBTAP00000019643	0,02	▼
13	Alpha-1-acid Glycoprotein	ENSBTAP00000022991	0,02	▼
14	ATP-Synthase Untereinheit Beta, mitochondrial	ENSBTAP00000017710	0,02	▼
15	Epithelial Membran Protein 3	ENSBTAP00000023976	0,03	▼
16	ATP-abhängige Clp Protease ATP-bindende Untereinheit ClpX, mitochondrial	ENSBTAP00000011038	0,03	▼
17	Low-density Lipoprotein Rezeptor	ENSBTAP00000016342	0,03	▼
18	CD46 (Membran Cofactor Protein Isoform 5)	ENSBTAP00000007107	0,03	▼
19	CD53 (Leukozyten Oberflächen Antigen)	ENSBTAP00000008479	0,03	▼
20	CD62P (P-Selectin)	ENSBTAP00000027661	0,03	▼
21	Synaptonemal Complex Protein 2	ENSBTAP00000041952	0,04	▼
22	Keratin, Typ I Cytoskeletal 16	ENSBTAP00000045066	0,04	▼
23	Desmoplakin	ENSBTAP00000020103	0,04	▼
24	Keratin, Typ II Cytoskeletal 3	ENSBTAP00000054280	0,04	▼
25	Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin	ENSBTAP00000020817	0,05	▼
26	BTB (POZ) Domain Containing Protein 18	ENSBTAP00000054938	0,05	▼
27	Keratin, Typ II Cytoskeletal 1	ENSBTAP00000055471	0,05	▼
28	Hitzeschock 70 kDa Protein 8	ENSBTAP00000017497	0,05	▼
29	CD41 (Integrin Alpha 2b)	ENSBTAP00000010741	0,05	▼

Tab. 4.6: Massenspektrometrische Identifikation signifikant regulierter Proteine auf PBL von BNP-Überträgerkühen (n = 3) im Vergleich zu mit PregSure BVD geimpften Nicht-Überträgern (n = 3).

a) Fortlaufende Nummer, b) Proteinname, c) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, 2013) geführt (<http://www.ensembl.org/index.html>), d) Signifikanz der differentiellen Expression der Proteine in den Proben der Überträgertiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (signifikant ab $p \leq 0,05$), e) Expression auf PBL. Der Pfeil indiziert, dass die Expression des Proteins bei Überträgerkühen im Vergleich zu Kontrolltieren erniedrigt ist.

Drei der Proteine, Hitzeschock 70 kDa Protein 8, Epithelial Membran Protein 3 und mitochondriale ATP-abhängige Clp Protease ATP-bindende Untereinheit ClpX (Tab. 4.6, Proteine 7, 10 und 11; Tab. 4.6; Proteine 2, 7 und 8), waren sowohl auf Thrombozyten als auch auf PBL differenziell exprimiert, allerdings in verschiedene Richtungen. Von den 34 Alloantigenkandidaten konnte nur für ein Protein, CD41 (Tab. 4.6, Protein 29), eine signifikant niedrigere Expression auf PBL von BNP-Überträgerkühen nachgewiesen werden.

4.6 Nähere Charakterisierung des von Ig targetierten Alloantigens

Als nächstes sollte nun aus der Liste der Alloantigenkandidaten das pathogenetisch relevante Alloantigen verifiziert werden. Für die pathogenetische Relevanz eines Alloantigens bei der BNP legten wir folgende Bedingungen fest: Es muss a) im Impfstoff vorhanden sein, b) das zur Alloantikörperbindung passende Expressionsmuster aufweisen und c) ein Funktionsausfall des Antigens die beschriebenen Symptome bei neugeborenen Kälbern hervorrufen können.

Punkt a) wurde anhand der unter Kapitel 4.4 zusammengefassten Experimente abgearbeitet und führte zur Identifikation von mehreren Proteinen als relevante BNP-Alloantigenkandidaten. Um das passende Expressionsmuster näher zu charakterisieren, untersuchten wir daraufhin spezifisch die Alloantikörperbindung von BNP-Ig an Leukozyten und MDBK-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunzytochemie.

4.6.1 Leukozytenpopulationen weisen unterschiedlich starke Expression des Alloantigens auf

Dass das Antigen auf allen Thrombozyten exprimiert sein muss, wird daraus ersichtlich, dass diese zu Beginn der Erkrankung sofort und sehr stark abfallen. Bei immunzytologischen Untersuchungen konnte eine Bindung der BNP Ig an alle Thrombozyten und unterschiedlich stark an einzelne Leukozytenpopulationen nachgewiesen werden (Assad et al., 2012). Um zu untersuchen, wie stark die Alloantikörper an die Zelloberfläche verschiedener PBL-Populationen binden, wurde dies mit Durchflusszytometrie untersucht und mit den entsprechenden Kontrollen (jeweils 17 Seren pro Gruppe) verglichen.

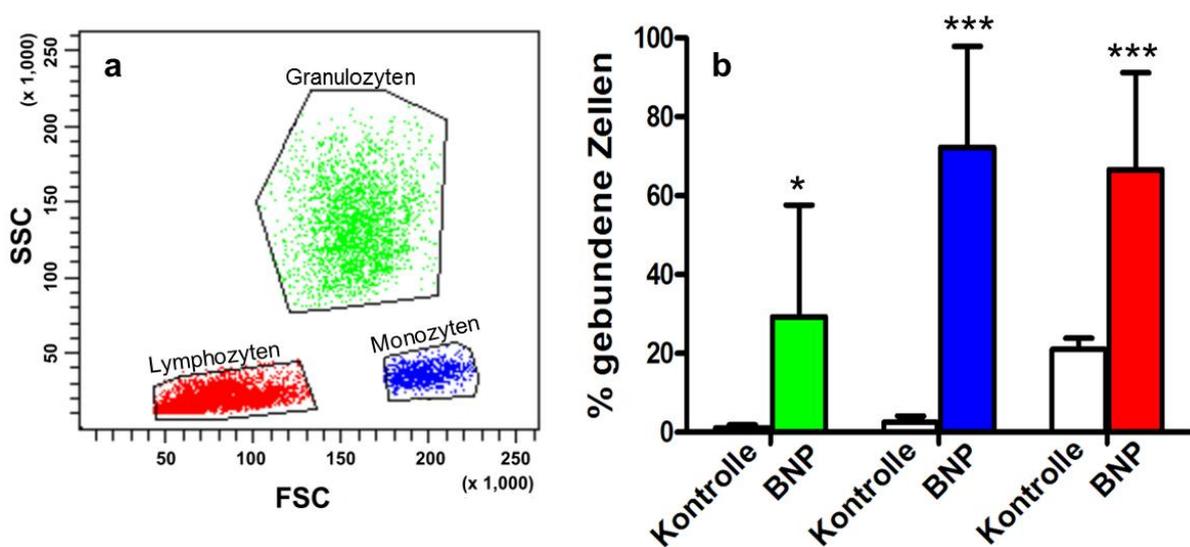


Abb. 4.7: PBL eines Rindes (a) mit gegateten Granulozyten (grün), Lymphozyten (rot) und Monozyten (blau). Das Säulendiagramm (b) stellt die prozentuale Bindung durch Ig aus Serum von Kontrollen (weiß) und BNP-Überträgern (farbig entsprechend der Zellpopulationen) an die Oberfläche der einzelnen PBL-Populationen dar. Während die BNP-Ig im Durchschnitt an 29,3% der Granulozyten banden (grün, SD: 28,4%), wurden knapp drei Viertel der Monozyten (blau) und zwei Drittel der Lymphozyten (rot) durch BNP-Ig gebunden. Die Bindungshäufigkeit der BNP-Ig an die Oberfläche von Granulozyten (grün) ist verglichen mit den entsprechenden Kontrollen signifikant (Mann-Whitney-Test, * $p \leq 0,05$) und die Bindung an Monozyten (blau, MW: 72,3%, SD: 25,6%) und Lymphozyten (rot, MW: 66,6%, SD: 24,3%) hoch signifikant (Mann-Whitney-Test, *** $p \leq 0,001$).

In Abbildung 4.7.b ist zu sehen, dass BNP-Ig signifikant häufiger an alle Leukozytenpopulationen banden (Mann-Whitney-Test; Granulozyten: * $p \leq 0,05$; Monozyten und Lymphozyten *** $p \leq 0,001$), die Kontroll-Ig banden hingegen nicht. Dabei zeigten die BNP-Ig interessanterweise nie eine Bindung an alle Zellen einer Population. Die Bindung von Ig der einzelnen Überträgerkühe an Granulozyten (Abb. 4.7.b, grüne Säule) variierte (MW: 29,3%; SD: 28,4%). Monozyten (Abb. 4.7.b, blaue Säule) wurden am stärksten von den BNP-Ig targetiert (MW: 72,3%, SD: 25,6%), aber auch zwei Drittel der Lymphozyten (Abb. 4.7.b, rote Säule; MW: 66,6%, SD: 24,3%) exprimierten das Alloantigen auf ihrer Oberfläche. Um zu differenzieren, ob die unterschiedliche Bindung an Lymphozyten auf einer unterschiedlichen Expression des Alloantigens auf den einzelnen Lymphozytensubpopulationen beruht, wurden diese näher untersucht.

4.6.2 Expressionsintensität des Alloantigens variiert zwischen den einzelnen Lymphozytensubpopulationen

Anhand von Doppelfärbungen wurde analysiert, an wieviel Prozent der T-Zellsubpopulationen, $CD4^+$ und $CD8^+$, und der B-Zellen ($CD21^+$) die BNP-Alloantikörper bevorzugt binden. In Abbildung 4.8 sind die Isotypkontrolle (a) und die Einzelfärbungen der Lymphozyten zur Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen (b), $CD8^+$ T-Zellen (c) und $CD21^+$ B-Zellen (d) dargestellt. Dabei waren die $CD4^+$ T-Zellen die größte Population (39%), die $CD8^+$ T-Zellen waren mit durchschnittlich etwa einem Viertel der Lymphozyten die kleinste der drei Subpopulationen und $CD21^+$ B-Zellen machten 30% der Lymphozyten aus.

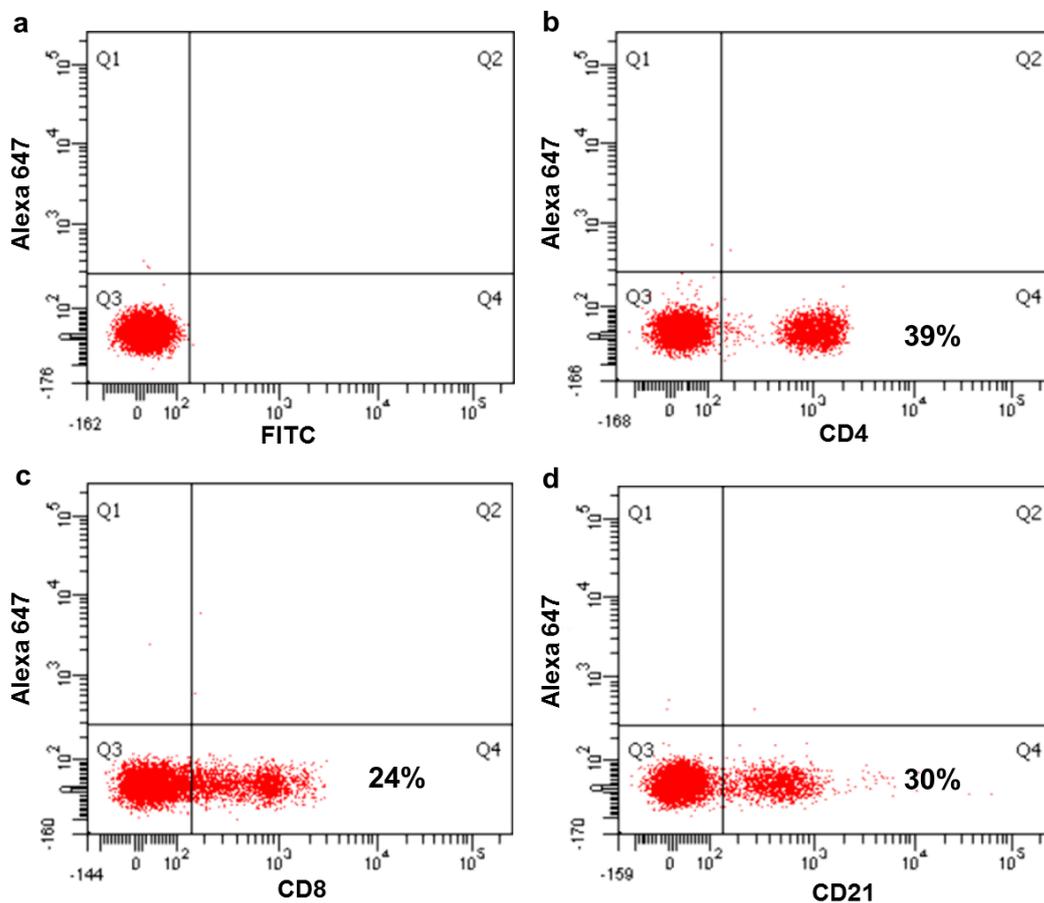


Abb. 4.8: Lymphozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie. Die Zellmarker sind mit einem sekundären FITC-markierten Antikörper dargestellt. Ereignisse im Quadranten 3 (Q3) zeigen alle negativen Ereignisse an, Q4 zeigt die FITC⁺ Ereignisse. Die Abbildungen stellen die Messungen der im Lymphozytengate befindlichen Ereignisse dar. a) Isotypkontrolle (Q3), b) $CD4^+$ Lymphozyten (Q4), c) $CD8^+$ Lymphozyten (Q4), d) $CD21^+$ Lymphozyten (Q4).

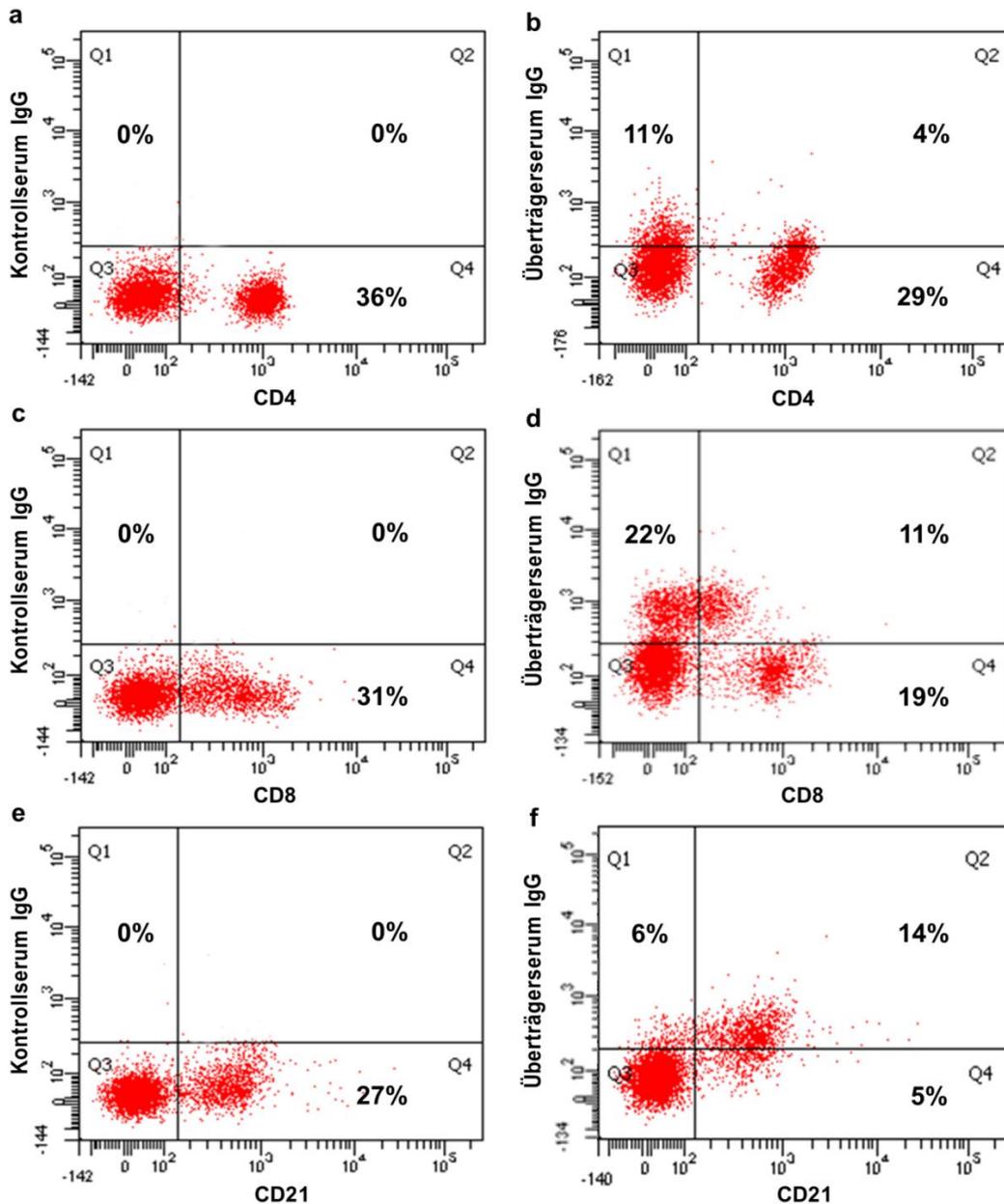


Abb. 4.9: Bindung von BNP-Alloantikörpern an Lymphozytensubpopulationen. Ereignisse im Q1 zeigen eine Einfachbindung der Streptavidin-Alexa 647 gelabelten Ig an die jeweils für die entsprechende Subpopulation negativen Lymphozyten. In Q2 sind die doppelt positiven Ereignisse dargestellt, also die Zellen der jeweiligen Population, die durch BNP-Alloantikörper gebunden wurden. Q3 zeigt alle negativen Ereignisse, Q4 die durch FITC markierten Subpopulationen, die das Antigen nicht exprimieren. Die Ig von Kontrolltieren banden nicht an Lymphozyten (a, c und e, Q1 und Q2). Der Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten, der durch Immunglobuline aus Überträgerseren gebunden wurde, war gering (b, Q2 und Q4), wohingegen etwa die Hälfte der CD8⁺ T-Lymphozyten eine Bindung aufwies (d, Q2 und Q4). Am häufigsten wurden CD21⁺ B-Zellen durch BNP-Ig gebunden (f, Q2 und Q4).

Um die Expression des Alloantigens auf den einzelnen Lymphozytensubpopulationen zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen analysiert, anhand derer sich die Anzahl der Zellen einer Subpopulation, die durch BNP-Ig gebunden wurden, berechnen ließ. Die Alloantikörper der BNP-Überträgerkühe banden nur sehr gering an $CD4^+$ T-Lymphozyten (Abb. 4.9, b, Q2), mittelstark an $CD8^+$ T-Lymphozyten (Abb. 4.9, d, Q2) und an fast alle $CD21^+$ B-Zellen (Abb. 4.9, f, Q2).

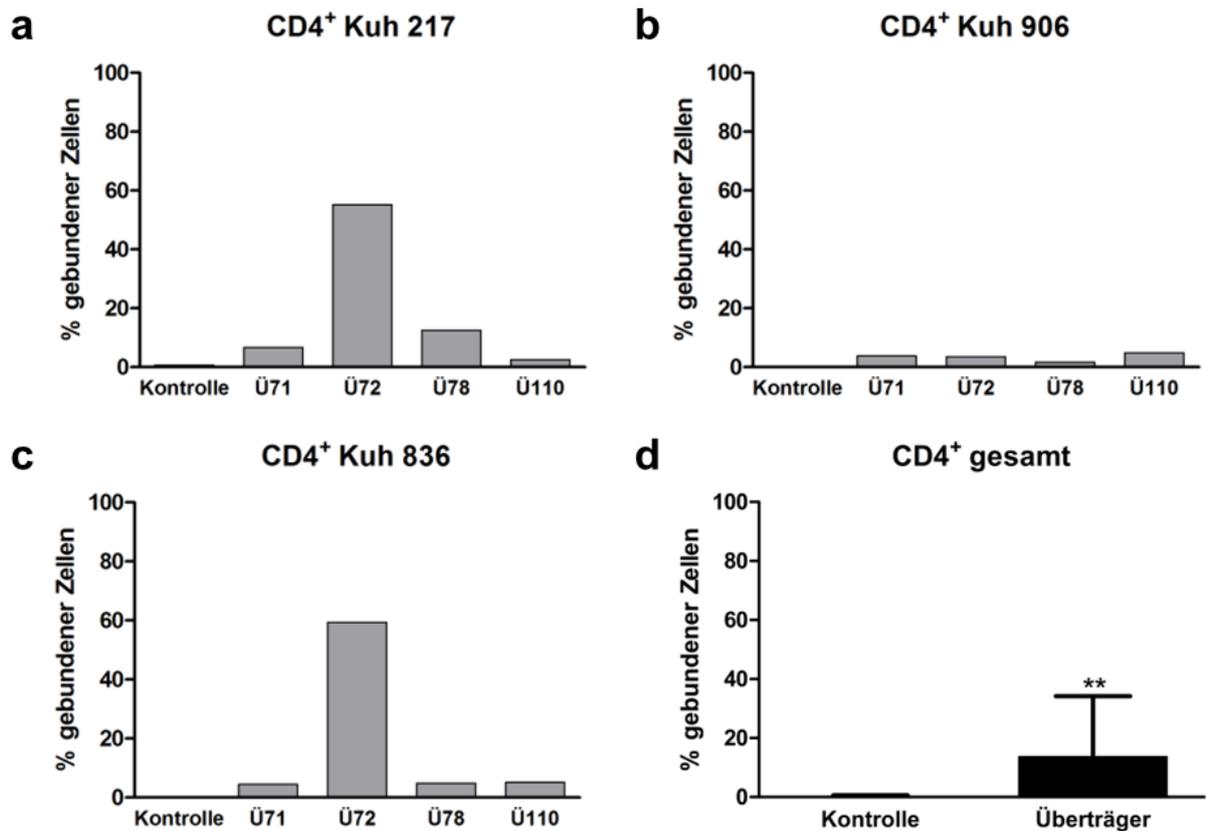


Abb. 4.10: Übersicht über die Bindung von Ig aus Serum von Kühen an die Oberfläche von $CD4^+$ T-Lymphozyten.

Die y-Achse jedes Diagramms gibt in Prozent an, an wie viele $CD4^+$ T-Zellen des jeweiligen Spendertieres (a: Kuh 217, b: 906, c: 836) die Ig verschiedener getesteter Tiere (Negativkontrolle, Überträgertiere 71, 72, 78 und 110) banden. Die Bindung durch Immunglobuline der einzelnen Überträgerkühe war teilweise sehr unterschiedlich. Einerseits schwankten die Werte für die Bindung von Ig unterschiedlicher Überträgerkühe an die Zellen der gleichen Kuh (a, b, c, jeweils die Höhe der grauen Balken in einem Diagramm). Andererseits schwankten die Werte der Bindung von Ig derselben Überträgerkuh an die Zellen verschiedener Kühe (a, b, c, je der entsprechende graue Balken in den verschiedenen Diagrammen). d) Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung für die Bindung von Ig der Überträgerseren ($n = 4$) an $CD4^+$ T-Zellen gesunder Kühe (** $p \leq 0,01$).

Anhand der erstellten Balkendiagramme ließ sich verdeutlichen, dass es innerhalb der Überträgergruppe zu großen Schwankungen der Bindungsintensität an die einzelnen Subpopulationen kam (Abb. 4.10., 4.11, 4.12, graue Balken). Dabei zeigte nicht nur die Bindung von Ig verschiedener Überträger an die CD4⁺ T-Zellen der gleichen Kuh Unterschiede (Abb. 4.10.a, b und c, jeweils die Höhe der grauen Balken in einem Diagramm), sondern die Ig desselben Überträgers banden zudem an unterschiedlich viele CD4⁺ T-Lymphozyten der verschiedenen Spendertiere (vergleiche Überträgerserum 72). Während die Alloantikörper der Überträger in einem ähnlichen Verhältnis an Lymphozyten der Spenderkühe Nr. 217 und 836 gebunden hatten, reagierten sie mit den Zellen von Kuh Nr. 906 so gut wie gar nicht. Obwohl die Bindung der BNP-Ig an CD4⁺ T-Zellen nicht sehr stark war und bei den einzelnen Proben so große Unterschiede aufwies, waren die Ergebnisse in der Summe deutlich signifikant (Abb. 4.10.d, MW: 13,7%, SD: 19,6%; Mann-Whitney-Test, ** $p \leq 0,01$).

Das Gleiche konnte bei der Bindung von BNP-Ig an CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.11). Die Ig aus Überträgerseren zeigten wieder eine deutlich signifikante Bindung an die Oberfläche von CD8⁺ T-Zellen (MW: 36,6%; SD: 16,3%; Mann-Whitney-Test: ** $p \leq 0,01$; Abb. 4.11.d). Während sich die Bindung der einzelnen BNP-Ig an Zellen der Kühe 217 und 836 sehr ähnelten (Abb. 4.11.a und c), unterschieden sich die Bindungen der BNP-Ig an Zellen der Kuh 906 deutlich davon (Abb. 4.11.b). Beispielsweise banden die Überträgertiere Ü71 und Ü110 an circa 40% und die Überträgertiere Ü72 je an knapp 60% und Ü78 je an etwa 20% der Zellen von den Kühen 217 und 836 (Abb. 4.11.a und c). Nur die Ig der Überträgerkuh Ü78 banden in etwa an gleich viele CD8⁺ T-Zellen von Kuh 906, wie an die der Kühe 217 und 836 (Abb. 4.11.b). Die Anzahl gebundener Zellen von Kuh 906 betrug für Ü71 und Ü110 circa ein Drittel mehr (60%, Abb. 4.11.b) als bei den anderen beiden Spendertieren (40%, Abb. 4.11.a und c).

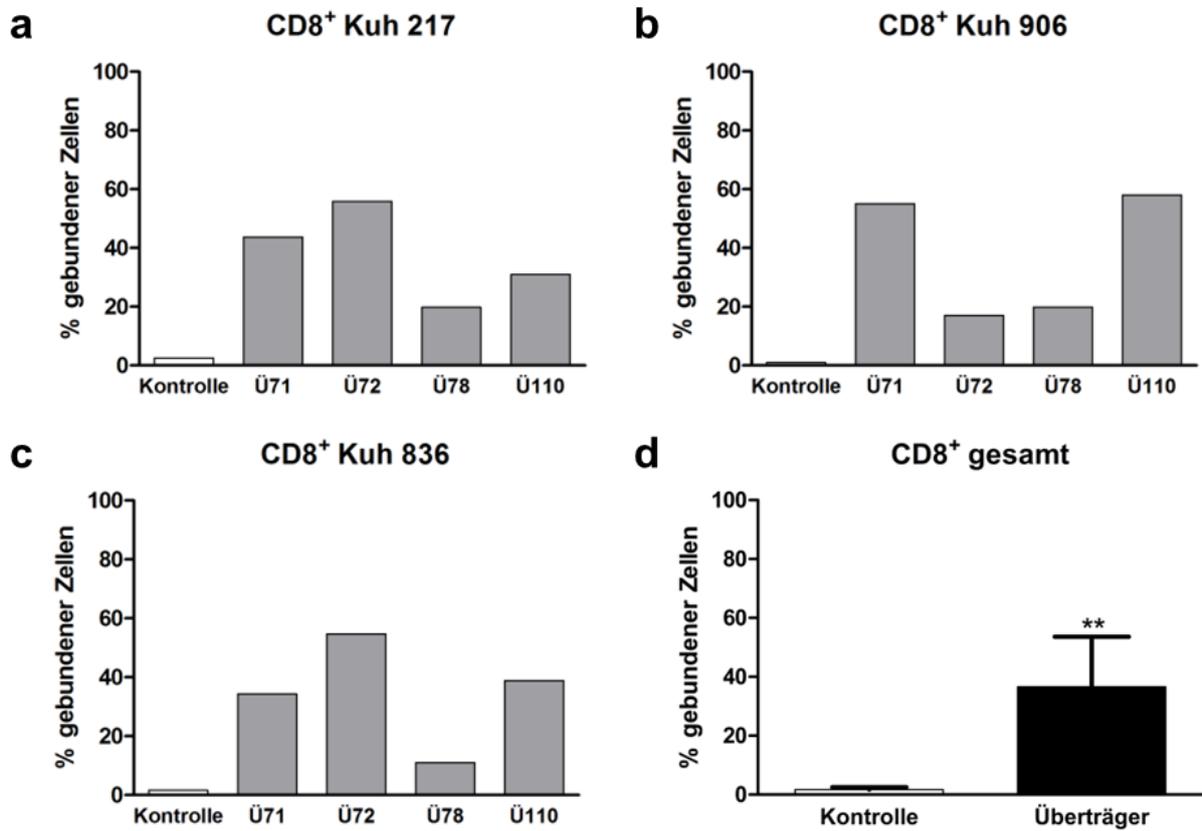


Abb. 4.11: Übersicht über die Bindung von Ig aus Serum von Kühen an die Oberfläche von CD8⁺ T-Lymphozyten.

Die y-Achse jedes Diagramms gibt in Prozent an, an wie viele CD8⁺ T-Zellen des jeweiligen Spendertieres (a: Kuh 217, b: 906, c: 836) die Ig verschiedener getesteter Tiere (Negativkontrolle, Überträgertiere 71, 72, 78 und 110) banden. Die Bindung durch Immunglobuline der einzelnen Überträgerkühe war teilweise sehr unterschiedlich. Einerseits schwankten die Werte für die Bindung von Ig unterschiedlicher Überträgerkühe an die Zellen der gleichen Kuh (a, b, c, jeweils die Höhe der grauen Balken in einem Diagramm). Andererseits schwankten die Werte der Bindung von Ig derselben Überträgerkuh an die Zellen verschiedener Kühe (a, b, c, je der entsprechende graue Balken in den verschiedenen Diagrammen). d) Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung für die Bindung von Ig der Überträgerseren (n = 4) an CD8⁺ T-Zellen von gesunden Kühen (** p ≤ 0,01).

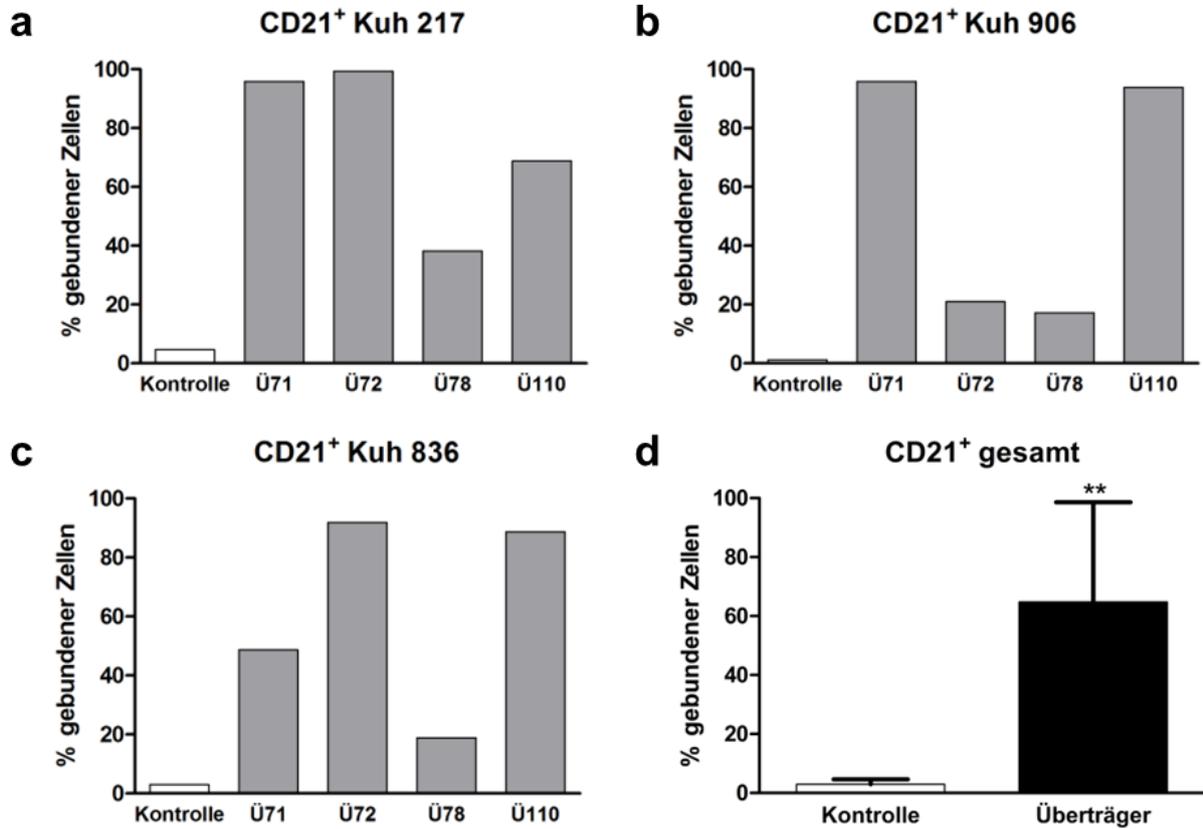


Abb. 4.12: Übersicht über die Bindung von Ig aus Serum von Kühen an die Oberfläche von CD21⁺ B-Lymphozyten.

Die y-Achse jedes Diagramms gibt in Prozent an, an wie viele CD21⁺ B-Zellen des jeweiligen Spendertieres (a: Kuh 217, b: 906, c: 836) die Ig verschiedener getesteter Tiere (Negativkontrolle, Überträgertiere 71, 72, 78 und 110) banden. Die Bindung durch Immunglobuline der einzelnen Überträgerkühe war teilweise sehr unterschiedlich. Einerseits schwankten die Werte für die Bindung von Ig unterschiedlicher Überträgerkühe an die Zellen der gleichen Kuh (a, b, c, jeweils die Höhe der grauen Balken in einem Diagramm). Andererseits schwankten die Werte der Bindung von Ig derselben Überträgerkuh an die Zellen verschiedener Kühe (a, b, c, je der entsprechende graue Balken in den verschiedenen Diagrammen). d) Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung für die Bindung von Ig der Überträgerseren (n = 4) an CD21⁺ T-Zellen von gesunden Kühen (** p ≤ 0,01).

Der Anteil der gebundenen CD21⁺ B-Zellen war auch bei dem Test mit verschiedenen Spendertieren am höchsten (MW: 64,8%, SD: 32,3%; Mann-Whitney-Test: ** $p \leq 0,01$; Abb. 4.12.d) und zeigte demnach, dass die BNP-Ig gegenüber T-Zellen bevorzugt B-Zellen binden. Vergleichbar mit der Bindung von BNP-Ig an die Oberfläche von CD8⁺ Zellen, zeigten die Ig der Überträgerkuh Ü72 eine starke Bindung an CD21⁺ Zellen der Kühe 217 und 836, gefolgt von Ü71 bei Kuh 217, beziehungsweise Ü110 bei Kuh 836 (Abb. 4.12.a und c). Genauso wiesen auch die Ig der Überträgertiere Ü71 und Ü110 wieder die stärkste Bindung an Zellen von Kuh 906 auf (Abb. 4.12.b). Das gesuchte BNP-Alloantigen wird demnach auf der Oberfläche von 13,7% der T-Helferzellen, mehr als einem Drittel der CD8⁺ T-Lymphozyten (36,6%) und circa zwei Drittel der B-Lymphozyten (64,8%) exprimiert. Die Expression schwankt jedoch individuell auf den PBL der Spendertiere.

4.6.3 Das BNP-Alloantigen wird von MDBK-Zellen auf der Plasmamembran und intrazellulär exprimiert

Um eine genaue Lokalisation der Bindung von BNP-auslösenden Ig an der Zelle vornehmen zu können, wurde das Bindungsmuster an MDBK-Zellen immunzytochemisch analysiert. Bei Inkubation mit Kontrollserum oder -kolostrum gab es wie erwartet keine Bindung (Abb. 4.13.c), bei Zellen, die mit Ig von BNP-Überträgerkühen inkubiert wurden, konnte hingegen sowohl eine membranständige, als auch eine intrazytoplasmatische Bindung festgestellt werden (Abb. 4.13.d und f). Demzufolge ist das gesuchte Alloantigen nicht nur auf der Plasmamembran der MDBK-Zellen lokalisiert, sondern wird auch intrazellulär exprimiert.

Anhand der Doppelfärbung von MDBK-Zellen mit BNP-Ig (Abb. 4.13.d, grün) und WGA (Abb. 4.13.e, rot), das an die Plasmamembran von Zellen bindet, konnten wir zeigen, dass das gesuchte Alloantigen membranständig auf der Plasmamembran exprimiert ist (Abb. 4.13, d – f). Neben der Koloalisation mit WGA (Abb. 4.13.f, gelb), banden die Alloantikörper allerdings auch intrazytoplasmatisch (grün, Abb. 4.13.f). Dabei fällt auf, dass das Bindungsmuster eine wolkige Struktur annimmt und das Alloantigen in kleinen Kompartimenten über das ganze Zellinnere verteilt exprimiert ist (Abb. 4.13.d und f, grün).

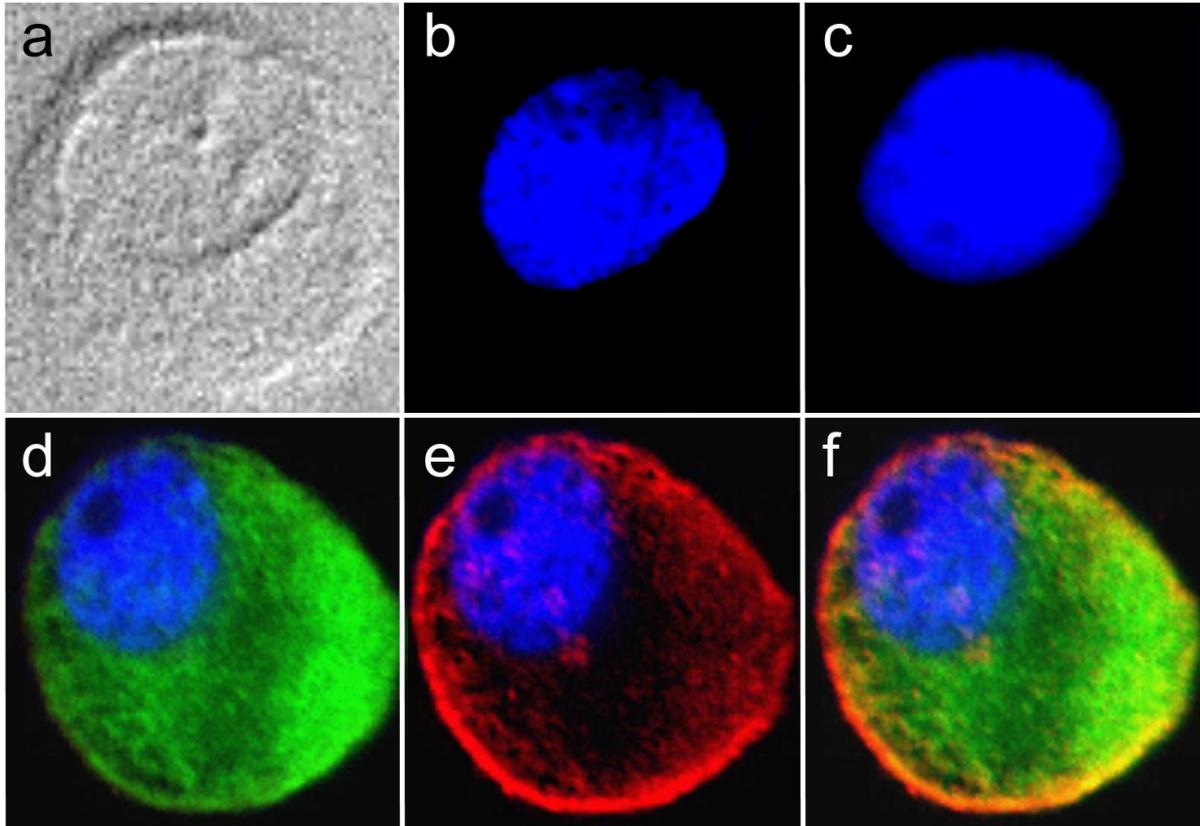


Abb. 4.13: Alloantikörper von BNP-Überträgerkühen binden spezifisch an MDBK-Zellen.

a) Differential-Interferenzkontrast einer MDBK-Zelle. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (b, blau). Die Einzelfärbung mit Ig einer Negativkontrollkuh (c) zeigte keine Bindung an MDBK-Zellen. BNP-Ig (d: grün und f: grün und gelb) banden hingegen an MDBK-Zellen. Eine Färbung der Plasmamembran erfolgte mit WGA (e und f: rot). Die Überlagerung von d und e (f) zeigt die Kolokalisation des Alloantigens an der Plasmamembran (gelb) sowie zusätzlich eine intrazytoplasmatische Bindung der BNP-Ig (grün).

4.7 Eingrenzung der potenziellen Alloantigenkandidaten aus einer Vielzahl an alloreaktiven Proteinen

Um anschließend zu identifizieren, welches dieser Kandidatenproteine funktionell charakterisiert werden soll, wurden vorab mehr Erkenntnisse zu den Charakteristika des Alloantigens gewonnen. Antigene, die nicht in das Profil passen, können so im weiteren Verlauf ausgeschlossen werden.

Dazu wurde das Expressionsmuster auf MDBK-Zellen näher analysiert, das sowohl eine intrazytoplasmatische Expression des Alloantigens als auch eine Verteilung an der Plasmazellmembran zeigte. Das Alloantigen wird außerdem unterschiedlich stark auf PBL von Rindern exprimiert (Abb. 4.7), auf 29,3% der Granulozyten (SD: 28,4%), auf 72,3% der Monozyten (SD: 25,6%), auf 13,7% CD4⁺ T-Lymphozyten (SD: 19,6%), auf 36,6% CD8⁺ T-Lymphozyten (SD: 16,3%) und auf 64,8% der B-Lymphozyten (SD: 32,3%). Das Bindungsmuster wird noch deutlich komplexer, wenn die unterschiedlich starke Bindung verschiedener BNP-Überträger an dieselbe Spenderkuh (Abb. 4.10 – 12) und die offensichtlich unterschiedlich ausgeprägte Expression des Antigens zwischen den Spenderkühen mit einbezogen werden.

Zusätzlich wurde eine differenzielle Proteomanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob ein Unterschied bei der Proteinexpression von BNP-Kühen und Kontrollen vorliegt und einer der BNP-Alloantigenkandidaten unterschiedlich exprimiert wird. Denn wenn dieses Alloantigen bei den BNP-Überträgern selbst nicht exprimiert wird, könnte dies die Bildung von Antikörpern gegen die kanonische Sequenz des Alloantigens erklären. Es ließ sich jedoch keine differenzielle Expression unserer Alloantigenkandidaten bestätigen. Das Fehlen eines bestimmten Epitopes bei BNP-Überträgerkühen kann bei dieser Analyse allerdings nicht nachgewiesen werden.

Proteinname ^a	Accession Nummer ^b	Immunreaktion in		Im Impfstoff vorhanden
		2D	1D	
Gamma-Aktin (Aktin, zytoplasmatisch 2)	ENSBTAP00000008132	x		x
Hitzeschockprotein Beta-1	ENSBTAP00000015883	x		x
Purin-Nukleosid-Phosphorylase	ENSBTAP00000016346	x		x
Filamin A	ENSBTAP00000030179		x	x
Thrombospondin-1	ENSBTAP00000002600	x		x

Tab. 4.7: Eingeengte Liste potenzieller Alloantigenkandidaten. Es sind Proteine gelistet, die bei der Alloantigensuche detektiert wurden und im Impfstoff vorkommen. a) Proteinname, b) Identifikationsnummer des identifizierten Proteins, wie in der Ensembl-Datenbank (Version 70, 2013) (<http://www.ensembl.org/index.html>) geführt. x = Das entsprechende Protein wurde detektiert.

Tabelle 4.7 stellt das Ergebnis dieser Arbeit dar. Aufgelistet sind alle fünf Alloantigenkandidaten, die den Anspruch erfüllen, durch eine Immunreaktion in der Alloantigensuche detektiert worden zu sein und im Impfstoff vorzukommen.

5 DISKUSSION

Die BNP ist eine alloimmun-mediierte Erkrankung neugeborener Kälber, die durch die Aufnahme von Alloantikörpern mit dem Kolostrum ausgelöst wird (Bridger et al., 2011, Friedrich et al., 2011, Pardon et al., 2011, Schroter et al., 2011). Aufgrund einer Immunisierung der Mutterkühe mit einem ungenügend aufgereinigten Impfstoff, der mit Proteinen aus der zur Virusvermehrung verwendeten Rindernieren-Zelllinie MDBK kontaminiert ist, werden Antikörper gegen autologe zelluläre Proteine gebildet (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011, Kasonta et al., 2012) und während der Kolostrumbildung im Euter angereichert (Assad et al., 2012). Sobald diese im Kalb an das passende Alloantigen binden, kommt es zur Zerstörung körpereigener Zellen (Bridger et al., 2011, Assad et al., 2012, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012) und zur Ausprägung der für die BNP charakteristischen Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Knochenmarksaplasie (Friedrich et al., 2009, Penny et al., 2009, Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010, Witt et al., 2011). Die Ätiologie und Pathogenesemechanismen, die der Erkrankung zu Grunde liegen, konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Um die Ätiologie und Pathogenese der BNP zu verstehen, ist es von zentraler Bedeutung, das pathogenetisch relevante Zielantigen der Alloantikörper zu kennen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, potenziell pathogenetisch relevante BNP-Alloantigenkandidaten zu identifizieren.

Als Ausgangspunkt unserer Antigensuche wählten wir die im Blut erkrankter Kälber betroffenen Zellpopulationen, Thrombozyten und PBL. Der Abfall dieser Zellen im Blutbild der Kälber ist der erste Anhaltspunkt für die Erkrankung an BNP (Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012). Die Blutwerte betroffener Tiere zeigen interessanterweise einen charakteristischen Verlauf. Wie in einer Studie mit experimentell induzierter BNP gezeigt werden konnte, sind Monozyten die ersten und am stärksten betroffenen Zellen im Blut der Tiere (Bell et al., 2012). Innerhalb von zwei Stunden nach Kolostrumaufnahme fielen die Monozytenwerte um durchschnittlich 95% im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ab (Bell et al., 2012). Lymphozyten und Granulozyten zeigten innerhalb der ersten vier Stunden

eine Reduktion um 70% und 75%, während Thrombozyten um durchschnittlich 40% innerhalb von acht Stunden nach der Kolostrumaufnahme sanken (Bell et al., 2012). Anschließend stieg die Anzahl der Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten ab acht Stunden postkolostral wieder leicht an (Bell et al., 2012). Während die neutrophilen Granulozyten dann im weiteren Verlauf der Erkrankung konstant oberhalb des unteren Referenzbereiches blieben, fielen die Zahlen der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten erneut ab (Bell et al., 2012). Lymphozyten und Monozyten verweilten auf diesem niedrigen Niveau, nur die Thrombozytenwerte sanken kontinuierlich ab dem vierten Tag postkolostral weiter und wiesen zum Teil nur noch Werte um Null auf (Bell et al., 2012).

Im Proteom von Thrombozyten und PBL ist es uns mittels 2D Western Blots gelungen, Alloantikörperbindungen an 13 verschiedene Proteine zu ermitteln (Abb. 4.1 bis 4.4, Tab. 4.1 und 4.2). Zunächst stellten wir dabei fest, dass es sich bei den pathogenen Alloantikörpern der BNP-Überträgerkühe um IgG handelt, da die Bindungen an die entsprechenden Antigene nur mit einem sekundären anti-bovinen IgG F(c) spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden konnten, jedoch nicht mit anti-bovinem IgM. Zudem beobachteten wir, dass nicht nur die kolostralen Ig, sondern auch Ig aus dem Serum der Übertragertiere an die Proteine banden, was bestätigte, dass die Alloantikörper in den BNP-Überträgerkühen sowohl im Kolostrum, als auch im Blut vorkommen. Alloimmunreaktionen konnten sowohl gegen das Proteom von Thrombozyten (Abb. 4.1 und 4.2 und Tab. 4.1), als auch gegen das PBL-Proteom (Abb. 4.3 und 4.4 und Tab. 4.2) detektiert werden. Mit 2D Western Blots und Massenspektrometrie ließen sich somit sechs Kandidatenproteine aus Thrombozyten (Tab. 4.1) und sieben aus PBL (Tab. 4.2) eindeutig identifizieren. Es konnte jedoch aus den beiden Zielproteomen kein gemeinsamer Alloantigenkandidat ermittelt werden, deshalb ergaben diese Analysen insgesamt 13 Kandidatenproteine. Die 2D PAGE ermöglicht eine maximale Auftrennung der zellulären Proteine und lässt zudem die Identifikation post-translationaler Modifikationen und Isoformen zu (Westermeier und Schickle, 2009). Sie birgt jedoch den erheblichen Nachteil, dass stark hydrophobe Proteine, wie sie in Zellmembranen vorkommen, bei der isoelektrischen Fokussierung präzipitieren und sich daher nicht auftrennen lassen

(Westermeier und Schickle, 2009, Rabilloud et al., 2010). Gerade Membranproteine stellen jedoch bei der Pathogenese von Immunkrankheiten besonders interessante Zielstrukturen dar, weshalb wir ergänzende Methoden anwendeten, um zu klären, ob sich die Alloimmun-Antwort auch gegen Membranproteine richtet (Hauck et al., 2010). Die 1D PAGE ist eine hervorragende Methode, um die Nachteile der 2D PAGE zu kompensieren (Hauck et al., 2007, Hauck et al., 2010). Wird zudem in der 1D PAGE gezielt eine Anreicherung von Membranproteinen aus der zu untersuchenden Probe angewandt, so erhält man durch die Kombination der 2D und 1D PAGE eine größtmögliche Ausbeute an Informationen und an dargestellten Proteinen, da sich ihre Vor- und Nachteile weitgehend ausgleichen (Hauck et al., 2010). Durch den Membranprotein-spezifischen Ansatz konnten wir nachweisen, dass BNP-Ig auch membranständige Proteine erkennen und dabei fünf Membranproteine als Alloantigenkandidaten identifizieren (Abb. 4.5 und Tab. 4.3). Einer dieser Kandidaten, CD41 (Integrin Alpha 2b; Tab. 4.1, Spots 2 und 3; Tab. 4.3, Bande 21), wurde zuvor bereits durch 2D Western Blots im Thrombozytenproteom detektiert, die vier neuen Proteine erweiterten unsere Liste an potenziellen Alloantigenkandidaten auf insgesamt 17 Proteine.

Um die Möglichkeit mit einzubeziehen, dass die Alloantikörper gegen ein Konformations-abhängiges Epitop gerichtet sind, entschieden wir uns für eine zusätzliche Methode, bei der man Alloreaktivitäten gegen Proteine nachweisen kann, ohne diese vorher zu stark zu denaturieren. Mittels IP reicherten wir Proteine aus PBL-Lysat an und erweiterten den Versuch durch Präzipitation aus MDBK-Zellysat, sowie dem assoziierten Impfstoff PregSure BVD, damit wir die Kandidaten mit den angereicherten Proteinen aus diesen Proben abgleichen konnten (siehe Kapitel 4.3). Um die bei dieser Methode häufig auftretenden falsch positiv angereicherten Proteine (Sousa et al., 2011) auszugrenzen, beschränkten wir die Auswahl der Kandidaten auf Proteine, die mindestens dreimal häufiger durch BNP-IgG angereichert wurden als durch die Negativkontroll-IgG. Wir erhielten damit aus dem PBL-Lysat 17 weitere Alloantigenkandidaten (Tab. 4.4, Proteine 22 – 26, 51 – 61 und 65), von denen kein Kandidat zuvor mit den beiden anderen Methoden identifiziert wurde.

Insgesamt konnten wir nach Abschluss unserer Alloantigensuche eine Alloreaktivität der BNP-Ig gegen 34 Kandidatenproteine feststellen. Es wurde jedoch keiner dieser Kandidaten anhand von allen drei Methoden identifiziert. CD41 wurde als einziges Protein mit zwei Methoden aus dem Zellmaterial von Thrombozyten und PBL identifiziert (2D und 1D Western Blots; Abb. 4.1 bis 4.4, Tab. 4.1 und 4.2). Dass man eine Immunreaktion gegen ein Protein nicht immer mit mehreren verschiedenen Methoden parallel detektieren kann, erklärt sich dadurch, dass die Art der Immunreaktion (gegen konformelle oder lineare Epitope) bei derselben Erkrankung von Patient zu Patient unterschiedlich sein kann (Deeg et al., 2006, Ng et al., 2012). Ein Beispiel aus der Humanmedizin sind die anti-Neurofascin-Immunreaktionen bei peripheren Neuropathien (Ng et al., 2012). Für anti-Neurofascin-Autoantikörper wurde in einer *in vivo* Studie anhand eines Rattenmodells nachgewiesen, dass sie bei experimenteller autoimmuner Neuritis die Symptome verstärken und verlängern (Ng et al., 2012). Im Anschluss an diese Studie sollte die Prävalenz der Autoantikörper gegen Neurofascin im Blut von Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien nachgewiesen werden (Ng, 2012). Dabei hat sich erstaunlicherweise gezeigt, dass die meisten Patienten jeweils nur in einem Test anti-Neurofascin-Antikörper positiv waren (ELISA, Durchflusszytometrie oder Western Blot) (Ng, 2012). Daher sollte immer die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass in den einzelnen Methoden die Bindungsstellen für die Antikörper in unterschiedlicher Weise vorliegen, also mehr modifiziert oder mehr der *in vivo* bestehenden Konformation ähnelnd, sodass meist nur der Vergleich von Reaktionen nach der Auswertung mehrerer verschiedener Methoden zur Klärung einer Beteiligung von Antigenen bei Immunkrankheiten führt (Mari et al., 2010).

Jede der in dieser Studie angewandten Methoden zur Identifikation des BNP-Alloantigens hat ihre individuellen Vor- und Nachteile. Nur wenige der identifizierten Alloantigenkandidaten wurden anhand mehr als nur einer Methode identifiziert. Daher hat sich die Anwendung jeder einzelnen Methode als vorteilhaft erwiesen und so stellten alle 34 identifizierten alloreaktiven Proteine nach diesen Experimenten gleichwertige Alloantigenkandidaten dar.

Um zu entscheiden, welches der 34 potenziellen BNP-Alloantigene verifiziert und auf seine pathogenetische Relevanz funktionell charakterisiert werden soll, vervollständigten wir zunächst das Profil des pathogenen Alloantigens durch Charakterisierung seines Expressionsmusters. Da eine Immunisierung mit PregSure BVD bei den Kühen die Bildung der entsprechenden Alloantikörper auslöst (Bastian et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011), muss das gesuchte Alloantigen auch in der Vakzine zu finden sein. Daher überprüften wir, ob einer unserer Alloantigenkandidaten im Impfstoff vorkommt, indem wir diesen massenspektrometrisch analysierten. Anhand dessen stellten wir fest, dass der Impfstoff eine Vielzahl (223 unterschiedliche Proteine als Summe aus IP und Massenspektrometrie im Vergleich zu 43 Proteinen in einer BVD-Lebendvakzine (Euler et al., 2013)) zellulärer Proteine des Rindes enthält (Abb. 4.6). Insgesamt konnten wir fünf unserer zuvor identifizierten Kandidatenproteine mit der massenspektrometrischen Proteomanalyse im Impfstoff nachweisen, dies waren Gamma-Aktin, Hitzeschockprotein Beta-1 (HSPB1), Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Filamin A und Thrombospondin-1 (Tab. 4.7). CD41 hingegen, das zuvor sogar mittels zwei verschiedener Methoden bei der Alloantigensuche identifiziert werden konnte, schied für uns als Kandidatenprotein aus, nachdem es weder mit der IP, noch durch die direkte massenspektrometrische Analyse im Impfstoff nachgewiesen werden konnte.

Die in der Vakzine enthaltenen Proteinbestandteile stammen aus der Zelllinie, die zur Virusvermehrung bei der Impfstoffproduktion verwendet wurde (MDBK-Zelllinie) und gelangten vermutlich aufgrund einer ungenügenden Aufreinigung während des Herstellungsprozesses in die Vakzine (Bastian et al., 2011, Kasonta et al., 2012). Daher haben mehrere Forschergruppen die Reaktion gegen den Impfstoff (Bastian et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011) und gegen MDBK-Zellen untersucht (Bastian et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011, Schumann, 2011). Dabei wurde an Kälbern und Meerschweinchen gezeigt, dass die Immunisierung mit PregSure BVD zur Produktion von Alloantikörpern führt (Bastian et al., 2011). Diese Alloantikörper sind sowohl gegen bovine Leukozyten, als auch gegen MDBK-Zellen gerichtet, da die mit BNP-assoziierten Alloantikörper im Western

Blot mit diesen kreuzreagierten (Bastian et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011). Die Kreuzreaktion mit MDBK-Zellen bestätigte außerdem die MDBK-Zelllinie als Ursprung der Alloantigene in der Vakzine (Bastian et al., 2011). Ebenfalls wurde die Bindung von BNP-Ig an die Oberfläche von PBL gesunder Spendertiere dargestellt (Schumann, 2011). Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass durch i.v. Infusion von BNP-Ig (Foucras et al., 2011) sowie durch Aufnahme von BNP-auslösendem Kolostrum (Bridger et al., 2011) die so in das Blut von Kälbern gelangten BNP-Ig an Leukozyten binden. Anhand immunzytochemischer Färbungen wurde zudem gezeigt, dass Ig geimpfter BNP-Überträgerkühe an alle Thrombozyten binden (Assad et al., 2012).

Obwohl Kühe im Zuge landesweiter BVD-Bekämpfungsprogramme mit PregSure BVD geimpft wurden, lag die Inzidenz von BNP beispielsweise in Bayern lediglich bei 100 Erkrankungen je 100.000 verkaufter Dosen des Impfstoffs (Kasonta et al., 2012). Dabei banden in Studien mit experimentell induzierter BNP die durch die Immunisierung mit dem Impfstoff hervorgerufenen Alloantikörper an die Blutzellen nahezu aller Versuchskälber (Bridger et al., 2011, Friedrich et al., 2011, Bell et al., 2012, Laming et al., 2012) und auch in unseren Experimenten konnten wir stets eine Bindung an Donor-Zellen feststellen, egal von welchem Spendertier sie stammten. Daher liegt der entscheidende Unterschied, ob die Kühe Alloantikörper bilden oder nicht, vermutlich darin, dass die Expression des BNP-Alloantigens zwischen den BNP-Kühen und Nicht-BNP-Überträgern voneinander abweicht (Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011). Unserer Hypothese nach exprimieren die BNP-Überträger selbst das Alloantigen oder das entscheidende Epitop nicht (dieses kommt selten vor, deshalb die geringe Inzidenz von BNP), was zur Targetierung der kanonischen Sequenz des Alloantigens (dieses ist bei den meisten Rindern und MDBK vorhanden) durch die Alloantikörper führt. Ein bekanntes Beispiel aus der Humanmedizin für Immunreaktionen aufgrund des Fehlens eines Proteins ist die Rhesus-D-Protein (RhD) Blutgruppenunverträglichkeit (Colin et al., 1991). Diese führt beim ungeborenen Fetus zu einer Hämolyse, weil alloreaktive Antikörper der RhD-negativen Mutter, die durch den Kontakt mit Zellen des RhD-positiven Vaters

entstanden sind, transplazentar an das Rhesus D Protein auf den Zellen des RhD-positiven Fetus binden (Stott et al., 2000).

Um festzustellen, ob ein solcher Ja/Nein-Expressionsunterschied besteht, bei dem die mit PregSure BVD geimpften Nicht-Überträger das Alloantigen exprimieren, die BNP-Überträger hingegen nicht, haben wir das Oberflächenproteom von Thrombozyten und PBL (anhand dieser Arbeit zum ersten Mal bei Rindern beschrieben) dieser beiden Gruppen differenziell analysiert. Dabei verglichen wir die Expression der Oberflächenproteine bei beiden Versuchsgruppen auch quantitativ (Tab. 4.5 und Tab. 4.6). In diesem Versuch konnte aber lediglich eine konkrete Aussage darüber getroffen werden, ob ein gesamtes Protein differenziell exprimiert ist oder nicht, da Isoformen mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden können. Die hier analysierten Proben von beiden Gruppen wurden von Fleckvieh-Kühen genommen, die alle aus demselben Milchviehbestand stammten und mit PregSure BVD immunisiert wurden. Somit wurde ein Einfluss weiterer Faktoren aus der Umgebung auf die Proteinexpression der Blutzellen weitestgehend minimiert. Drei der Tiere lösten bei mindestens einem ihrer Kälber BNP aus, die anderen drei wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Insgesamt waren zwölf der 171 auf Thrombozyten identifizierten (Tab. 4.5) und 29 der insgesamt 179 auf PBL identifizierten Proteine (Tab. 4.6) bei BNP-übertragenden Rindern differenziell exprimiert.

Mit der differenziellen Proteomanalyse konnten wir technisch lediglich einen quantitativen Unterschied in der Gesamtexpression eines Proteins feststellen, jedoch keine Epitop-spezifischen Unterschiede. Interessanterweise wurde CD41 signifikant niedriger auf PBL von BNP-Überträgerkühen exprimiert als auf PBL von geimpften Nicht-Überträgern (Tab. 4.6, Protein 29). Aufgrund von Immunreaktionen der BNP-Ig gegen CD41 im Thrombozytenproteom (Tab. 4.1, Spots 2 und 3; Tab. 4.3, Banden 17 und 21) zählte CD41 zu den Kandidatenproteinen. Bei der Analyse des Impfstoffs konnte es allerdings nicht als Bestandteil von PregSure BVD nachgewiesen werden. Das relevante Alloantigen muss aber unserer Hypothese nach im Impfstoff enthalten sein, da die Bildung der Alloantikörper durch die Immunisierung mit der Vakzine hervorgerufen wird. Deshalb wurde es von der anschließenden Charakterisierung der

potenziell pathogenen Alloantigenen ausgeschlossen. Die weiteren, aus der Alloantigensuche resultierenden Kandidatenproteine zeigten keinen Expressionsunterschied. Dies kann darauf beruhen, dass zwischen den BNP-Überträgern und Nicht-Überträgern keine quantitativ differenzielle Proteinexpression vorliegt, sondern vielmehr ein Unterschied in der Proteinsequenz, die im Austausch lediglich einer Aminosäure bestehen kann und mit dieser Analyse nicht zu erfassen ist. Beim Menschen wurde vor fast 50 Jahren erstmals eine Alloimmunreaktion gegen das Humane Neutrophilen-Alloantigen (HNA-3) beschrieben (Van Leeuwen et al., 1964). Erst im Jahr 2009 fand man heraus, dass die Alloantikörperbildung dabei auf einer Punktmutation des Genes beruht, das für das Cholin-Transporter Like Protein 2 kodiert (Curtis et al., 2010). Diese Punktmutation führt dazu, dass durch den Austausch von nur einer Aminosäure zwei unterschiedliche Expressionsvarianten des Cholin-Transporter Like Protein 2 existieren (HNA-3a und HNA-3b) (Greinacher et al., 2010). Nach der Aufnahme von Alloantikörpern gegen HNA-3a via Transfusion von Blut löst dies eine schwere und zum Teil tödliche Form der Transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) bei den Empfängern aus (Greinacher et al., 2010). HNA-3a-Alloantikörper sind häufig in Spenderblut von multiparen Frauen enthalten, die während einer Schwangerschaft HNA-3-Alloantikörper gegen paternale Leukozytenantigene des Fetus entwickeln, wobei die Frauen mit der Alloantikörpervariante gegen HNA-3a meist mindestens drei Schwangerschaften aufweisen (Bux, 2005). Da 73% der bei TRALI-Patienten detektierten Alloantikörper gegen das humane MHC I (humanes Leukozytenantigen, HLA I) gerichtet sind, die eine mildere Form der Erkrankung auslösen (Reil et al., 2008), und diese anti-HLA I-Antikörper lange Zeit die Immunreaktionen gegen HNA-3a überdeckten, erwies sich die Identifikation von HNA-3a als hochpotentes Alloantigen als technisch sehr schwierig. An diesem Beispiel wird deutlich, dass weitere Experimente nötig sind, um möglicherweise bestehende Expressionsunterschiede unserer fünf BNP-Alloantigenkandidaten darstellen zu können. Da wir bei der differenziellen Expressionsanalyse methodisch ausdrücklich Plasmamembran-assoziierte Proteine ausgewählt haben, wäre ein denkbar weiterer Ansatz die Analyse auf Proteine anderer Zellkompartimente, wie zum Beispiel dem Zytoplasma, auszuweiten, denn

drei unserer fünf Kandidatenproteine (Gamma-Aktin, Purin-Nukleosid-Phosphorylase und Filamin A) werden nicht an der Plasmamembran exprimiert. Die differenzielle Proteomanalyse ist nicht geeignet, um voneinander abweichende Aminosäureabfolgen zu detektieren. Daher sollten die interessanten Alloantigenkandidaten zudem sequenziert werden, um mögliche Unterschiede nachzuweisen, die die Alloantikörperbildung der BNP-Überträgerkühe gegen einen der Kandidaten erklären könnten. Bevor wir nun alle verbleibenden Kandidatenproteine von BNP-Überträgerkühen im Vergleich zu geimpften Negativkontrolltieren sequenzieren, wollten wir den Steckbrief des gesuchten Alloantigens um sein Expressionsmuster erweitern, um damit Alloantigenkandidaten entweder direkt ausschließen zu können oder zumindest eine Prioritätenliste für die Sequenzierung zu erstellen und somit weitere Anhaltspunkte zur Verifikation zu erhalten.

Bei unserer Alloantigensuche hatten wir bereits neben der Identifikation von Kandidatenproteinen einige zusätzliche Erkenntnisse über die pathogenetischen Vorgänge bei der BNP gewinnen können. Als erstes stellten wir fest, dass es sich bei dem Geschehen um eine Alloimmun-Reaktion handelt, da die BNP-Ig an zelluläre Proteine anderer Rinder banden (Abb. 4.1 bis 4.5, Tab. 4.1 bis 4.4). Dieses Erkenntnis stimmt auch mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Foucras et al., 2011, Pardon et al., 2011, Schumann, 2011). Des Weiteren zeigten sich keine Unterschiede bei den Reaktionen in Western Blots, die mit Seren oder Kolostrum inkubiert wurden, woraus wir schließen konnten, dass die pathogenen Immunglobuline aus dem Blut der Tiere stammen und während der Kolostrumanbildungsphase ins Euter transferiert werden. Auch bei anderen Studien wurde das Blut der BNP-Kühe als Quelle der pathogenen Alloantikörper identifiziert (Bridger et al., 2011, Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011, Pardon et al., 2011, Assad et al., 2012). Diese Feststellung wurde zudem in einer Studie bestätigt, die zeigte, dass Symptome der BNP auch bei vorher gesunden Kälbern durch eine i.v. Transfusion von gereinigtem IgG aus Plasma von BNP-Überträgerkühen ausgelöst werden konnten (Foucras et al., 2011). In einer weiteren Studie konnten wir zusätzlich zeigen, dass die Alloantikörper vom Isotyp IgG₁ sind (Assad et al.,

2012). Die Alloantikörper binden sowohl an die Plasmazellmembran als auch intrazellulär, wie aus den immunzytochemischen Färbungen von BNP-Ig an MDBK-Zellen hervorgeht (Abb. 4.13). Die Lokalisation stimmt mit den bisher beobachteten Bindungsmustern überein, die ebenfalls eine Färbung an der Zellmembran und im Zellinneren von Thrombozyten und PBL zeigten (Assad et al., 2012). Außerdem konnten wir nachweisen, dass die Alloantikörper an Thrombozyten- und PBL-Proteine von Rindern unterschiedlichen Alters (von neonatalen Kälbern bis hin zu mehrere Jahre alten Kühen) gleich stark und gleich häufig banden, was später auch immunzytologisch bestätigt wurde (Assad et al., 2012). Dies bedeutet, dass das Alloantigen im Verlauf des Heranwachsens durchgehend stabil auf den Zielzellen exprimiert wird und es sich dabei nicht um ein Protein handelt, das in dieser Form und Ausprägung nur bei jungen Kälbern vorhanden ist. Die Kälber erkranken demnach nur infolge der Kolostrumaufnahme, sind aber nicht speziell empfänglich. Dies bestätigte sich auch durch ein Experiment, bei dem die Bindung von BNP-Ig an PBL von Rindern im Alter von wenigen Tagen bis zu knapp zwei Jahren gezeigt wurde (Pardon et al., 2011). Dass das Alloantigen altersabhängig unterschiedlich exprimiert sein könnte, zeigt zum Beispiel der Nachweis der altersabhängigen Expression des CD-Antigens CD21 beim Rind (Chattha et al., 2009). So exprimieren B-Zellen neonataler Kälber weniger CD21 auf ihrer Zelloberfläche als die ausgewachsener Rinder (Chattha et al., 2009). Die Expression steigt innerhalb der ersten 90 Lebenstage von durchschnittlich knapp 12% CD21⁺ Lymphozyten auf circa 35% an, was dann in etwa dem durchschnittlichen Wert von CD21⁺ Lymphozyten erwachsener Rinder entspricht (Chattha et al., 2009). Dabei ist auch die Expressionsintensität der CD21⁺ Lymphozyten neugeborener Kälber weniger stark im Vergleich zu der erwachsener Rinder (Chattha et al., 2009). Eine solche abweichende Expression, die sich im Verlauf des Heranwachsens der Kälber verliert, hätte beispielsweise erklären können, weshalb die pathogenen Antikörper nicht autoaggressiv an körpereigene Blutzellen der BNP-Überträger binden, weil das Antigen bei ihnen gar nicht mehr exprimiert wird. Da die BNP-Ig jedoch Zellen von Rindern jeder Altersklasse erkennen und binden, zeigt dies, dass die Maturität der

Zellen bei der Pathogenese der BNP keine Rolle spielt und es sich deshalb um eine Alloimmunreaktion handelt.

Um unser Profil des pathogenen Alloantigens zu vervollständigen, konzentrierten wir uns anschließend auf die Charakterisierung seines Expressionsmusters. Die Durchflusszytometrie erwies sich als hilfreiche Methode, um die Bindung von BNP-Ig an die Oberfläche von PBL zu beschreiben. Die klinische BNP geht mit einer Leukozytopenie einher, von der nicht alle Leukozytenpopulationen gleich betroffen sind (Bell et al., 2010b, Kappe et al., 2010, Pardon et al., 2010). Daher gingen wir davon aus, dass das Alloantigen unterschiedlich stark von den einzelnen PBL-Populationen exprimiert wird. Dementsprechend untersuchten wir die Bindung von BNP-Ig an die einzelnen PBL-Populationen, um daraus auf die Expression des Alloantigens schließen zu können. Dabei stellten wir fest, dass Ig von BNP-Überträgerkühen im Gegensatz zu Kontroll-Ig an PBL binden und die Expression des Zielantigens auf der Oberfläche der einzelnen Subpopulationen deutlich variiert (Abb. 4.7). Unseren Ergebnissen zu Folge ist das gesuchte Alloantigen nur auf 29% ($\pm 28\%$) der Granulozytenfraktion vorhanden, dementsgegen wird es von 72% ($\pm 26\%$) der Monozyten und 67% ($\pm 24\%$) der Lymphozyten exprimiert (Abb. 4.7). Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen wird das Zielantigen von 65% ($\pm 32\%$) der CD21⁺ B-Zellen (Abb. 4.9.f und 4.12.d) und 37% ($\pm 16\%$) der CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Abb. 4.9.d und 4.11.d), ist aber nur auf 14% ($\pm 20\%$) der CD4⁺ T-Zellen vorhanden (Abb. 4.9.b und 4.10.d). Während die Daten der FACS-Experimente zur Bindung an Monozyten und Lymphozyten größtenteils mit unseren Ergebnissen aus der Immunzytologie übereinstimmen (Assad et al., 2012), besteht jedoch eine hohe Diskrepanz in Bezug auf die Granulozyten. Dies lässt sich damit erklären, dass wir bei der Durchflusszytometrie lediglich eine Antikörperbindung auf der Zelloberfläche untersucht hatten, wohingegen die Immunzytologie zusätzlich eine intrazelluläre Bindung zeigt, die entsprechend bei vielen Granulozyten beobachtet wurde (Assad et al., 2012). Um diese intrazelluläre Bindung zu überprüfen, könnte man in einem weiteren durchflusszytometrischen Experiment die Bindung von BNP-Ig nach Permeabilisierung der Zellen messen. Dabei sollten die Daten letztendlich mit denen aus der Immunzytochemie übereinstimmen (Assad et al., 2012).

Beim Vergleich der Reaktionsmuster von BNP-Ig verschiedener BNP-Überträgerkühe fiel in der Durchflusszytometrie auf, dass die verschiedenen BNP-Ig unterschiedlich stark an Zellen der gleichen Spenderkuh banden und die Ig derselben BNP-Überträgerkuh zusätzlich eine große Variation bei der Bindung an Zellen verschiedener Spendertiere zeigten (siehe Kapitel 4.6.2, Abb. 4.10 – 4.12). Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen ebenfalls ein großer Unterschied bei der Bindung von BNP-Seren an PBL eines Spendertieres gezeigt wurde und zudem große Schwankungen bei der Bindungskapazität eines BNP-Serums an Zellen verschiedener Spendertiere vorlagen (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011). Dies bestätigt nach Meinung der Autoren deren Hypothese, dass die BNP-Ig unterschiedliche Epitop-Strukturen der Zielzellen binden und zwischen den Spendertieren zudem die Expression des Alloantigens auf den betroffenen Zellen variiert (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Pardon et al., 2011). Bei einer anderen Studie wurde dagegen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Bindung von Ig mehrerer BNP-Überträgerkühe an zwei permanente bovine Rindernieren-Zelllinien (BK-KL3A und MDBK) getestet (Schumann, 2011). Überraschenderweise schwankte die Anzahl der gebundenen Zellen ebenfalls erheblich, wenn die Zelllinien mit Ig derselben BNP-Überträgerkuh an verschiedenen Tagen inkubiert wurden (zwischen 19,9% und 62,0% bei BK-KL3A mit Ig einer BNP-Überträgerkuh und zwischen 7,7% und 63,5% bei MDBK-Zellen mit Ig einer anderen BNP-Überträgerkuh) (Schumann, 2011). Dies weist darauf hin, dass es sich bei dem gesuchten Alloantigen um ein von den Zellen unterschiedlich reguliertes Protein handeln muss. Um dies weiter zu überprüfen, könnte man über einen Zeitraum von mehreren Tagen testen, wie sich die Bindung von Ig mehrerer BNP-Überträgerkühe bei wiederholten Tests mit der Zelllinie oder Zellen eines gesunden Spendertieres verhält. Des Weiteren könnte man überprüfen, ob und wie sich die Bindung zum Beispiel nach polyklonaler Stimulation der Zellen verändert.

Mit der unterschiedlich starken Targetierung der PBL-Populationen bei Kälbern mit klinischer BNP (Penny et al., 2009, Kappe et al., 2010) beschäftigten sich auch einige andere Studien (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Schumann, 2011). Diese bestätigen unser Ergebnis, dass die Granulozytenfraktion von den drei

PBL-Populationen am geringsten betroffen ist (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Schumann, 2011). Dabei lagen die Werte für die BNP-Ig positiven Granulozyten bei einer der Studien mit 26% (Bastian et al., 2011) im gleichen Bereich wie bei uns nachgewiesen (29%, $\pm 28\%$). Zwei weitere Studien bestätigen, dass die Granulozyten die Population der PBL war, die am geringsten gebunden wurde (Bridger et al., 2011, Schumann, 2011). Bei einer Studie, in der die Bindung an Monozyten untersucht wurde, ähnelte die Anzahl IgG positiver Monozyten mit 60% ebenfalls dem von uns nachgewiesenen Wert (72%, $\pm 26\%$) (Bastian et al., 2011). Einige Arbeitsgruppen unterschieden bei ihrer Analyse nicht zwischen den Lymphozyten- und Monozytenfraktionen, sondern fassten beide Populationen im Durchflusszytometer zusammen (Bridger et al., 2011, Schumann, 2011). Dabei wiesen die Ergebnisse deutliche Unterschiede auf, die in einer der Studien unsere Daten bestätigten (durchschnittlich 83,5%, $\pm 21,4\%$ IgG positive mononukleärer Zellen nach Inkubation von PBL mit BNP-Ig) (Schumann, 2011), während die Aussagen der anderen Studie deutlich von unseren Ergebnissen abwich (Bridger et al., 2011). In dieser zweiten Studie wurden bei zwei Kälbern, denen BNP-Kolostrum getränkt wurde, wenige Stunden nach Aufnahme des Kolostrums 95% und 100% IgG positive mononukleäre Zellen nachgewiesen (Bridger et al., 2011). Dagegen stimmen unsere Daten in hohem Maß mit den Blutbildveränderungen überein, die bei einer anderen Studie bei Kälbern mit experimentell hervorgerufener BNP beschrieben wurden (Bell et al., 2012). Die Monozyten der Kälber gingen hier nach der Kolostrumaufnahme als erstes zu Grunde (zwei Stunden nach Kolostrumaufnahme) und waren im Vergleich zu Lymphozyten auch stärker betroffen (Bell et al., 2012). Insgesamt unterstützen diese Studien unser Ergebnis, dass Monozyten und Lymphozyten selektiv targetiert werden und dass BNP-Ig nicht an alle Zellen einer Population binden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zum ersten Mal die Bindung der BNP-Ig an die Lymphozytensubpopulationen CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD21⁺ B-Zellen verschiedener Rinder untersucht. Dabei zeigte sich durch eine starke Alloantikörperbindung, dass vor allem B-Zellen (65%, $\pm 32\%$) das Alloantigen exprimieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer kürzlich publizierten Studie,

die bei Kälbern mit experimenteller BNP nachwies, dass von den Lymphozytensubpopulationen insbesondere die B-Zellen und die γ/δ T-Zellen deutlich absanken (im Vergleich zu Kontrollkälbern und den Werten der Versuchskälber vor dem Versuch) (Laming et al., 2012). Dies kann besonders dramatisch sein, wenn man bedenkt, dass die γ/δ T-Zellen bei Wiederkäuern, insbesondere bei Neugeborenen, die dominierende T-Zellpopulation darstellen (Hein und Mackay, 1991).

Anhand unserer Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass das gesuchte Alloantigen ein spezifisches Expressionsmuster auf der Oberfläche von PBL aufweist. Demnach ist es am häufigsten auf Monozyten (72%; Abb. 4.7.b), dann auf zwei Drittel der B-Zellen (65%; Abb. 4.9.f und 4.12.d), 37% der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4.9.d und 4.11.d), 29% der Granulozyten (Abb. 4.7.b) und 14% der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 4.9.b und 4.10.d) exprimiert.

Nach der näheren Beschreibung des Anteils an Zellen der einzelnen Leukozytenpopulationen, die das Zielantigen der BNP-Ig auf ihrer Oberfläche exprimieren, haben wir die Lokalisation des Alloantigens bei MDBK-Zellen mittels Immunzytochemie näher untersucht (siehe Kapitel 4.6.3). Auch hier kam es eindeutig zu einer Bindung von Ig der BNP-Überträgeriere an die Zellen (Abb. 4.13.d und f), im Gegensatz zur negativen Reaktion mit Ig der Kontrolltiere (Abb. 4.13.c). Die zellmembranständige und intrazelluläre Färbung der Zellen (Abb. 4.13.f) bestätigte unsere Hypothese, dass das gesuchte Target-Protein nicht ausschließlich auf der Zellmembran vorhanden ist, sondern dass die Zellen das Alloantigen auch im Zellinneren exprimieren (Assad et al., 2012). In Bezug auf die Pathogenese der BNP ist die Hypothese anderer Forschergruppen, dass die pathogenetisch relevante Immunreaktion gegen ein plasmazellmembranständiges Antigen gerichtet sein muss, da BNP-Ig eine Bindung auf der Zelloberfläche zeigen, jedoch wurde in diesen Studien eine intrazytoplasmatische Antikörperbindung nicht untersucht (Bastian et al., 2011, Bridger et al., 2011, Deuskens et al., 2011). Unsere Analysen wiesen jedoch zusätzlich eine deutliche intrazytoplasmatische Reaktion nach (siehe Abb. 4.13.d und f sowie (Assad et al., 2012)). Dies kann bedeuten, dass das Alloantigen ein plasmazellmembranständiges Protein mit einer

intrazytoplasmatischen Domäne ist, die von den Antikörpern targetiert wird, wie zum Beispiel beim bullösen Pemphigoid und dem vernarbenden Pemphigoid des Menschen (Schmidt et al., 2001). Bei diesen dermatologischen Erkrankungen zeigen 59% der Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid eine autoimmune Reaktion gegen die intrazelluläre Domäne des Kollagen XVII (auch BP180 genannt), einem hemidesmosomalen Transmembranprotein (Schmidt et al., 2001). Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen dem bullösen Pemphigoid und der Impfung mit einer Influenza-Vakzine hergestellt werden, bei der die Immunisierung einen seltenen Auslöser für die Entstehung der Erkrankung darstellt (Walmsley und Hampton, 2011). Die zugrunde liegenden Pathogenesemechanismen dieser Autoimmunerkrankung sind nicht geklärt (Walmsley und Hampton, 2011). Dass die Vakzine selbst direkt den Auslöser darstellt, ist unwahrscheinlich, da der Impfstoff keine Strukturen enthält, die den Basalmembranproteinen ähneln (Walmsley und Hampton, 2011). Die Hypothese ist hier, dass die Vakzine eine verstärkte Immunantwort gegen die Basalmembranproteine bei immunologisch prädisponierten Patienten oder bei Patienten mit möglicherweise subklinischem bullösem Pemphigoid hervorrufen könnte, die eventuell durch die lokalen Entzündungsprozesse infolge der Impfung freigelegt werden (Walmsley und Hampton, 2011). Dabei scheinen die entstandenen Autoantikörper zum Teil direkt Fc-unabhängig und ohne entzündliche Mechanismen eine Gewebeschädigung hervorrufen zu können, indem Antigen-Antikörper-Komplexe nach Bindung der Antikörper an Kollagen XVII auf der Oberfläche von Keratinozyten internalisiert werden (Walmsley und Hampton, 2011). Infolge dessen sinkt die Expression von Kollagen XVII, wodurch sich die Hemidesmosomen lösen und der Zellverband zerstört wird, wie *in vitro* mit kultivierten Keratinozyten und kultiviertem Hautgewebe gezeigt werden konnte (Walmsley und Hampton, 2011).

Für die Selektion potenzieller Alloantigene muss zudem bedacht werden, dass Proteine, die in der Vergangenheit als rein intrazytoplasmatisch exprimiert angesehen wurden, später auch auf der Oberfläche von Zellen gefunden werden können. Ein hervorragendes Beispiel hierfür stellt die ATP-Synthase dar, die lange Zeit als ein rein mitochondriales Protein angesehen wurde. Inzwischen wurde die ATP-Synthase jedoch auch auf der Zelloberfläche vieler unterschiedlicher Zellen

beschrieben (Chi und Pizzo, 2006). Daher kommen auch Proteine als krankheitsauslösendes Alloantigen bei der BNP in Frage, die (bisher) nicht als plasmamembranständig beschrieben sind. Dementgegen kommt auch ein rein intrazytoplasmatisch exprimiertes Protein als Targetantigen in Frage, da intrazelluläre Proteine bei vielen Autoimmunkrankheiten targetiert werden, obwohl man als Ziel der pathologischen Antikörperattacke ein Membranprotein erwarten würde (Racanelli et al., 2011).

Letztendlich muss die Expression des Kandidatenproteins mit der Bindung des BNP-Alloantikörpers übereinstimmen. Um dies zu zeigen, könnte man zum Beispiel mit immunzytochemischen Doppelfärbungen die Bindung von BNP-Ig an die PBL mit einem spezifischen Antikörper sichtbar machen.

Bei der Suche nach dem BNP-Alloantigen reicherten zwei Forschergruppen durch Immunpräzipitationen mit BNP-Ig Oberflächenproteine von PBL (Foucras et al., 2011) und MDBK-Zellen (Deutskens et al., 2011) an und wiesen anschließend mit 1D Western Blots eine Reaktion von BNP-Seren gegen Proteine aus den Anreicherungen mit einem Molekulargewicht von etwa 40 - 45 kDa (Foucras et al., 2011) sowie 44 kDa und 12 kDa (Deutskens et al., 2011) nach. Die massenspektrometrische Identifikation ergab für das größere Protein in beiden Studien MHC I (Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011) und für das kleinere Protein β 2-Mikroglobulin, die leichte Kette des MHC I Moleküls (Deutskens et al., 2011). Außerdem konnten sie MHC I als Bestandteil von PregSure BVD nachweisen (Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011). Aufgrund dessen zogen sie den Schluss, dass Antikörper gegen das bovine MHC I für die Entstehung von BNP ausschlaggebend sein könnten (Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011). Nach kritischer Betrachtung unserer eigenen Daten können wir diese Annahme nicht teilen oder bestätigen. Obwohl bovines MHC I auf der Oberfläche von PBL und auch auf Thrombozyten exprimiert ist, haben wir es bei unserer Alloantigensuche nie als Kandidatenprotein identifiziert. Während eine Detektion mittels 2D aufgrund der Hydrophobizität dieses Membranproteins nicht unbedingt zu erwarten war, hätte eine Immunreaktion von BNP-Ig auf thrombozytäres oder leukozytäres bovines MHC I zumindest in 1D Western Blots oder mittels IP festgestellt werden müssen. Anhand

unserer Analysen konnten wir jedoch bestätigen, dass bovines MHC I im Impfstoff vorhanden ist (Euler et al., 2013). Auch andere Forschergruppen beurteilen die Auslegung der Ergebnisse der beiden Studien, die bovines MHC I als BNP-Alloantigen beschreiben, kritisch (Kasonta et al., 2012, Laming et al., 2012). Dabei werfen sie die Frage auf, wie pathogene Antikörper, die gegen MHC I gerichtet sein sollen, alle Gewebe passieren können, mit denen sie nach Aufnahme durch das Kolostrum, bis sie ins Blut und das Knochenmark gelangen, in Kontakt kommen und die ebenfalls MHC I exprimieren, ohne dass diese geschädigt werden (Kasonta et al., 2012). Es wäre zu erwarten, dass die Alloimmun-Reaktion gegen weit mehr Zellen gerichtet ist, als nur gegen Blutzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen (Laming et al., 2012). In der Transfusionsmedizin werden die Antikörper meist in großen Mengen direkt in die Blutbahn gegeben. Obwohl in einer Studie 73% der untersuchten Blutspender anti-MHC I-Antikörper im Plasma enthielten, wurden nur bei 11% der Patienten mit TRALI ausschließlich anti-MHC I-Antikörper gefunden, ohne dass zugleich anti-MHC II- oder anti-HNA-Antikörper vorhanden waren, welche mit schwereren Formen der TRALI assoziiert sind (Reil et al., 2008). Wenn anti-MHC I-Antikörper über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden, sollte es besonders schnell zu einer Absättigung der Antikörper kommen, da die meisten kernhaltigen Zellen MHC I Moleküle exprimieren (Ambagala et al., 2005). Die Symptomatik der TRALI des Menschen beruht auf dem physiologischen Zurückhalten neutrophiler Granulozyten in den alveolären Kapillaren der Lunge (Bux und Sachs, 2007). Infolge der Targetierung der Endothelzellen und der neutrophilen Granulozyten durch Alloantikörper kommt es dabei zur lokalen Schädigung des Lungengewebes (Bux und Sachs, 2007). Außerdem müssen im Blut vorhandene Alloantikörper nicht unumgänglich zur Ausprägung einer Alloimmunkrankheit führen (Salinas et al., 2013). Die Anwesenheit von Antikörpern gegen Leukozytenantigene im Blut von Kühen während und nach einer Trächtigkeit wurde bereits in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben und ist durch die Immunisierung des Muttertieres mit paternalen Leukozytenantigenen bedingt (Newman und Hines, 1980, Bell et al., 2012). Zunächst wurden um 1960 Alloantikörper gegen Leukozytenantigene bei multiparen Frauen (Van Rood et al.,

1958) und Mäusen (Herzenberg und Gonzales, 1962) festgestellt. Auch beim Rind wurden Alloantikörper gegen Leukozytenantigene entdeckt, die peri-partal bei ca. 35% von Erstkalbinnen auftraten und immer eine Reaktion mit den Zellen des zugehörigen Kalbes zeigten (Newman und Hines, 1980). Während die fötale Expression von MHC I auf den Eihäuten kurz vor der Geburt physiologischerweise die Ablösung vom Uterus bedingt, beeinflussen unterschiedliche Kompatibilitäten zwischen MHC I des Muttertieres und des Kalbes das Risiko für die Entwicklung einer Plazentaverhaltung (Benedictus et al., 2012). Für das Rind existieren mindestens 61 Allele, die eine unterschiedliche Expression des bovinen MHC I bewirken (Deutskens et al., 2011). Die Ausbildung einer lokalen Immunantwort gegen fötale MHC I Moleküle ist für die Geburt notwendig, weshalb auch eine Alloimmunisierung gegen fötale MHC I häufig vorkommen muss. Inwiefern nun die anti-MHC I-Alloantikörper, die in den Seren der BNP-Überträgerkühe festgestellt wurden, für die Entstehung einer für die BNP relevanten Alloimmunantwort tatsächlich verantwortlich sind, bleibt vorerst fraglich (Kasonta et al., 2012, Laming et al., 2012). Beispielsweise zeigten in einer Studie von Deutskens et al. Ig von 50% (2/4) der geimpften Negativ-Kontrollkühe eine deutliche Reaktion auf Höhe von MHC I (Deutskens et al., 2011), was bedeuten könnte, dass die Entstehung der BNP nicht auf diese Alloantikörper zurückzuführen ist. Die publizierten Ergebnisse widersprechen sich auch zur Absättigung von MHC I-Bindungsstellen an MDBK-Zellen (Deutskens et al., 2011, Foucras et al., 2011, Schumann, 2011). Bei der untersuchten Bindung verschiedener BNP-IgG an MDBK-Zellen bewirkte die Präinkubation der Zellen mit dem anti-MHC I-Antikörper W6/32 (dieser detektiert bei humanen und bovinen Lymphozyten eine monomorphe Determinante des MHC I, wobei eine Reaktion von der Komplexbildung von MHC I mit β 2-Mikroglobulin abhängig ist) in allen Inkubationen eine Reduktion der BNP-Ig Bindung (Foucras et al., 2011). Die Präinkubation mit IL-A88, einem Antikörper, der gegen eine monomorphe Determinante der schweren Kette des bovinen MHC I Moleküls gerichtet ist, bewirkte hingegen nur bei 29% der BNP-Ig eine vergleichbare Reduktion der Bindung (um durchschnittlich 18%), bei 21% der BNP-Ig zeigte sich keine Änderung und bei 50% der BNP-Ig nahm die Bindung um durchschnittlich 14%

zu (Schumann, 2011). Eine Blockierung der Bindungsstelle für die pathogenen BNP-Alloantikörper durch einen rinderspezifischen anti-MHC I-Antikörper konnte demnach nicht reproduziert werden (Schumann, 2011).

Nachdem Allo- und Autoantikörper auch physiologischerweise vorkommen, ist es letztendlich essenziell, einen funktionellen Beweis für die Pathogenität eines bestimmten Alloantikörpers zu erbringen, um diesen als den Alloantikörper zu identifizieren, der für die Entstehung der BNP verantwortlich ist. Deshalb muss im Anschluss an den Nachweis der Spezifität des Alloantikörpers die pathogenetische Relevanz bewiesen werden, wie es auch für Autoantikörper bei Autoimmunerkrankungen gemacht wird. Damit ein Autoantigen in einer Immunkrankheit als pathogen angesehen werden kann, muss es die von Witebsky aufgeführten Postulate erfüllen (Rose und Bona, 1993). Demzufolge muss zuerst ein Zielantigen identifiziert werden, gegen das eine Auto-/ Alloimmunreaktion nachweisbar ist (Rose und Bona, 1993). Abschließend muss die Pathogenität dieses Antigens entweder indirekt, durch Reproduktion der Erkrankung mittels Induktion in einem Tierversuch bewiesen werden oder direkt durch Transfer der pathogenen Antikörper (Rose und Bona, 1993). Zur Klärung der Pathogenität eines Alloantikörpers bei der BNP wäre der Transfer des spezifischen Antikörpers in einem Kälbermodell somit die am besten geeignete Beweismethode, da hier das Problem der Spezies-Übertragbarkeit von Daten wegfällt und die induzierte Erkrankung direkt mit der spontan auftretenden BNP verglichen werden kann.

Wir gehen davon aus, dass bei der BNP die Überträgertiere eine seltene Isoform des gesuchten Alloantigens exprimieren und durch den Impfstoff eine Immunreaktion gegen die in der Vakzine enthaltene kanonische Sequenz ausgelöst wurde. Unsere Kriterien, die ein BNP-Alloantigen als Kandidaten in die engere Wahl für den funktionellen Beweis einschließen, sind folgende: a) Es muss im Impfstoff vorhanden sein, b) ein Ausfall der Funktion muss die Entstehung des Krankheitsbildes erklären können, c) es muss das von uns erarbeitete Expressionsmuster aufweisen und sollte seine Oberflächenexpression *in vitro* schnell verändern. Dementsprechend muss das pathogene Alloantigen eine Funktion bei der Blutgerinnung einnehmen und eine

Inhibition des Alloantigens (durch die Bindung der Alloantikörper) zu einem Ausfall der Thrombozytenfunktion führen.

Fünf der 34 Proteine, gegen die wir im Rahmen dieser Studie Alloimmun-Reaktionen nachweisen konnten, erfüllen die Bedingung, auch im Impfstoff nachweisbar zu sein. Diese fünf Kandidatenproteine sind Gamma-Aktin, HSPB1, Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Thrombospondin-1 und Filamin A (Tab. 4.7).

Gamma-Aktin ist ein zytoplasmatisches Protein, das viele Funktionen einnimmt, die sich auf die Organisation des Zytoskeletts auswirken (Perrin und Ervasti, 2010). Darunter fallen auch Funktionen, die beispielsweise besonders für die chemotaktische Fortbewegung von aktivierten Immunzellen und die Aktivierung von Thrombozyten essenziell sind, wie die Zellmotilität, die Ausbildung von Zell-Zellverbindungen und die Umgestaltung des Chromatins (Pollard et al., 2000, Perrin und Ervasti, 2010). Antikörper gegen dieses ubiquitär exprimierte, zytoplasmatische Protein wurden zum Beispiel bei der autoimmunen Hepatitis Typ 1 des Menschen gefunden (Orth et al., 1997, Granito et al., 2006), Gerinnungsstörungen treten allerdings bei Patienten mit autoimmuner Hepatitis Typ 1 nicht auf.

Eine unzureichende Aktin-Polymerisierung, die auf Mutationen des Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) beruht, welches ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vorhanden ist, führt zur Immunsuppression und zur Ausprägung von Koagulationsstörungen (Ariga, 2012). Diese Erkrankung zeigt, dass ein Ausfall der Aktin-Polymerisierung und der regulierenden Signalkaskaden zur Einschränkung der Zellmotilität und der Ausrichtung des Zytoskeletts von Immunzellen führen kann (Ariga, 2012). Hiervon sind explizit T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowie Granulozyten und Thrombozyten betroffen (Ariga, 2012). Pathognomonisch für das Wiskott-Aldrich Syndrom sind die Mikrothrombozyten, die Produktion der Thrombozyten ist jedoch nicht eingeschränkt (Ariga, 2012). Bei einem Funktionsausfall von Gamma-Aktin durch Targetierung der Alloantikörper könnte es demnach auch bei der BNP infolge einer eingeschränkten Zellmotilität und Zytoskelett-Reorganisation zum Untergang der Zellen kommen. Hierdurch könnten die BNP-Symptome ausgelöst werden. Allerdings sind beim Wiskott-Aldrich-Syndrom

nur die Zellen betroffen, in denen WASP auch exprimiert wird, da die Beeinträchtigung der Zellfunktion beim Wiskott-Aldrich Syndrom auf der Expression des WASP in den genannten hämatopoetischen Zellen beruht. Inwiefern bei einer Targetierung von Gamma-Aktin ausschließlich eine Immunantwort gegen diese Zellen gerichtet sein sollte, bleibt folglich offen. Zwar ist eine pathogenetisch relevante Beteiligung von Antikörpern gegen Gamma-Aktin bei der BNP aufgrund der erwarteten ubiquitären Expression eher unwahrscheinlich, aber wir werden die Expression von Gamma-Aktin in den Subpopulationen noch näher untersuchen, bevor wir es als Kandidatenprotein ausschließen.

Das HSPB1 (früher auch: Hitzeschock 27 kDa Protein oder Hitzeschock 28 kDa Protein) gehört zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine und wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (van Noort et al., 2012). Hitzeschockproteine binden als Chaperone an viele intrazelluläre Proteine und sind dadurch an einer Vielfalt von unterschiedlichen Stoffwechselwegen beteiligt (van Noort et al., 2012). Sie dienen jedoch auch extrazellulär als Liganden für verschiedene Signalmoleküle und binden auf der Oberfläche einer großen Anzahl unterschiedlicher Zellen, von denen auch einige eine wichtige Rolle im Immunsystem einnehmen (van Noort et al., 2012). Hitzeschockprotein Beta-5 moduliert beispielsweise die Thrombozytenfunktion, indem es die ADP-induzierte Granulasekretion der Thrombozyten unterdrückt (van Noort et al., 2012). HSPB1 wird außerdem von Stress-stimulierten B-Zellen sezerniert und konkurriert mit acetyliertem Low-density Lipoprotein um Bindungsstellen des Makrophagen Scavenger Rezeptor A (van Noort et al., 2012). Während es eine erhöhte IL-10 Sekretion bewirkt, wird die IL-1 β Produktion reduziert (van Noort et al., 2012). Interessanterweise bewirkt HSPB1 bei Makrophagen und dendritischen Zellen eine vermehrte Expression des immunsuppressiven Proteins Thrombospondin-1, einem weiteren unserer fünf Alloantigenkandidaten, und führt dabei zu einer Herunterregulation von aktivierten Immunprozessen (Miller-Graziano et al., 2008). Zudem wird die Aktivität von HSPB1 durch post-translationale Modifikationen reguliert (Benjamin und McMillan, 1998). Beispielsweise überwiegt in aktivierten humanen Thrombozyten die phosphorylierte Form von HSPB1, welche möglicherweise an Aktin, ebenfalls eines unserer Alloantigenkandidaten, bindet, um

für andere Proteine als Chaperone zu dienen oder um selbst funktionell zur Umgestaltung des Zytoskeletts und zur Aktivierung von Thrombozyten beizutragen (Zhu et al., 1994a). Außerdem interagiert phosphoryliertes HSPB1 mit dem thrombozytären Faktor XIII, wodurch es eine Rolle bei der Gerinnung einnimmt, da Faktor XIII zur Stabilisierung von Fibringerinnseln beiträgt (Zhu et al., 1994b). Demnach würden die Funktionen und die Lokalisation auf der Zellmembran sowie intrazellulär in Vesikeln die des gesuchten Alloantigens widerspiegeln (van Noort et al., 2012). Anti-HSPB1-Alloantikörper wurden bislang nicht bei Immunthrombozytopathien beschrieben, jedoch sind Autoantikörper gegen HSPB1 bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen, wie beispielsweise dem autoimmun-mediertem Glaukom (Boehm et al., 2012) und Erkrankungen der Koronararterien (Pourghadamyari et al., 2011) als statistisch signifikant erhöht beschrieben worden (van Noort et al., 2012). Wo genau jedoch ein auf anti-HSPB1-Antikörper zurückzuführender Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen bestehen soll, lässt sich bislang nicht erklären (van Noort et al., 2012). Daher wird eine pathogenetisch relevante Beteiligung von Antikörpern gegen HSPB1 an der Pathogenese dieser Vielzahl an Krankheiten als fragwürdig erachtet (van Noort et al., 2012).

Für eine Beteiligung von anti-HSPB1-Alloantikörpern an der Pathogenese der BNP spricht allerdings die durch Stress regulierte Expression in den entsprechenden bei der BNP betroffenen Zellen, die Beteiligung an Immunprozessen und an der Gerinnung, was HSPB1 zu einem sehr interessanten Alloantigenkandidaten für die BNP macht.

Die Purin-Nukleosid-Phosphorylase ist ein ubiquitär vorhandenes Protein und wird als Produkt eines Housekeeping Gens bezeichnet (Dalal et al., 2001). Das Enzym ist maßgeblich am Purin-Stoffwechsel beteiligt und ein Mangel, der auf diversen genetischen Mutationen beruhen kann, führt beim Menschen infolge einer Funktionseinschränkung von T-Lymphozyten zu einer schweren kombinierten Immunschwäche (*engl.* severe combined immunodeficiency, SCID), die letztendlich in einer Lymphozytopenie resultiert (Dalal et al., 2001). Dabei häuft sich in T-Lymphozyten Desoxyguanosin Triphosphat (dGTP) an, was daraufhin die

Apoptose der Zellen hervorruft (Ravandi und Gandhi, 2006). Isoformen der Purin-Nukleosid-Phosphorylase sind nach unserem Kenntnisstand beim Rind bisher noch nicht bekannt, es wird aber davon ausgegangen, dass auch für das bovine Enzym Polymorphismen in der Aminosäuresequenz vorhanden sind (Breer et al., 2008). Die häufig auftretenden Mutationen beim Menschen (Dalal et al., 2001) lassen zudem vermuten, dass eine Mutation, die sich lediglich auf die Konformation des Proteins auswirken würde, aber keinerlei Funktionseinschränkung hervorruft, auch bei Rindern vorhanden sein könnte. Wenn es erst infolge einer Targetierung durch Alloantikörper zur Beeinträchtigung der enzymatischen Funktion kommt, könnte das eine Anreicherung von dGTP spezifisch in den bei der BNP betroffenen Zellen hervorrufen. Ein Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Mangel führt allerdings beim Menschen (Bzowska et al., 2000) und bei Mäusen (Snyder et al., 1997) selektiv zu einem Ausfall der T-Lymphozyten Funktion, B-Lymphozyten sind hiervon aber meist nicht betroffen, weil sich dGTP aufgrund der enzymatischen Ausstattung und Aktivität in T-Lymphozyten leichter anreichert als in B-Lymphozyten (Bzowska et al., 2000). Nur in wenigen Fällen sind zusätzlich auch die Werte der B-Lymphozyten in Patienten mit Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Mangel reduziert (Somech et al., 2013). In einem Mausmodell wurde für drei verschiedene Punktmutationen im Gen für die Purin-Nukleosid-Phosphorylase gezeigt, dass die T-Zell Differenzierung proportional zur Enzymaktivität in den Zellen eingeschränkt ist und dass besonders die CD8⁺ T-Zellen zu Grunde gehen, während die CD4⁺ T-Zellfraktion weniger stark betroffen ist (Snyder et al., 1997). In einer kürzlich veröffentlichten Fallstudie wurde entdeckt, dass Patienten neben der Expression der normalen Variante von Purin-Nukleosid-Phosphorylase in einem Teil der Gewebe eine durch Mutation entstandene Splice-Variante in anderen Geweben exprimieren können (Somech et al., 2013). Dabei wurde das mutierte Allel wahrscheinlich bevorzugt von mononukleären Zellen des peripheren Blutes exprimiert (Somech et al., 2013). Obwohl für die Purin-Nukleosid-Phosphorylase keine bekannte Rolle bei der Thrombozytenfunktion beschrieben ist, wird sie gerade durch diese gewebe-spezifische Expression der Allele zu einem interessanten Alloantigenkandidaten für die BNP. Da bei Rindern keine Informationen über die Expression der Purin-

Nukleosid-Phosphorylase bei verschiedenen Zellpopulationen existieren, werden wir zunächst die Expression des Enzyms in Thrombozyten und den bei der BNP betroffenen Leukozyten analysieren.

Thrombospondin-1 zeigte eine Alloreaktivität mit Immunglobulinen von BNP-Überträgertieren auf Thrombozytenproteine bei 2D Western Blots (Abb. 4.1, Tab. 4.1, Spot 1) und wurde bei der IP mit MDBK-Lysat nur durch Immunglobuline des Überträgerkolostrums präzipitiert (Tab. 4.4, Protein 35). Außerdem konnte es durch die direkte massenspektrometrische Analyse im Impfstoff identifiziert werden (Euler et al., 2013). Thrombospondin-1 ist maßgeblich an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Adams und Lawler, 2011) und spielt eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung (Forslow et al., 2007). Außerdem wird Thrombospondin-1 von einer Reihe verschiedener Zellen exprimiert, wie beispielsweise Thrombozyten, Lymphozyten und Endothelzellen (Li et al., 2006, Forslow et al., 2007). Einerseits ist es häufig in der Zellmembran dieser Zellen lokalisiert, andererseits wird es unter anderem von Thrombozyten und Endothelzellen sezerniert (Li et al., 2006, Forslow et al., 2007). Dieses exogene Thrombospondin-1 interagiert auf der Zelloberfläche mit Integrinen, Proteoglykanen und anderen plasmamembranständigen Proteinen (Li et al., 2006, Forslow et al., 2007). Aktivierte Thrombozyten können eine gesteigerte Expression von Thrombospondin-1 auf ihrer Oberfläche zeigen, wie bei septischen Patienten beschrieben (Gawaz et al., 1997). Dies bedeutet, dass sich die Expression von Thrombospondin-1 je nach Aktivierungszustand flexibel ändern kann und könnte eine Erklärung dafür sein, warum die BNP-Ig der einzelnen Überträgerkühe so unterschiedlich mit den verschiedenen Spendertieren reagiert haben (Abb. 4.10 – 4.12). Zudem wird durch die Bindung von Thrombospondin-1 an Oberflächenrezeptoren unterschiedlicher Gewebe dessen Aufnahme ins Zellinnere und der dortige Abbau mediiert (Mikhailenko et al., 1997), was zeigt, dass exogenes Thrombospondin-1 wieder in die Zellen gelangt und bei der BNP für die Bindung von BNP-Ig an intrazelluläre Strukturen vieler Zellen verantwortlich sein könnte (Abb. 4.13). Monoklonale anti-CD41-Antikörper beeinträchtigen beispielsweise die Thrombozytenaggregation *in vitro*, indem sie von der Zelle aufgenommen werden und die zur Aggregation nötige Umgestaltung des Zytoskeletts stören

(Isenberg et al., 1990). Antikörper, die gegen Thrombospondin-1 gerichtet sind führen bei Mäusen ebenfalls zu einer verminderten Thrombozytenaggregation, weil sie die Bindung von Thrombospondin-1 an Fibrinogen und CD41 behindern (Asch et al., 1985, Legrand et al., 1992). In der Datenbank des National Center for Biotechnology Information sind für das bovine Thrombospondin-1 außerdem zwei unterschiedliche Aminosäuresequenzen enthalten (GenBank Accession Nummer: BAA21115.1 und DAA25420.1; National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>; Stand: März 2013). Um eine Beteiligung von anti-Thrombospondin-1 Antikörpern an der BNP näher zu untersuchen, könnte man als nächstes *in vitro* testen, ob und wie sich die Expression von Thrombospondin-1 auf der Zelloberfläche und im Zellinneren von stimulierten Thrombozyten und PBL ändert.

Filamin A (Tab. 4.7), auch Aktin-bindendes Protein 280 genannt, wurde über 1D Western Blots mit Thrombozytenmembranproteinen von Alloantikörpern detektiert (Abb. 4.3, Tab. 4.5, Spot 15 und 16) und aus PBL-Lysat immunpräzipitiert (Tab. 4.4, Protein 47). Außerdem wurde es ebenfalls im Impfstoff identifiziert. Filamine dienen zur Quervernetzung von Aktinfilamenten und nehmen somit eine wichtige Funktion in der Zellmotilität ein (Nakamura et al., 2011). Durch die Bindung von Membranproteinen beeinflusst Filamin A darüber hinaus auch viele Zell-Zell-Interaktionen und ist unter anderem an der Blutgerinnung beteiligt. Dabei kommuniziert es mit dem von-Willebrand-Faktor-Rezeptor, CD42b (Thrombozyten Glykoprotein 1b) und wirkt sich auf die Aktivierung von CD41 aus, dem Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten (Feng et al., 2003). Beim Menschen führen Mutationen im Filamin A-Gen, welches auf dem X-Chromosom liegt (van der Flier und Sonnenberg, 2001), zu den verschiedensten Erkrankungen, die sich auf die Entwicklung unterschiedlicher Organsysteme auswirken, wie beispielsweise Periventriculäre Heterotopie (Fox et al., 1998), Otopalatodigitales Syndrom Typ 1 und 2, Frontometaphyseale Dysplasie und Melnick–Needles Syndrom (Robertson et al., 2003). Für den Menschen sind drei Proteine in der Familie der Filamine beschrieben, Filamin A, Filamin B und Filamin C, wobei auch eine Co-Expression der Filamine beobachtet wurde (Sheen et al., 2002). Die Filamine werden zudem

unterschiedlich stark und, wenn sie co-exprimiert vorkommen, in einem unterschiedlichen Verhältnis von den verschiedenen Zellen exprimiert (Calderwood et al., 2001). Dabei weisen beim Menschen die Zellen des Immunsystems überwiegend Filamin A auf (Hayashi und Altman, 2006). T-Zellen exprimieren zum Beispiel ausschließlich Filamin A (Hayashi und Altman, 2006) und Thrombozyten zeigen eine höhere Expression von Filamin A als Makrophagen (Stossel et al., 2001). Kultivierte Zellen, die einen Filamin A-Mangel aufweisen, zum Beispiel M2 Zellen (eine humane Melanom-Zelllinie), zeigen eine Instabilität der Zellmembran und können dem inneren hydrostatischen Druck nicht ausreichend standhalten, was zur Ausbildung von sogenannten „blebs“ führt (Stossel et al., 2001). Hierbei handelt es sich um multiple sphärische Aneurysmen, die sich aus den Zellen hervorwölben, aber auch wieder zurückgebildet werden können (Stossel et al., 2001). In einer *in vivo* Studie mit genetisch veränderten Mäusen, bei denen ein Filamin A-Mangel in Thrombozyten hervorgerufen wurde, kam es im Vergleich zum Wildtyp zu verlängerten Gerinnungszeiten und einer Thrombozytopenie, wobei die verbleibenden Thrombozyten vergrößert waren (Falet et al., 2010). Durch die Bindung der Alloantikörper an Filamin A könnte es zu einer Funktionsbeeinträchtigung von Filamin A kommen und damit zu einer Instabilität der Zellmembran. Diese Instabilität könnte dann spätestens unter Einwirkung der Scherkräfte innerhalb der Blutgefäße zum Zugrunde gehen der Zellen führen. Wenn man *in vitro* die Expression von Filamin A (oder einem der anderen Alloantigenkandidaten) durch RNA-Interferenz in Thrombozyten, PBL oder MDBK-Zellen herunterreguliert, könnte man mittels Durchflusszytometrie oder Immunzytochemie testen, ob die Bindung durch BNP-Ig ebenfalls absinkt. Außerdem kann man in einem Zellkulturexperiment überprüfen, ob die Ig der Überträgerkühe direkt einen Untergang der Zellen bewirken und ob eine solche Wirkung der BNP-Ig abschwächt oder ausbleibt, nachdem man die Expression von Filamin A (oder einem der anderen Alloantigenkandidaten) durch RNA-Interferenz runterreguliert hat. Außerdem sollte die Morphologie der Thrombozyten und PBL von BNP-Kälbern oder der Filamin A gesilenceten Zellen überprüft werden. Die Targetierung von Filamin A durch Antikörper könnte eine Ausbildung von Blebs hervorrufen und die Expression

einer Isoform bei den BNP-Überträgerkühen könnten zu vergrößerten Thrombozyten führen. Des Weiteren spricht für eine Beteiligung von anti-Filamin A-Alloantikörpern an der Pathogenese der BNP, dass für bovines Filamin A in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information zwei unterschiedliche Aminosäuresequenzen beschrieben sind (NCBI Reference Sequence: NP_001193443.1 und DAA13210.1; National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>; Stand: März 2013), die sich in der Anzahl der Aminosäuren voneinander unterscheiden (54 Aminosäuren). Daher muss als nächstes überprüft werden, welche dieser Isoformen von Filamin A im Impfstoff enthalten ist und welche von den BNP-Überträgerkühen, sowie den geimpften Kontrollkühen exprimiert werden. Wenn die Isoform aus dem Impfstoff mit der der geimpften Kontrollkühe übereinstimmt, sich aber von der der BNP-Überträger unterscheidet, haben wir einen weiteren Anhaltspunkt dafür, ob Filamin A unser gesuchtes Alloantigen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle fünf, in dieser Studie identifizierten Kandidatenproteine interessante BNP-Alloantigenkandidaten darstellen. Da beim Rind die Expression der Alloantigenkandidaten nicht eingehend beschrieben ist, werden wir die Ko-Expression der Kandidatenproteine mit dem von den BNP-IgG targetierten Protein überprüfen. Daraufhin werden wir die selektierten Proteine klonieren und exprimieren, um zur Verifikation Immunreaktionen von BNP-IgG und Kontroll-IgG auf diese gereinigten Rinderproteine zu testen. Danach werden wir die verbleibenden Kandidatenproteine sequenzieren, um die Sequenz aus dem Genom der BNP-Übertragertiere mit denen der geimpften Kontrollkühe zu vergleichen. Anhand dessen lässt sich klären, ob eine genetische Variante besteht, die bei BNP-Überträgerkühen zu einer Expression einer entsprechenden Isoform führt, die damit die Alloantikörperbildung gegen die kanonische Sequenz erklärt, die bei den nicht reagierenden Rindern und im Impfstoff vorhanden sein muss. Diese Sequenz muss daraufhin mit einer größeren Anzahl von BNP-Überträgerkühen und mit PregSure BVD geimpften Negativ-Kontrolltieren abgeglichen werden. Abschließend muss dann der funktionelle Beweis der pathogenetischen Relevanz des Alloantigens erbracht werden, wie oben bei den MHC I-Alloantikörpern beschrieben. Dies kann entweder

durch einen Tierversuch in einem Nagermodell geschehen, woraufhin die Tiere infolge des Transfers des Kandidaten-spezifischen (monospezifischen) Antikörpers eine BNP-ähnliche Symptomatik entwickeln müssten. Alternativ könnte man den Alloantikörper direkt in ein Kalb transferieren. Das hätte den Vorteil, dass hier keine Spezies-spezifischen Unterschiede bei der Alloimmunantwort vorhanden wären und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des induzierten Modells mit der spontanen Erkrankung BNP optimal wäre. Bei einer Übereinstimmung des induzierten Krankheitsbildes wäre das pathogene Potenzial des Kandidaten-spezifischen Alloantikörpers erwiesen.

In dieser Arbeit wurden mit verschiedenen Methoden 34 potenzielle Alloantigenkandidaten, die für die Entstehung der BNP verantwortlich sein könnten, identifiziert und anhand der Charakterisierung des Proteoms von PregSure BVD auf fünf Kandidaten eingengt. Die Kandidatenproteine Gamma-Aktin, HSPB1, Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Thrombospondin-1 und Filamin A kommen für uns aufgrund ihres Expressionsmusters und ihrer Verbindung mit der Gerinnung und dem Immunsystem in die engere Auswahl zur weiteren Untersuchung. Zur abschließenden Verifikation werden wir im Anschluss an diese Arbeit die Genabschnitte, die die Expression der Proteine kodieren, sequenzieren. Falls das Vorliegen von Proteinvarianten aufgrund eines unterschiedlichen Genotyps als wahrscheinlich erachtet wird, werden wir versuchen, einen funktionellen Beweis der Beteiligung des Alloantigens an der Entstehung der BNP zu liefern. Eine solche Erkrankung als Folge der Immunisierung während der Gravidität mit einem inaktivierten Impfstoff, der auf einer homologen Zelllinie produziert wurde, wäre auch bei anderen Spezies denkbar, einschließlich dem Menschen (Laming et al., 2012). Daher ist es besonders wichtig, die Pathogenesemechanismen, die hier vorliegen, detailliert aufzuklären, um die Entstehung fehlgerichteter Alloantikörper nach einer Schutzimpfung zu verstehen und damit ähnliche Erkrankungen in Zukunft gezielt vermeiden zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) ist eine Erkrankung, die seit 2006 gehäuft auftritt und von der neugeborene Kälber bis zu einem Alter von vier Wochen betroffen sind. Charakteristische Symptome der BNP sind eine hochgradige Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Knochenmarksdepletion sowie multiple innere und äußere Blutungen. Die Letalität bei der BNP beträgt fast 90%. Alloantikörper, die durch die Immunisierung der Muttertiere mit einem ungenügend aufgereinigten Impfstoff (PregSure BVD) entstehen und via Kolostrum in das Kalb gelangen, binden dort an die im Blut zirkulierenden Zellen und führen zu deren Zerstörung. Da die zugrundeliegende Ätiologie und Pathogenesemechanismen bislang noch ungeklärt sind, war es das Ziel dieser Studie, das BNP-auslösende Alloantigen zu identifizieren.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich daher mit der Suche und Identifikation von Alloantigenen aus Thrombozyten und peripheren Blutleukozyten (PBL), die durch Immunglobuline (Ig) von BNP-Überträgerkühen erkannt und gebunden werden. Mit drei unterschiedlichen Methoden, 2D und 1D Western Blots sowie Immunpräzipitation, konnten wir insgesamt 34 Alloantigenkandidaten massenspektrometrisch identifizieren. Zudem konnten wir zeigen, dass es sich bei den Alloantikörpern um Immunglobuline der Klasse G (IgG) handelt, die in Blut und Kolostrum von BNP-Überträgerkühen vorliegen und Antigene auf Thrombozyten und PBL erkennen. Um aus diesem Pool an Kandidaten das relevante Alloantigen herausfinden zu können, war es zunächst notwendig, die Eigenschaften des Alloantigens näher zu charakterisieren, um Proteine ausschließen zu können, die dem Expressionsmuster nicht entsprechen.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden die Eigenschaften des Alloantigens näher charakterisiert und anschließend Kriterien zur Qualifizierung der Kandidaten als potenziell pathogenes Alloantigen festgelegt. So muss das gesuchte Alloantigen in der Vakzine enthalten sein und durch BNP-Ig gebunden werden. Es wird von den bei erkrankten Kälbern betroffenen Zellen des peripheren Blutes auf der Zellmembran sowie intrazellulär exprimiert. Die Expression des Alloantigens ist nicht auf die

Blutzellen junger Kälber beschränkt, sondern es wird auch bei älteren Rindern gleichstark exprimiert. Dabei variiert allerdings die Expression des Alloantigens zwischen den verschiedenen Individuen. Generell wird es jedoch am wenigsten auf der Oberfläche von Granulozyten (29%) exprimiert, am häufigsten auf Monozyten (72%) und auf etwa zwei Drittel der Lymphozyten. Innerhalb der Lymphozytensubpopulation ist es nur auf wenigen CD4⁺ T-Zellen (14%), vermehrt auf CD8⁺ T-Zellen (37%) und am häufigsten auf B-Zellen (65%) vorhanden.

Fünf der Alloantigenkandidaten, Gamma-Aktin, HSPB1, Purin-Nukleosid-Phosphorylase, Thrombospondin-1 und Filamin A, passen weitestgehend mit dem von uns erstellten Profil des Alloantigens überein. Die Bedeutung der Immunreaktion gegen diese fünf Proteine muss in zukünftigen Studien weiter untersucht und verifiziert werden. Zu diesem Zweck sollen die interessantesten Kandidatenproteine kloniert und exprimiert werden, um in Western Blots Immunreaktionen von BNP-Ig auf die spezifischen Rinderproteine zu testen. Des Weiteren soll durch Sequenzierung der entsprechenden Genabschnitte geklärt werden, ob eine unterschiedliche Expression der Proteine von BNP-Überträgern und geimpften Kontrollen vorliegt. Abschließend sollte das krankheitsauslösende Potenzial des Alloantigenkandidaten in einem Tiermodell verifiziert werden.

7 SUMMARY

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is a disease newly emerging since 2006 and affecting newborn calves of up to four weeks of age. Typical symptoms of BNP are severe thrombocytopenia, leukocytopenia and bone marrow depletion as well as multiple internal and external hemorrhages. The case fatality rate is almost 90%. Alloantibodies induced by immunization of cows with an insufficiently purified vaccine (PregSure BVD) and transferred into the calf via colostrum uptake, bind to circulating cells in peripheral blood and lead to their destruction. Since underlying etiology and pathogenesis have not been elucidated yet, the goal of this study was to identify the responsible pathogenic alloantigen causing BNP in calves.

The first part of this study describes the retrieval and identification of alloantigens derived from platelets and peripheral blood-leukocytes (PBL) that are recognized and targeted by immunoglobulins (Ig) of BNP-dams. With three different methods (2D and 1D Western blots as well as immunoprecipitation), we identified 34 proteins, all representing possible alloantigen candidates. We were able to demonstrate that BNP alloantibodies are IgGs that are present in the blood and colostrum of BNP dams which detect antigens of platelets and PBL. In order to determine the relevant alloantigen, it was necessary to further characterize the properties of the alloantigen, thus allowing us to exclude candidates that do not correspond to respective expression pattern.

In the second part of the study we created a profile of the wanted alloantigen and were able to establish the following criteria that need to be fulfilled by one of the candidate proteins in order to qualify as a potential pathogenic alloantigen. Respective alloantigen is a constituent of the vaccine and is targeted by BNP-Ig. Further, it is expressed intracellularly as well as on the plasma membrane of peripheral blood cells affected in diseased calves. Expression is not restricted to cells of young calves, but cells of older donors express the alloantigen in the same intensity. However, expression intensity varies between individuals. In general, the alloantigen is least expressed on cell surface of granulocytes (29%), most often on monocytes (72%) and on about two-thirds of lymphocytes. Regarding the lymphocyte

subpopulation in particular, the alloantigen is only present on a few CD4⁺ T-cells (14%), increased on CD8⁺ T-cells (37%) and most frequently expressed on B-cells (65%).

Five of our alloantigen candidates, Gamma-Actin, HSPB1, Purine Nucleoside Phosphorylase, Thrombospondin-1, and Filamin A match our profile most closely. The significance of immune reactions directed against these five proteins should be investigated and verified in future studies. Therefore, most interesting candidate proteins will be cloned and expressed in order to test immune reactions of BNP-Ig towards these purified bovine proteins by Western blot analysis. Furthermore, sequencing of the corresponding gene segments will elucidate a differential protein expression of BNP-donor dams and vaccinated control cows. Finally, the pathogenic potential of the alloantigen candidate will be verified in an animal model.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams J. C. und Lawler J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(10): a009712.
- Aghabeigi N., Lindsey N., Zamani A. und Shishaeyan B. (2012). Identification and characterization of anti-platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura patients. *Iran J Public Health* 41(2): 53-62.
- Ambagala A. P. N., Solheim J. C. und Srikumaran S. (2005). Viral interference with MHC class I antigen presentation pathway: The battle continues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 107(1-2): 1-15.
- Ammann V. J., Fecteau G., Helie P., Desnoyer M., Hebert P. und Babkine M. (1996). Pancytopenia associated with bone marrow aplasia in a Holstein heifer. *Can Vet J* 37(8): 493-495.
- Ariga T. (2012). Wiskott-Aldrich syndrome; an x-linked primary immunodeficiency disease with unique and characteristic features. *Allergol Int* 61(2): 183-189.
- Asch A. S., Leung L. L., Polley M. J. und Nachman R. L. (1985). Platelet membrane topography: colocalization of thrombospondin and fibrinogen with the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 66(4): 926-934.
- Assad A., Amann B., Friedrich A. und 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): 25-34.
- Ballingall K. T., Nath M., Holliman A., Laming E., Steele P. und 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): 128-132.
- Bastian M., Holsteg M., Hanke-Robinson H., Duchow K. und Cussler K. (2011). Bovine Neonatal Pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29(32): 5267-5275.
- Bell C. R., Rocchi M. S., Dagleish M. P., Melzi E., Ballingall K. T., Connelly M., Kerr M. G., Scholes S. F. und Willoughby K. (2012). Reproduction of bovine neonatal pancytopenia (BNP) by feeding pooled colostrum reveals variable alloantibody damage to different haematopoietic lineages. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Bell C. R., Scott P. R., Kerr M. G. und Willoughby K. (2010a). Possible preventive strategy for bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 167(19): 758.

- Bell C. R., Scott P. R., Sargison N. D., Wilson D. J., Morrison L., Howie F., Willoughby K. und Penny C. D. (2010b). Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec* 167(24): 938-940.
- Benedictus L., Thomas A. J., Jorritsma R., Davies C. J. und Koets A. P. (2012). Two-Way Calf to Dam Major Histocompatibility Class I Compatibility Increases Risk for Retained Placenta in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology* 67(3): 224-230.
- Benjamin I. J. und McMillan D. R. (1998). Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83(2): 117-132.
- Bilalic S., Veitinger M., Ahrer K. H., Gruber V., Zellner M., Brostjan C., Bartel G., Cejka D., Reichel C., Jordan V., Burghuber C., Muhlbacher F., Bohmig G. A. und Oehler R. (2010). Identification of Non-HLA antigens targeted by alloreactive antibodies in patients undergoing chronic hemodialysis. *J Proteome Res* 9(2): 1041-1049.
- Boehm N., Wolters D., Thiel U., Lossbrand U., Wiegel N., Pfeiffer N. und Grus F. H. (2012). New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye: A glaucoma study. *Brain, Behavior, and Immunity* 26(1): 96-102.
- 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: 248-254.
- Breer K., Girstun A., Wielgus-Kutrowska B., Staron K. und Bzowska A. (2008). Overexpression, purification and characterization of functional calf purine nucleoside phosphorylase (PNP). *Protein Expr Purif* 61(2): 122-130.
- Bridger P. S., Bauerfeind R., Wenzel L., Bauer N., Menge C., Thiel H. J., Reinacher M. und Doll K. (2011). Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141(1-2): 1-10.
- Bux J. (2005). Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sanguinis* 89(1): 1-10.
- Bux J. und Sachs U. J. H. (2007). The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *British Journal of Haematology* 136(6): 788-799.
- Bzowska A., Kulikowska E. und Shugar D. (2000). Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 88(3): 349-425.
- Calderwood D. A., Huttenlocher A., Kiosses W. B., Rose D. M., Woodside D. G., Schwartz M. A. und Ginsberg M. H. (2001). Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* 3(12): 1060-1068.

- Carrette O., Burkhard P. R., Sanchez J. C. und Hochstrasser D. F. (2006). State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* 1(2): 812-823.
- Chattha K. S., Firth M. A., Hodgins D. C. und Shewen P. E. (2009). Age related variation in expression of CD21 and CD32 on bovine lymphocytes: A cross-sectional study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130(1–2): 70-78.
- Chi S. L. und Pizzo S. V. (2006). Cell surface F1Fo ATP synthase: a new paradigm? *Ann Med* 38(6): 429-438.
- Colin Y., Cherif-Zahar B., Le Van Kim C., Raynal V., Van Huffel V. und Cartron J. P. (1991). Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 78(10): 2747-2752.
- Curtis B. R., Cox N. J., Sullivan M. J., Konkashbaev A., Bowens K., Hansen K. und Aster R. H. (2010). The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an R>Q154 amino acid substitution. *Blood* 115(10): 2073-2076.
- Dalal I., Grunebaum E., Cohen A. und Roifman C. M. (2001). Two novel mutations in a purine nucleoside phosphorylase (PNP)-deficient patient. *Clin Genet* 59(6): 430-437.
- Deeg C. A., Pompetzki D., Raith A. J., Hauck S. M., Amann B., Suppmann S., Goebel T. W., Olazabal U., Gerhards H., Reese S., Stangassinger M., Kaspers B. und Ueffing M. (2006). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5(8): 1462-1470.
- Deutskens F., Lamp B., Riedel C. M., Wentz E., Lochnit G., Doll K., Thiel H. J. und Rumenapf T. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res* 42(1): 97.
- Dyballa N. und Metzger S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*(30).
- Euler K. N., Hauck S. M., Ueffing M. und 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: 18.
- Falet H., Pollitt A. Y., Begonja A. J., Weber S. E., Duerschmied D., Wagner D. D., Watson S. P. und Hartwig J. H. (2010). A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med* 207(9): 1967-1979.

- Feng S., Resendiz J. C., Lu X. und Kroll M. H. (2003). Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha regulates von Willebrand factor-induced platelet activation. *Blood* 102(6): 2122-2129.
- Forslow A., Liu Z. und 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): 66-76.
- Foucras G., Corbiere F., Tasca C., Pichereaux C., Caubet C., Trumel C., Lacroux C., Franchi C., Burlet-Schiltz O. und Schelcher F. (2011). Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol* 187(12): 6564-6570.
- Fox J. W., Lamperti E. D., Ekşioğlu Y. Z., Hong S. E., Feng Y., Graham D. A., Scheffer I. E., Dobyns W. B., Hirsch B. A., Radtke R. A., Berkovic S. F., Huttenlocher P. R. und Walsh C. A. (1998). Mutations in filamin 1 Prevent Migration of Cerebral Cortical Neurons in Human Periventricular Heterotopia. *Neuron* 21(6): 1315-1325.
- Friedrich A., Buttner M., Rademacher G., Klee W., Weber B. K., Muller M., Carlin A., Assad A., Hafner-Marx A. und Sauter-Louis C. M. (2011). Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res* 7: 10.
- Friedrich A., Rademacher G., Weber B. K., Kappe E., Carlin A., Assad A., Sauter-Louis C., Hafner-Marx A., Buttner M., Bottcher J. und Klee W. (2009). Increase in the incidence of a bleeding disorder in voting calves due to bone marrow damage. *Tieraerztliche Umschau* 64(10): 423-431.
- Fukunaka M., Toyoda Y., Kobayashi Y., Furuoka H. und Inokuma H. (2010). Bone marrow aplasia with pancytopenia and hemorrhage in a Japanese Black calf. *J Vet Med Sci* 72(12): 1655-1656.
- Gawaz M., Dickfeld T., Bogner C., Fateh-Moghadam S. und Neumann F. J. (1997). Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 23(4): 379-385.
- Gosselin V. B., Fecteau G. und Nichols S. (2011). Presumptive bovine neonatal pancytopenia in a Holstein calf in Quebec. *Can Vet J* 52(7): 788-790.
- Granito A., Muratori L., Muratori P., Pappas G., Guidi M., Cassani F., Volta U., Ferri A., Lenzi M. und Bianchi F. B. (2006). Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 59(3): 280-284.
- Greinacher A., Wesche J., Hammer E., Furll B., Volker U., Reil A. und Bux J. (2010). Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med* 16(1): 45-48.

- Hauck S. M., Dietter J., Kramer R. L., Hofmaier F., Zipplies J. K., Amann B., Feuchtinger A., Deeg C. A. und Ueffing M. (2010). Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 9(10): 2292-2305.
- Hauck S. M., Schoeffmann S., Amann B., Stangassinger M., Gerhards H., Ueffing M. und Deeg C. A. (2007). Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6(6): 2121-2131.
- Hayashi K. und Altman A. (2006). Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C-theta. *J Immunol* 177(3): 1721-1728.
- Hein W. R. und Mackay C. R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 12(1): 30-34.
- Herzenberg L. A. und Gonzales B. (1962). Appearance of H-2 agglutinins in outcrossed female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 570-573.
- Hoogenboom H. R., de Bruine A. P., Hufton S. E., Hoet R. M., Arends J. W. und Roovers R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4(1): 1-20.
- Isenberg W. M., Bainton D. F. und Newman P. J. (1990). Monoclonal antibodies bound to subunits of the integrin GPIIb-IIIa are internalized and interfere with filopodia formation and platelet aggregation. *Blood* 76(8): 1564-1571.
- Jaskowski J. M., Polak M. P., Marszalek A., Nowak K., Frackowiak H. und Olechnowicz J. (2012). Bovine neonatal pancytopenia in calves in Poland. *Pol J Vet Sci* 15(3): 565-566.
- Kaboord B. und Perr M. (2008). Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 424: 349-364.
- Kang D. H., Gho Y. S., Suh M. K. und Kang C. H. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23(11): 1511-1512.
- 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., Bottcher J. und 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): 31-41.
- Kasonta R., Sauter-Louis C., Holsteg M., Duchow K., Cussler K. und Bastian M. (2012). Effect of the vaccination scheme on PregSure(R) BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia. *Vaccine* 30(47): 6649-6655.

- Katsumata Y., Kawaguchi Y., Baba S., Hattori S., Tahara K., Ito K., Iwasaki T., Yamaguchi N., Oyama M., Kozuka-Hata H., Hattori H., Nagata K., Yamanaka H. und Hara M. (2011). Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* 10(6): M110 005330.
- Krappmann K., Weikard R., Gerst S., Wolf C. und Kuhn C. (2011). A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J* 190(2): 225-229.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- 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. und Holliman A. (2012). Factors associated with bovine neonatal pancytopenia (BNP) in calves: a case-control study. *PLoS One* 7(5): e34183.
- Laming E., Melzi E., Scholes S. F., Connelly M., Bell C. R., Ballingall K. T., Dagleish M. P., Rocchi M. S. und 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(1): 599.
- Legrand C., Thibert V., Dubernard V., Begault B. und Lawler J. (1992). Molecular requirements for the interaction of thrombospondin with thrombin-activated human platelets: modulation of platelet aggregation. *Blood* 79(8): 1995-2003.
- Li S. S., Liu Z., Uzunel M. und Sundqvist K. G. (2006). Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion. *Blood* 108(9): 3112-3120.
- Li W. und Caberoy N. B. (2010). New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(4): 909-919.
- MacGillivray A. J. und Rickwood D. (1974). The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *Eur J Biochem* 41(1): 181-190.
- Mari A., Ciardiello M. A., Tamburrini M., Rasi C. und Palazzo P. (2010). Proteomic analysis in the identification of allergenic molecules. *Expert Rev Proteomics* 7(5): 723-734.
- Marth J. D. und Grewal P. K. (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8(11): 874-887.

- Mikhailenko I., Krylov D., Argraves K. M., Roberts D. D., Liao G. und Strickland D. K. (1997). Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino-terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 272(10): 6784-6791.
- Miller-Graziano C. L., De A., Laudanski K., Herrmann T. und Bandyopadhyay S. (2008). HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function. *Novartis Found Symp* 291: 196-208; discussion 208-111, 221-194.
- Nakamura F., Stossel T. P. und Hartwig J. H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr* 5(2): 160-169.
- Newman M. J. und Hines H. C. (1980). Stimulation of maternal anti-lymphocyte antibodies by first gestation bovine fetuses. *J Reprod Fertil* 60(1): 237-241.
- Ng J. K., Malotka J., Kawakami N., Derfuss T., Khademi M., Olsson T., Linington C., Odaka M., Tackenberg B., Pruss H., Schwab J. M., Harms L., Harms H., Sommer C., Rasband M. N., Eshed-Eisenbach Y., Peles E., Hohlfeld R., Yuki N., Dornmair K. und Meinel E. (2012). Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 79(23): 2241-2248.
- Ng K. M. (2012). Anti-neurofascin antibodies: assay development and analysis of inflammatory diseases in the peripheral and central nervous system. Dissertation, LMU München: Graduate School of Systemic Neurosciences (GSN).
- O'Farrell P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250(10): 4007-4021.
- Ong S. E. und Pandey A. (2001). An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18(5): 195-205.
- Orth T., Gerken G., Kellner R., Meyer zum Buschenfelde K. H. und Mayet W. J. (1997). Actin is a target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis type-1. *J Hepatol* 26(1): 37-47.
- Pardon B., Steukers L., Dierick J., Ducatelle R., Saey V., Maes S., Vercauteren G., De Clercq K., Callens J., De Bleecker K. und Deprez P. (2010). Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis* 57(3): 135-146.
- Pardon B., Stuyven E., Stuyvaert S., Hostens M., Dewulf J., Goddeeris B. M., Cox E. und Deprez P. (2011). Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 141(3-4): 293-300.

- Penny C. D., Bell C., Morrison L., Howie F. und Willoughby K. (2009). Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *Vet Rec* 164(24): 762.
- Perrin B. J. und Ervasti J. M. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(10): 630-634.
- Pillay T. S. (2004). A fisherman's tale: Phage display as a discovery tool. *Discov Med* 4(23): 315-318.
- Pollard T. D., Blanchoin L. und Mullins R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576.
- Pourghadamyari H., Moohebbati M., Parizadeh S., Falsoleiman H., Dehghani M., Fazlinezhad A., Akhlaghi S., Tavallaie S., Sahebkar A., Paydar R., Ghayour-Mobarhan M. und Ferns G. (2011). Serum antibody titers against heat shock protein 27 are associated with the severity of coronary artery disease. *Cell Stress and Chaperones* 16(3): 309-316.
- Puccetti A. und Lunardi C. (2010). The role of peptide libraries in the identification of novel autoantigen targets in autoimmune diseases. *Discov Med* 9(46): 224-228.
- Rabilloud T., Chevallet M., Luche S. und Lelong C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 73(11): 2064-2077.
- Racanelli V., Prete M., Musaraj G., Dammacco F. und Perosa F. (2011). Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. *Autoimmun Rev* 10(8): 503-508.
- Ravandi F. und Gandhi V. (2006). Novel purine nucleoside analogues for T-cell-lineage acute lymphoblastic leukaemia and lymphoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15(12): 1601-1613.
- Reil A., Keller-Stanislawski B., Gunay S. und 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): 313-317.
- Robertson S. P., Twigg S. R., Sutherland-Smith A. J., Biancalana V., Gorlin R. J., Horn D., Kenwrick S. J., Kim C. A., Morava E., Newbury-Ecob R., Orstavik K. H., Quarrell O. W., Schwartz C. E., Shears D. J., Suri M., Kendrick-Jones J., Wilkie A. O. und Group O. P.-s. D. C. C. (2003). Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 33(4): 487-491.

- Rose N. R. und Bona C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14(9): 426-430.
- Salinas G. F., Braza F., Brouard S., Tak P. P. und Baeten D. (2013). The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clin Immunol* 146(1): 34-45.
- Salinovich O. und 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): 341-347.
- Sanchez-Miguel C., McElroy M. und Walsh E. (2010). Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland. *Vet Rec* 166(21): 664.
- Saulot V., Vittecoq O., Charlionet R., Fardellone P., Lange C., Marvin L., Machour N., Le Loet X., Gilbert D. und Tron F. (2002). Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46(5): 1196-1201.
- Sauter-Louis C., Carlin A., Friedrich A., Assad A., Reichmann F., Rademacher G., Heuer C. und 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): 49-58.
- Schmidt E., Skrobek C., Kromminga A., Hashimoto T., Messer G., Bröcker E. B., Yancey K. B. und Zillikens D. (2001). Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *British Journal of Dermatology* 145(5): 778-783.
- Schroter P., Kuiper H., Holsteg M., Puff C., Haas L., Baumgartner W., Ganter M. und Distl O. (2011). [Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(9-10): 390-400.
- Schumann D. (2011). Bovine neonatale Pancytopenie: Laborexperimentelle Untersuchungen im Rahmen der Ursachenforschung. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- Sheen V. L., Feng Y., Graham D., Takafuta T., Shapiro S. S. und Walsh C. A. (2002). Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Genet* 11(23): 2845-2854.
- Shimada A., Onozato T., Hoshi E., Togashi Y., Matsui M., Miyake Y., Kobayashi Y., Furuoka H., Matsui T., Sasaki N., Ishii M. und Inokuma H. (2007). Pancytopenia with bleeding tendency associated with bone marrow aplasia in a Holstein calf. *J Vet Med Sci* 69(12): 1317-1319.

- Smith G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705): 1315-1317.
- Snyder F. F., Jenuth J. P., Mably E. R. und Mangat R. K. (1997). Point mutations at the purine nucleoside phosphorylase locus impair thymocyte differentiation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2522-2527.
- Somech R., Lev A., Grisaru-Soen G., Shiran S. I., Simon A. J. und Grunebaum E. (2013). Purine nucleoside phosphorylase deficiency presenting as severe combined immune deficiency. *Immunol Res*.
- Sousa M. M., Steen K. W., Hagen L. und 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: 45.
- Stossel T. P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig J. H., Noegel A., Schleicher M. und Shapiro S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 138-145.
- Stott L. M., Barker R. N. und Urbaniak S. J. (2000). Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood* 96(13): 4011-4019.
- Swadzba M. E., Hirmer S., Amann B., Hauck S. M. und Deeg C. A. (2012). Vitreal IgM autoantibodies target neurofilament medium in a spontaneous model of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(1): 294-300.
- Switzer R. C., 3rd, Merrill C. R. und Shifrin S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 98(1): 231-237.
- ten Have S., Boulon S., Ahmad Y. und Lamond A. I. (2011). Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics* 11(6): 1153-1159.
- van der Flier A. und Sonnenberg A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538(2-3): 99-117.
- Van Leeuwen A., Eernisse J. G. und Van Rood J. J. (1964). A New Leucocyte Group with Two Alleles: Leucocyte Group Five. *Vox Sanguinis* 9(4): 431-446.
- van Noort J. M., Bsibsi M., Nacken P., Gerritsen W. H. und Amor S. (2012). The link between small heat shock proteins and the immune system. *Int J Biochem Cell Biol* 44(10): 1670-1679.
- Van Rood J. J., Eernisse J. G. und Van Leeuwen A. (1958). Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women. *Nature* 181(4625): 1735-1736.

- Walmsley N. und Hampton P. (2011). Bullous pemphigoid triggered by swine flu vaccination: case report and review of vaccine triggered pemphigoid. *J Dermatol Case Rep* 5(4): 74-76.
- Westermeier R. und Schickle H. (2009). The current state of the art in high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Arch Physiol Biochem* 115(5): 279-285.
- Willoughby K., Gilray J., Maley M., Dastjerdi A., Steinbach F., Banks M., Scholes S., Howie F., Holliman A., Baird P. und McKillen J. (2010). Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 166(14): 436-437.
- Witt K., Weber C. N., Meyer J., Buchheit-Renko S. und Muller K. E. (2011). Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 169(9): 228.
- Zhao L., Liu C., Sun Y. und Ban L. (2012). A rapid and simplified method for protein silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 33(14): 2143-2144.
- Zhu Y., O'Neill S., Saklatvala J., Tassi L. und Mendelsohn M. E. (1994a). Phosphorylated HSP27 associates with the activation-dependent cytoskeleton in human platelets. *Blood* 84(11): 3715-3723.
- Zhu Y., Tassi L., Lane W. und Mendelsohn M. E. (1994b). Specific binding of the transglutaminase, platelet factor XIII, to HSP27. *J Biol Chem* 269(35): 22379-22384.
- Zipplies J. K., Hauck S. M., Eberhardt C., Hirmer S., Amann B., Stangassinger M., Ueffing M. und Deeg C. A. (2012). Miscellaneous vitreous-derived IgM antibodies target numerous retinal proteins in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 15 Suppl 2: 57-64.

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger 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.

Ganz herzlich möchte ich mich besonders bei Frau PD Dr. Cornelia A. Deeg bedanken. Sie hat mir die Möglichkeit geboten, an der Erforschung der Pathogenese dieses brisanten Themas teilzuhaben und stand mir jederzeit mit ihrer ausgezeichneten fachlichen Kompetenz sowie ihrem großen persönlichen Engagement zur Seite. Sie war eine hervorragende und geduldige Betreuerin, die meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten weckte und war stets bemüht meinen Horizont durch die Teilnahme an Tagungen und dem regen Austausch mit Kooperationspartnern zu erweitern. Außerdem hat sie mir die Mitarbeit an mehreren Publikationen ermöglicht. Vielen lieben Dank!

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Frau Dr. Stefanie M. Hauck. Neben der Bereitstellung von Gerätschaften am Helmholtz Zentrum München hat sie mir die Gelegenheit geboten neue Methoden zu erlernen. Durch ihr großes fachliches Wissen konnte sie mir insbesondere bei technischen Fragen weiterhelfen. Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. Marius Ueffing danken, der mir die Arbeit in der Abteilung Proteinanalytik des Helmholtz Zentrum Münchens überhaupt ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Bärbl Amann und Frau Sieglinde Hirmer für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor sowie die zahlreichen aufheiternden Gespräche. Frau Bärbl Amann möchte ich für die unzähligen Einblicke danken, die sie mir in ihr Labor Know-how und Know-how-not-to gewährt hat. Bei Frau Sieglinde Hirmer möchte ich mich für ihre stets hilfsbereite und fröhliche Art bedanken und hoffe, dass sie neben einer Socke auch alsbald Handschuhe, eine Mütze und eine dicke Daunenjacke für ihre Aufenthalte im Exil in Sibirien geschenkt bekommt.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Angestellten der Klinik für Wiederkäuer der LMU München für die Bereitstellung von Proben bedanken. Herrn Prof. Dr. Dr. Martin Förster, Dr. Stefan Nüske und den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim möchte ich dafür danken, dass ich dort regelmäßig Blutproben

entnehmen durfte und sie mir zahlreiche Proben an Erstkolostrum bereitgestellt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch der Familie Murr, die mich auf ihrem Hof immer herzlich willkommen hießen und sich jedes Mal Zeit für die Probenentnahme genommen haben, auch wenn es (in der Landwirtschaft durchgehend) viel zu tun gab. Danken möchte ich auch all den Kühen und Kälbern, die meist ganz brav ihr Blut für diese Studie gespendet haben.

Den Mitarbeitern der Abteilung Proteinanalytik und der Core Facility Proteomics des Helmholtz Zentrum München danke ich herzlichst für ihre tolle Unterstützung und die schöne Zeit am Helmholtz Zentrum. Dr. Juliane Merl, Dr. Christine von Törne, Silke Becker, Jennifer Behler, Nicole Senninger, Fabian Gruhn, Saskia Hanf, Joanna Kucharska, Matteo Gorza und auch allen anderen danke ich für die vielen hilfreichen Antworten auf meine zahlreichen Fragen und die lustigen gemeinsamen Abende.

Ganz besonders möchte ich meinen außerordentlich tollen Kollegen und meinen Vorgängern am Institut für Tierphysiologie bedanken. Dr. Margarete Swadzba, Dr. Roxane Degroote, Christoph Szober, Kristina Fröhlich, Gudrun Treutlein, Christina Eberhardt, Carmen Ehrmann, Ute Klein und Nina Burkhardt danke ich von ganzem Herzen für die bewundernswerte Unterstützung im Labor und auch am Schreibtisch. Die außerordentliche Teamfähigkeit und die gegenseitige Hilfe in allen Lebenslagen machte die Zeit zu einem unvergesslichen Abschnitt in meinem Leben. Die Momente, die wir auf den vielen aufregenden Ausflügen und Stammtischen gemeinsam verbracht haben, werden mir immer in Erinnerung bleiben. Ich wünsche ihnen, dass sich ihre beruflichen Ziele, in welche Richtung auch immer, verwirklichen lassen. Vielen herzlichen Dank!

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Angehörigen danken. Meine Eltern haben mir Vieles in meinem Leben ermöglicht und für mich die Voraussetzungen geschaffen, das Studium und die Promotion durchführen zu können. Ich möchte ihnen meine große Bewunderung für ihr Engagement für die ökologisch-dynamische Landwirtschaft und tierartgerechte Haltung aussprechen, was für mich der Anreiz war den Weg in die Tiermedizin einzuschlagen. Meine Brüder, Schwägerinnen und meine Großeltern standen mir immer hilfsbereit, tatkräftig und großzügig zur Seite. Ich danke ihnen für die vielen lustigen und aufbauenden Gespräche und die wundervollen Care-Pakete während meiner Studienzzeit. Danken möchte ich auch meinen Freunden, die mich ebenfalls in allen Lebenslagen unterstützt haben und denen ich allen eine wunderbare Zeit verdanke.