

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin in Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut Berlin.

DISSERTATION

**Produktion von aviären Antikörpern (IgY) gegen virulente bovine Rotaviren B223
(G10P[11]) und gegen Plasmide, kodierend für RV-Proteine mit dem Ziel zur
Anwendung als therapeutische/prophylaktische Antikörper bei
Durchfallerkrankungen in der Kälberaufzucht.**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Viktoriya Tokaryeva
aus Simferopol

Datum der Promotion : 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1 Zusammenfassung	7
2 Summary	8
3 Einleitung	10
3.1 Einführung	10
3.2 Rotaviren	11
3.2.1 Systematik der Rotaviren.....	11
3.2.2 Aufbau der Rotaviren.....	11
3.2.3 Humanpathogene Rotaviren.....	16
3.2.4 Tierpathogene Rotaviren.....	18
3.3 IgY-Technologie	20
3.3.1 Geschichte.....	21
3.3.2 Vorzüge der IgY-Technologie.....	22
Vorteile der IgY-Technologie sind neben dem Aspekt des Tierschutzes (reduce, replace, refine; Russel and Burch 1959) solche Aspekte wie Wissenschaft und Ökonomie.	22
3.3.3 Vorzüge der gene gun Immunisierung.....	23
3.3.4 Eiphysiologie.....	24
3.3.5 Aviäres Immunsystem (Besonderheiten der Leihimmunität).....	24
3.3.6 IgY, seine Struktur und Unterschiede zu IgG. Physikochemische Eigenschaften.....	26
3.3.7 Beispiele der Anwendung von IgY in der Veterinärmedizin.....	28
3.3.8 Beispiele der Anwendung von IgY in der Humanmedizin.....	29
3.3.9 Beispiele der IgY-Anwendung in der Aquakultur.....	30
4 Zielstellung der Arbeit	31
5 Tiere, Material, Methoden	34
5.1 Hühnerhaltung	34
5.2 Antikörperproduktion	36
5.2.1 Antigenherstellung.....	36
5.2.2 Immunisierung.....	36
5.2.3 IgY-Reinigung mittels PEG-Präzipitation.....	38
5.3 PAGE	41
5.4 Western Blot (modifiziert nach: Towbin et al. 1989 sowie Blake et al. 1984).....	43
5.5 ELISA	45

5.6	Immunhistochemie, Zellzucht.....	46
5.7	Neutralisationstest.....	47
5.8	Statistische Analyse.....	47
6	Ergebnisse.....	48
6.1	Legeleistung und Einfluss der Immunisierung auf die Legeleistung	48
6.2	Total-IgY-Entwicklung	51
6.3	Titermonitoring (ELISA).....	54
6.4	PAGE.....	57
6.5	Western Blot	57
6.6	Immunhistochemie	58
6.7	Neutralisationstest.....	60
7	Diskussion.....	61
7.1	Übersicht IgY-Antikörper, deren Vorzüge und IgY-Technologie.....	61
7.2	Lagerung der IgY-Antikörper	62
7.3	Teilprozesse der IgY-Technologie und Beeinflussung dieser Vorgänge.....	62
7.4	Einfluß der unterschiedlichen Haltungssysteme auf die Legeleistung und die humorale Immunantwort.....	62
7.5	Einfluß der unterschiedlichen Adjuvantien auf die Legeleistung und auf den Antikörpertiter, Nebenwirkungen der Adjuvantien.....	64
7.6	Altersabhängige Kinetik der Legeleistung und des total-IgY.....	64
7.7	Einfluß der IgY-Extraktionsmethode auf die IgY-Konzentration.....	65
7.8	Biologische Oszillationen der IgY-Konzentration	66
7.9	Wirksamkeit des protektiven IgY im Mausmodell und im Kälbermodell. Durch das IgY bewirkte Immunmodulation im Darm.	66
7.10	Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Immunisierung mit Vollvirus bzw. mit Plasmiden, mögliche Ursachen. Gene gun Immunisierung	67
8	Schlussfolgerung für die Zukunft.....	72
9	Literatur.....	73
10	Erklärung.....	97
11	Lebenslauf	98
	Danksagung.....	101

Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
BRV	Bovines Rotavirus
CF	Cystische Fibrose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dest.	destilliert
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETEC	Enterotoxische Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPR	Endoplasmatisches Retikulum
FCA	komplettes Freund-Adjuvans
FCI	inkomplettes Freund-Adjuvans
FCS	fetales Kälberserum
FEM	Forschungseinrichtungen experimentelle Medizin
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GF	Gefiederfarbe
HBC	hyperimmunes bovines Colostrum
HEK	Human Embryonic Kidney
HP	Helicobacter pylori
IgY	Immunoglobulin Y
i.m.	intramuskulär
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
mRNA	mitochondriale Ribonucleinsäure
MEM	minimum essential medium
NSP	Nicht-Strukturproteine

PA	Pseudomonas aeruginosa
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylene Glycol
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RV	Rotavirus
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrilamidgelelektrophrese
SEM	standard error of the mean
S. aureus	Staphylacoccus aureus
S. mutans	Staphyloccocus mutans
TBS-T 0,05%	Tris-buffered Saline-Tween 0,05%
TEMED	Tetramehylethylendiamin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
VP	Virusproteine
VP5*	Virusprotein VP5, Spaltprodukt des VP4
VP8*	Virusprotein VP8, Spaltprodukt des VP 4
vs.	versus

1 Zusammenfassung

Bovine Rotaviren (BRV)-Infektion ist eine bedeutende Ursache der katarrhalischen Enteritis der Kälber, die sich in einer akuten Diarrhö äußert und die Tiere insbesondere in den ersten drei Lebenswochen erheblich beeinträchtigt. Die Erkrankung wird durch das Trennen der Kälber von den Muttertieren begünstigt, so dass der Transfer schützender Kolostral-Ak fehlt. Die ökonomischen Verluste, die durch solche Infektionen verursacht werden sind immens.

Lokale passive Immunität ist die effizienteste Strategie, um die Erkrankung zu kontrollieren. Die IgY-Technologie (Produktion von Antikörpern im Huhn und deren unblutige Extraktion aus dem Eidotter) stellt eine attraktive Alternative zur Prävention der neonatalen Diarrhö dar. Es ist seit mehr als hundert Jahren (Klemperer 1893) bekannt, dass immunisierte Hühner spezifische Ak in das Eidotter sezernieren. In den letzten vier Dekaden erfährt diese Methode ihre Renaissance und gewinnt an Wichtigkeit sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie/Prophylaxe von Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin. Es ist eine minimalinvasive, preiswerte Methode zur Herstellung großer Mengen spezifischer Ak in kurzer Zeit.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden anti-BRV spezifische Antikörper durch Immunisierung der Hühner mit einem B223 Rotavirus-Strang generiert. Die Immunisierung der Hühner fand auf zwei unterschiedliche Weisen statt, zum einen die klassische Immunisierung mit Vollvirus, zum anderen die Gene Gun Immunisierung mit Genabschnitten, kodierend für Virusproteine VP4, VP6 und VP7, sowie mit deren Mix. Im ELISA und in der Immunhistochemie zeigten die mit Vollvirus immunisierten Hühner hohe Titer spezifischer Ak. Der Titer der gene gun immunisierten Tiere fiel jedoch niedriger aus, bei einer Gesamtzahl an Immunisierungen/Boosterungen von 5, mit den besten Ergebnissen bei der Anwendung des Plasmid-Mix bei einer Gesamtzahl an Immunisierungen /Boosterungen von 9. Neutralisierende Eigenschaften zeigten nur die durch klassische Immunisierung erzeugten Ak.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Immunisierung mit Vollvirus eine effektive Methode zur Herstellung der anti-BRV-Ak darstellt. Betreffend der gene gun Immunisierung stellt sich die Vermutung auf, dass wahrscheinlich längere

Immunisierungszeiten zur Entwicklung eines höheren Ak-Titer erforderlich sind, um neutralisierende Eigenschaften zu erreichen.

2 Summary

Bovine rotavirus infection is an important cause of severe diarrhea (catarrhal enteritis) in new born calves and lead to significant impairment for the animals especially until the 3. week of life. The separation of the newborn calves from their mother facilitate the infection, because of missing transfer of the Colostral-Antibodies. The BRV-diarrhea results in great financial loss.

Local passive immunity is the most efficient strategy to control the disease.

IgY-technology (production of antibodies in a hen and their non-invasive extraction from egg yolk) is an attractive approach for prevention of neonatal diarrhea. 1893 Klemperer already described the existence of protective antibodies in the eggs. During the last three decades IgY-technology undergoes its renaissance and is becoming more and more important in the diagnostic and therapy/prevention of infectious diseases in human and veterinary medicine. This method is minimal-invasive, cost effective and allows to produce large amounts of specific antibodies in a short time.

In the present doctoral thesis anti-BRV specific antibodies were generated in chicken via immunisation with B223-strain of rotavirus. Two different ways of immunisation were performed, the classical immunisation with whole virus on one hand and the gene gun immunisation with DNA-Plasmids coding for virus proteins VP4, VP6, VP7 and with a plasmid mix on the other hand. All received antibodies were specific when used in ELISA and immunohistochemistry, with high titers in the classical immunised hens. Titer developed by gene gun immunised hens was a way lower, with the best results shown by the mix of plasmids. The neutralizing activity was demonstrated only by immunisation with the whole virus.

These results indicate that the classical immunisation is an effective method of anti-BRV-antibodies production. Concerning gene gun we hypothesize, that long term-

immunisations are necessary for a development of high Ab-titer and perhaps to obtain Ab with neutralising activity.

3 Einleitung

3.1 Einführung

Neonatale Kälberdiarrhö ist eine schwerwiegende Erkrankung, die in den ersten Lebenswochen eine erhebliche Beeinträchtigung für die Tiere darstellt (Garaicoechea et al. 2006, Bendali et al. 1999a, Bendali et al. 1999b, Bridger 1994, Okada and Matsumoto 2002). Die häufigste Ursache für die Auslösung der Kälberdiarrhö ist die Infektion mit den Rotaviren (Bendali et al., 1999b). Begünstigt wird das Auftreten der Erkrankung durch die übliche Praxis, dass die Kälber separat von den Muttertieren durch Milchsubstitute ernährt werden, so dass der Transfer schützender mütterlicher Ak aus dem Colostrum fehlt oder durch die zu frühe Separation der Kälber nicht lange genug erfolgt (Kohara and Tsunemitsu 2000, Parreño et al. 2004). Die ökonomischen Verluste, die durch derartige Infektionen verursacht werden sind immens, zurückzuführen auf ein retardiertes Wachstum der Kälber, entsprechende Behandlung sowie Todesfälle (Bellinzoni 1990, Schwermer 2002). Es existiert keine spezifische Behandlung der RV-Diarrhö. Die Kälber erhalten Substitutionstherapie mit Flüssigkeit und Elektrolyten und Antibiotika zur Prävention und Therapie der bakteriellen Superinfektion. Die gegenwärtige Strategie zur Krankheitskontrolle basiert auf einer Vakzinierung der Muttertiere vor der Geburt mit dem Ziel der Ak-Konzentrationserhöhung im Blut und Kolostrum und Transfer schützender Ak dem Nachwuchs oder verlängerte/kontinuierliche Gabe von Immunkolostrum (Saif et al. 1983, 1987, Tsunemitsu et al. 1989, Kohara et Tsunemitsu 2000, Vega et al. 2011). Diese Strategien reduzieren zwar eine schwere Diarrhö, beugen jedoch nicht der Infektion oder klinischen Symptomen vor (Bendali et al. 1999b, Parreño et al. 2004). Außerdem sind diese Strategien nicht rentabel (Kuroki et al. 1993) Seit einigen Dekaden konnte bewiesen werden, dass die orale Gabe spezifischer anti-RV-Antikörper aus dem Eidotter als Futtersupplement dramatisch die Morbidität und die Mortalität der Kälber zu reduzieren in der Lage ist (z.B. Kuroki et al. 1997, Mine and Covacs-Nolan 2002). Zur Herstellung dieser, IgY genannten Antikörper kamen sowohl inaktivierte als auch virulente Rotaviren zur Anwendung. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Immunisierung sowohl „klassisch“ mit einem Vollvirus als auch mittels gene gun, mit Plasmiden kodierend für Virusproteine (VP4, VP6 und VP7) einzeln und als Mix. Der Prozess der IgY-Produktion ist in der Literatur als IgY-Technologie beschrieben (Staak

1996). Die IgY-Technologie ist eine effektive Methode, die sowohl in der Prophylaxe bzw. Therapie von RV-induzierten Kälberdiarrhö, aber auch in der Prophylaxe und Therapie anderer Infektionskrankheiten, sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin interessant ist (Sarker et al. 2001, Narat 2003, Hirai et al. 2010).

3.2 Rotaviren

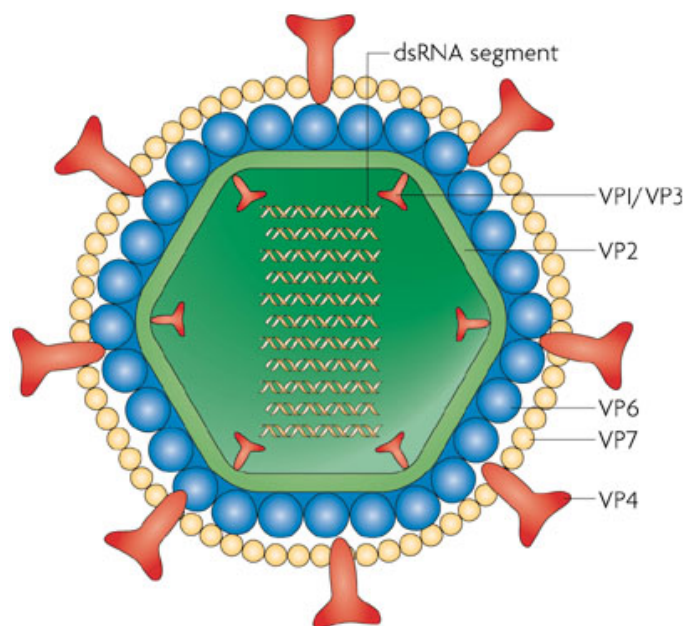
3.2.1 Systematik der Rotaviren

Rotaviren teilt man in die Gruppen A-E und weitere Subgruppen aufgrund der Antigenspezifität des Virusstrukturproteins VP6 ein, eventuell existieren auch zwei weitere Gruppen F und G (Matthijssens et al. 2012). Die Rotaviren der Gruppe A sind am häufigsten für die humanmedizinischen Infektionen verantwortlich (Ramig 2004, Angel et al. 2007). Für die Klassifikation der Viren in die Serotype bedient man sich der neutralisierenden Epitope des VP7-Strukturproteins (Glykoprotein), G-Serotype genannt und des VP4-Proteins, P-Serotype genannt (Angel et al. 2007). Da das virale Genom segmentiert ist, kann die Segregation der für die VP7 und VP4 kodierenden Gene unabhängig voneinander erfolgen, somit eine binäre Nomenklatur erzeugend. Es existieren 15 G Serotype, die im Allgemeinen den G Genotypen entsprechen. Mehr als 90% der identifizierten humanpathogenen RV-Stränge sind in G1, G2, G3, G4 und G9 klassifiziert. Es gibt 14 P-Serotype und 25 P-Genotype, die nicht immer äquivalent sind. Z.B. der Wa-Strang des RV, welcher oft im Labor zum Einsatz kommt, wird auch als P1A[8]G1-Virus bezeichnet. In der Humanmedizin assoziiert sich G1, G3, G4 und G9 oft mit P1A[8] und G2 mit P1B[4], was die virale Vielfalt limitiert. Somit teilen sich die weltweit zirkulierenden Rotaviren die kreuzreagierenden neutralisierenden Epitope des P1 Serotyps (Angel et al. 2007).

3.2.2 Aufbau der Rotaviren

Rotaviren (lat. rota, für Rad) sind human- und tierpathogene Vertreter der Familie „Reoviridae“. Die Rotaviruspartikel besitzen eine sphärische Form und messen 70 bis 80 nm (Bishop et al. 1973). Ein Virion besteht aus drei Proteinschichten von ikosaedrischer Struktur (Abb.1). Die innere Core-Struktur setzt sich aus 11-Segmenten doppelsträngiger RNA und den VP1 und VP3-Proteinen zusammen und steht in

Wechselwirkung mit den VP2-Proteinen, welche die Core-Schale bilden. Das innere Capsid umgibt die Core-Struktur und besteht aus dem VP6. Das äußere Capsid besteht aus dem VP7-Protein und ist mit VP4-Spikes dekoriert (Angel et al. 2007, Kovacs-Nolan et al. 2003, Modrow et al. 2010). Das äußere Capsid ist von 132 Öffnungen durchsetzt. Diese Öffnungen setzen sich zu Kanälen fort, die von VP6 gebildet werden. Diese Kanäle reichen bis zum Partikel-Core und sind für Ionendiffusion und vermutlich für den Transkripttransport zuständig. Die Virionen besitzen keine Membranhülle (Modrow et al. 2010).



Nature Reviews | Microbiology

Abb.1: Schematischer Aufbau eines Rotavirus-Virions. Die Virionen weisen einen dreischichtigen Aufbau auf. Das innere Core wird aus 11 Segmenten doppelsträngiger RNA und den VP1- und VP3-Proteinen gebildet und steht in Wechselwirkung mit VP2. VP2 interagieren zu einer Core-Schale. Inneres Kapsid wird durch VP6, äußeres durch VP4 und VP7 gebildet (Bildquelle: Nature Reviews. Microbiology).

3.2.2.1 Strukturproteine (Abb. 1 und Abb. 2)

Das VP7 ist das Hauptglykoprotein und die Hauptkomponente des äußeren Capsids. Dieses dient der Virionen-Adsorption an der Zelloberfläche. Die meisten bis jetzt

beschriebenen RV-neutralisierenden Ak sind gegen Epitope dieses Proteins gerichtet (Ludert et al. 2002).

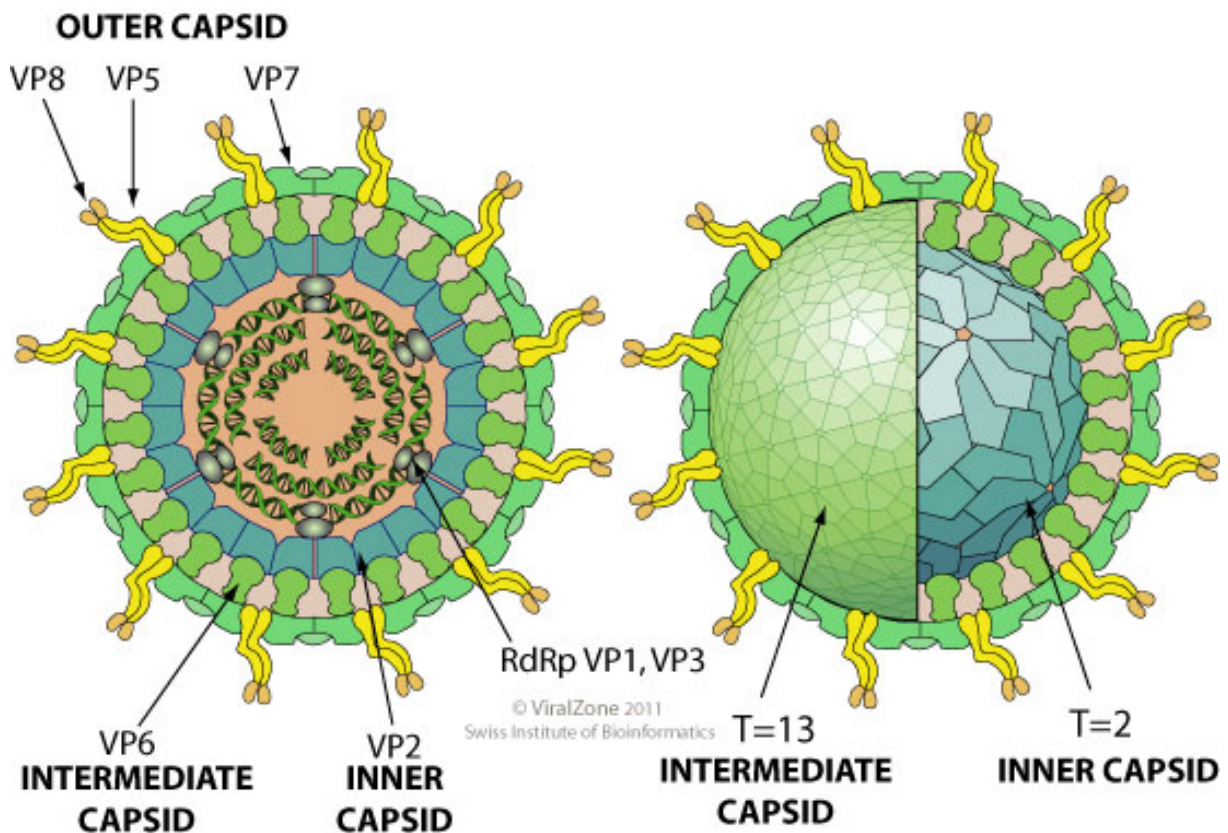


Abb.2 Rotavirus-Virion. Strukturproteine VP5 und VP8 als Spaltprodukte des VP4. Bildquelle: ViralZone 2011, Swiss Institute of Bioinformatics.

Die Viren-Spikes wurden als VP4-Virusprotein identifiziert. VP4 ist ein nicht glykosiliertes Protein (Prasad et al. 1988) und steht im Zusammenhang mit mehreren Funktionen, einschließlich der Virusanlagerung an die Zelle, Penetration, Hämagglutination und stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar (Yeager et al. 1994, Dhama et al. 2009). Mithilfe einer trypsinähnlichen Protease erfolgt die Spaltung des VP4 in ein aminoterminal Protein VP8* der Viren mit hämagglutinierender Aktivität und ein carboxyterminales VP5* (Yeager et al. 1994, Ruggeri and Greenberg 1991, Kovacs-Nolan et al. 2003). VP8* spielt eine signifikante Rolle in der viralen Infektiosität und im Prozess der Virusneutralisation (Kovacs-Nolan et al. 2003). VP5* ist ebenfalls für die Infektiosität der Viren verantwortlich aufgrund von seinem Einfluss auf die Penetrationsfähigkeit der Partikel (Modrow et al. 2010). Bekannt ist, dass die AS-

Sequenzvariationen des VP5* mit der unterschiedlichen Virulenz einzelner Virusstämme in Verbindung steht (Modrow et al. 2010).

Sowohl VP7 als auch VP4 sind somit das Ziel der neutralisierenden Ak des humoralen Immunsystems (Hoshino et al. 1985 nach Ludert et al. 2002). 1991 haben Ruggeri und Greenberg feststellen können, dass monoklonale Ak gegen VP8* mittels Inhibierung der Virusbindung an die Zelle zur Virusneutralisierung führen.

Die effizientesten RV-neutralisierenden Ak sind jedoch alle gegen VP7 gerichtet, und es ist bislang sehr wenig über den Neutralisationsmechanismus bekannt. Laut der Hypothese von Dormitzer et al. (2000) binden die neutralisierenden monoklonalen Ak an VP7 des Virion und beugen somit der Calciumchelatierung und der viralen Decapsidierung vor.

Das VP6-Protein ist das gruppenspezifische Ag und ist gemeinsam für alle RV-Typen. Dagegen gerichtete Ak sind ein diagnostisches Kriterium für eine Rotavirusinfektion (Dhama et al. 2009, Modrow et al. 2010).

Die Core-Proteine VP1, VP2 und VP3 spielen eine wichtige Rolle in der viralen Transkription. Das VP2 produziert ein für die regelrechte VP1-Funktion notwendiges Protein und stellt die Hauptkomponente des Virus-Cores dar (Dhama et al. 2009).

Die Proteine VP1 und VP3 stehen in Verbindung mit den Genom-Segmenten. VP1 beteiligt sich an der Genomreplikation. VP1 ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. VP3 bildet einen Komplex mit VP1 und spielt eine wichtige Rolle in der Transkription. VP3 ist zusätzlich eine Guanyltransferase und Methylase (Angel et al. 2007, Modrow et al. 2010, Dhama et al. 2009).

3.2.2.2 Nichtstrukturproteine

Insgesamt sind sechs NSP bekannt. Diese sind aktiv in den Vorgang der Replikation und der Virusmorphogenese in den infizierten Zellen involviert.

Das glykosylierte NSP4-Protein ist in das ER eingelagert und ist z. B. für den Transport der aus dem inneren Capsid bestehenden Viruspartikeln in das ER-Lumen im Rahmen der Virusmorphogenese zuständig (Modrow et al. 2010). NSP4 erfüllt außerdem eine Enterotoxin-Funktion und die Funktion eines Virulenzfaktors im Sinne einer Erhöhung der intracellulären Ca²⁺-Konzentration und ruft eine Homeostase-Störung im Wirt hervor (Estes 2003 nach Dhama et al. 2009).

Das NSP1 ist ein Zinkfingerprotein, es interagiert mit den während der Infektion gebildeten mRNA-Molekülen.

Die Wechselwirkung zwischen NSP1 und NSP3 scheint wichtig für die Verpackung der mRNA-Segmente in die Core-Partikel zu sein.

Durch Interaktion mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G verstärkt das NSP3 die Effektivität zur Translation der viralen Transkripte (Modrow et al. 2010).

3.2.2.3 Replikation

Nach der oralen Virusaufnahme befallen Rotaviren die reifen Enterozyten der proximalen Abschnitte des Dünndarms (Dhama et al. 2009). Die Bindung der Viren an die Zelloberfläche und deren Penetration ist assoziiert mit dem Protein VP4 und noch nicht im Detail beschriebenen Aktivität des VP7 (Gilbert and Greenberg 1997). Die wirksame Kolonisierung und Infektiosität bedarf proteolytischer Spaltung und Entfernung des äußeren Capsids, was durch Chymotrypsin und Trypsin erleichtert wird (Ramig 2004, Dhama et al. 2009). Der Mechanismus der Virusaufnahme ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, sowohl Aufnahme mittels Endosomen, als auch direkte Interaktion der Zellmembran mit dem äußeren Capsid sind beschrieben. Kürzlich wurden für VP4 und VP7 Aminosäuresequenzen aus der Integrinfamilie beschrieben. Deren Funktion ist vermutlich Virusbindung und Aufnahme in die Zelle (Hewish et al. 2000, Modrow et al. 2010). Das äußere Capsid wird während der Virusaufnahme entfernt, was durch niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen begünstigt wird. VP7 ist ein Ca^{2+} -bindendes Glykoprotein. In vitro Ca^{2+} -Chelatierung resultiert in einer Solubilisierung des äußeren Capsids (Dormitzer et al. 2000). Weiterhin kommt es zur Umlagerung des inneren Capsids und zu der dadurch hervorgerufenen Aktivierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Cohen et al. 1979, Dhama et al. 2009). Weitere enzymatische Aktivitäten des Proteinkomplexes VP1, VP2, VP3 und evtl. auch VP6 sind die einer Guanyltransferase, einer Nucleotidphosphorylase und zweier Methylasen. Diese sorgen für Transkription des Genoms und synthetisieren 5'-gecapte mRNA-Moleküle (Modrow et al. 2010). Weiterhin erfolgt der Transport dieser mRNA-Moleküle ins Cytoplasma und deren Translation. Die sich im Cytoplasma anreichernden Virusproteine bilden Einschlußkörperchen und werden Viroplasma genannt. mRNA-Moleküle verbinden sich mit VP1-VP3 und VP6 im Bereich des Viroplasma und dadurch entstehen innere

Capsidpartikeln. Im Rahmen der Replikation kommt es -in Zellkultur beobachtet- zur einer Umordnung (Rearrangement) der RNA-Segmente. Die Bedeutung dieses Prozesses ist noch nicht vollständig verstanden, möglicherweise entstehen überlebensfähigere Virusvarianten mit erhöhter Virulenz. Weiterhin geschieht die Anlagerung der VP4 und VP7-Proteine an die inneren Capside und somit Ausbildung des äußeren Capsids. Im Rahmen der Morphogenese erfolgt die Ergänzung der mRNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen mithilfe des in die Partikel aufgenommenen Transkriptasekomplexes. Häufig kommt es jedoch noch vor der Fertigstellung der Doppelstränge zum Zelltod (Modrow et al. 2010, Dhama et al. 2009).

3.2.3 Humanpathogene Rotaviren

3.2.3.1 Epidemiologie und Klinik

Die Rotaviren sind jährlich für ca. 111 Millionen Gastroenteritis-Episoden bei Kindern <5 Jahren verantwortlich, von denen 25 Millionen Klinikbesuche, 2 Millionen Hospitalisierung und ungefähr 611.000 Todesfälle resultieren (Parashar et al. 2003, Parashar et al. 2006). Die Krankheit ist wahrscheinlich aus soziökonomischen und epidemiologischen Gründen sehr ungleichmäßig zwischen den entwickelten Ländern und Entwicklungsländern verteilt mit den meisten Todesfällen in den Entwicklungsländern (Angel et al. 2007). Die Gruppe A Rotaviren sind am häufigsten für die Durchfallerkrankungen bei Kindern <5 Jahren zuständig (Ramig 2004, Angel et al. 2007). 1973 wurde der menschliche Rotavirus aus dem Stuhl von erkrankten Kindern isoliert (Bishop et al. 1973). Rotaviren sind die Hauptursache der schweren und fatalen Kinder-Gastroenteritiden (Pammi and Haque 2011). Die Übertragung erfolgt in den meisten Fällen fäkal-oral, besonders durch Schmierinfektionen (Hauri et al. 2006). Die Viren sind stabil und behalten lange ihre Infektiosität. Die Dauer der Inkubation beträgt ein bis drei Tage. Die auftretenden Symptome sind Fieber, Erbrechen, abdominelle Schmerzen und Diarrhö. Bei einem komplizierten Verlauf kann es durch die Verschiebungen der Elektrolytkonzentrationen im Blut zur Lethargie und auch zum Tod führen (Hauri et al. 2006, Modrow et al. 2010).

3.2.3.2 Pathogenese und Immunreaktion

Rotaviren infizieren die reifen Enterocyten vorzüglich der proximalen Abschnitte des Dünndarmepithels. Es kommt zum Anschwellen der Zellen, Vakuolenbildung und Zelltod wodurch die Dünndarmzotten gelähmt erscheinen. Die Funktion des NSP4, im Sinne eines Enterotoxins erhöht die Ca^{2+} -Konzentration. Dies zieht nach sich den Zusammenbruch des Cytoskeletts. Es kommt zur Steigerung des Cl^- -Ionenexportes. Der aus den Ionenkonzentrationsverschiebungen resultierende Schaden der Enterozytenfunktion äußert sich im Auftreten von Diarrhö (Modrow et al. 2010, Dhama et al. 2009, Ramig 2004).

Das Immunsystem reagiert mit Produktion von IgM-, IgG- und IgA-Ak gegen die Virusproteine. Spezifische Ak gegen die Proteine des äußeren Capsids wirken neutralisierend. IgA nehmen an der Viruselimination teil und schützen vor Reinfektion. Es wird angenommen, dass ebenfalls cytotoxische T-Zellen für die Viruselimination unerlässlich sind (Modrow et al. 2010, Angel et al. 2007).

3.2.3.3 Diagnostik, Therapie und Prophylaxe

Diagnostik erfolgt z. B. durch Isolierung des RV aus den Feces und Identifizierung mittels Elektronenmikroskopie. Eine schnellere Methode des Virusnachweises ist die Detektion viraler RNA mittels PCR. Die RV-Infektion kann außerdem im Ag-Capture-ELISA nachgewiesen werden (Modrow et al. 2010).

Aktuell existiert noch keine virusspezifische Therapie. Die Therapie beschränkt sich auf die Substitution von Flüssigkeit und Elektrolyten. Aktuell sind auf dem Markt 2 RV-Impfstoffe, Rotateq und Rotarix, zur Prophylaxe der RV-Infektion. Beide Impfstoffe durchliefen eine Testierung in größten Studien, in denen diese als sicher und effektiv eingestuft worden sind. Obwohl beide Vakzinen in vielen Ländern weltweit approbiert worden sind, ist deren Schutzmechanismus nicht ausreichend verstanden und einige Aspekte bezüglich der Sicherheit und Effektivität müssen weiter erforscht werden (Angel et al. 2007, Hauri et al. 2006).

3.2.4 Tierpathogene Rotaviren

3.2.4.1 Epidemiologie und Klinik, zoonotisches Potential

Die Rotaviren sind für neonatale Diarrhö in mehreren Tierarten verantwortlich: z.B. bei Kälbern, Mäusen, Ferkeln, Hühnern (Bartz et al. 1980) und verursachen zum Teil bedeutende wirtschaftliche Schäden (Vega et al. 2011). Ausscheidung der Viren geschieht mit dem Kot, die Ansteckung erfolgt durch kontaminiertes Wasser und Futter und indirekt durch kontaminierte Geräte oder Einstreu. Die akute RV-Infektion hat eine sehr kurze Inkubationszeit von 12-24 Stunden. Es kommt zur einer katarrhalischen Enteritis, die sich in akuter Diarrhö äußert. (z.B. Dhama et al. 2009, Woode et al. 1976, Modrow et al. 2010).

Über zoonotisches Potential wird spekuliert (Matthijnssens et al. 2006; Martella et al. 2006). Die Menschen können sich nicht durch Kontakt mit einem infizierten Tier anstecken. Jedoch sind insbesondere RNA-Viren durch Mutations- und Rekombinationsvorgänge in der Lage ihre Eigenschaften zu verändern. Die Doppelinfektion einer Zelle kann zu einem Reassortment (Austausch einzelner RNA-Segmente zwischen den Viren) führen, und somit die Entstehung der Erreger mit neuen immunogenen und pathogenen Eigenschaften nach sich ziehen. Für die Existenz eines genetischen Reassortments spricht die hohe Sequenzhomologie verschiedener Gene der humanen und bovinen Virusisolate (Otto 2001).

3.2.4.2 Pathogenese und Immunreaktion

Auch in Tieren sind Dünndarmenterocyten das Ziel der Viren. Die Zellen werden in ihrer Funktion gehindert und zerstört. Diarrhö kann durch mehrere Mechanismen verursacht sein: Malabsorption, Zottenischämie und Aktivierung des ENS (enterischen Nervensystems) und NSP4-stimulierte Darmsekretion im Sinne eines Enterotoxins (Estes et al. 2001, Dhama et al. 2009). Im Verlauf der Infektion wird in der Darmschleimhaut eine lokale Immunantwort ausgelöst (Modrow et al. 2010, Vega et al. 2011).

3.2.4.3 Diagnostik, Therapie und Prophylaxe

Eine einfache Methode des Virusinfektionsnachweises ist die elektronenmikroskopische

Darstellung der Partikel in den Feces, alternativ kommt Antigen-Capture-ELISA in Frage, der jedoch stark von der Ak-Spezifität abhängt. Die Viren können in einem Medium mit Trypsinzusatz kultiviert werden (Modorow et al. 2010).

Bis jetzt existiert keine spezielle Therapie. Mit dem Colostrum werden schützende Antikörper transferiert (Saif et al. 1987). Die jungen Tiere werden jedoch üblicherweise von den Muttertieren separiert und von Milchsubstituenten ernährt, was die Rotavirusinfektion begünstigt (Kohara and Tsunemitsu 2000, Parreño et al. 2004, Sarker and Hammarström 2006). Insofern versprechen die mittels IgY-Technologie erzeugten Ak als Futterzusatz hier eine Abhilfe zu schaffen, die sowohl zur Prophylaxe als auch für die Therapie in der Human- und Veterinärmedizin interessant sind (Pauly et al. 2009, Vega et al. 2011, Sarker et al. 2001).

3.3 IgY-Technologie

Der Schutz vor RV-induzierter Diarrhö stellt bis heute ein relevantes Problem dar, bei Kleinkindern, insbesondere in Entwicklungsländern (Ramig 2004, Parashar et al. 2006), aber auch bei einer breiten Gruppe der Mammalia und Aves (Dhama et al. 2009, Schade et al. 2007). Diarrhö ist eine der häufigsten Erkrankungen der neugeborenen Kälber und die wichtigste Ursache für deren Mortalität (Bendali et al. 1999b). Zu den häufigen Erregern der Kälberdiarrhö zählen *Escherichia coli* (EHEC), Rota- und Coronaviren (Kuroki et al. 1997, Ikemori et al. 1992, 1997, Kovacs-Nolan 2004a, Kovacs-Nolan and Mine 2012). Rotavirus ist der häufigste der in die neonatale Kälberdiarrhö involvierten Pathogene (Garaicoechea et al., 2006). Die RV-induzierte Diarrhö zieht nach sich größere finanzielle Verluste in der Kälberaufzucht als jede andere Infektion (Bellinzoni et al., 1990). Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität und bisher fehlenden spezifischen Therapien sowie steigender Antibiotikaresistenz (Yegani and Korver 2010) ist Prävention und Heilung der Kälber ein wichtiges Ziel. In den letzten drei Dekaden hat sich die Gabe spezifischer Antikörper gegen eine Vielzahl enterischer Pathogene als erfolgreich gezeigt (e.g. Kovasc-Nolan 2012). Hyperimmunes bovines Colostrum mit spezifischen Ak hatte einen effektiven therapeutischen Effekt auf die enterischen Infektionen (Mitra et al. 1995) u.a. auch auf die von Rotaviren verursachten. Die praktische Anwendung dieser Methode ist jedoch durch Schwierigkeiten in der Produktion der HBC (hyperimmunes bovines Colostrum)-Ak in großen Mengen limitiert (Sarker and Hammarström 2006). Das Hühner-IgY (Eidotter-Immunglobulin) wird aktiv aus dem Blut der Hühner in das Eidotter transportiert (Morrison et al. 2002, Tesar et al. 2008) und schützt die Küken vor vielen unterschiedlichen Infektionen (Lösch 1986, Sarker and Hammarström 2006). Spezifische Antikörper von den immunisierten Hühnern haben sich in den letzten Jahren in vielen Studien (e.g. Hirai 2010, Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Nilsson 2007, 2008, Schade et a. 2005) als eine erfolgreiche Strategie für passive Immunisierung gegen enterische Infektionen gezeigt.

3.3.1 Geschichte

Vor mehr als 100 Jahren immunisierte Klemperer Hühner mit einer steigenden Dosis virulenter Tetanus-Bouillon-Kultur um zu untersuchen, ob protektive Ak nicht nur im Blut der Hühner, sondern auch in den Eiern existieren (Klemperer 1893). Ein Extrakt aus den Dottern dieser Hühnereier hatte einen schützenden Effekt auf die damit behandelten Mäuse, die im Anschluss eine dosis letalis des Tetanus-Bouillons bekamen. Damit konnte demonstriert werden, dass neutralisierende Ak auch in die Eier transferiert werden (Morrison et al. 2002, Tesar et al. 2008), als eine Form der vererbaren Immunität. Trotz der Vorteile, die sich mit der Immunisierung von Hühnern verbinden, war diese Methode für längere Zeit mehr oder weniger dem Gedächtnis der „scientific community“ entglitten und erst mit der öffentlichen Diskussion von Problemen des Tierschutzes im Allgemeinen, Problemen von Tierversuchen in der Forschung und der Industrie im Besonderen (Narat 2003, Polson et al. 1980, Bartz et al. 1980), erinnerte man sich an die Möglichkeit der Gewinnung spezifischer Ak (IgY) aus dem Eidotter. Gründe, weswegen IgY eine attraktive Alternative zu Säuger-Ak darstellen, wurden durch eine wachsende Zahl von Publikationen beschrieben (z. B. Lösch et al. 1986, Carlander 2002, Hodek und Stiborova 2003, Narat 2003, Chacana et al. 2004, Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Schade et al. 2005, Michael et al. 2010, Dias da Silva and Tambourgi 2010, Russel and Burch 1959). Die Produktion und Extraktion der polyklonalen Antikörper aus dem Ei bezeichnet man als IgY-Technologie (Staak 1996). IgY-Technologie wird heutzutage in vielen analytischen/diagnostischen Systemen eingesetzt (Schade and Hlinak 1996). IgY ist sehr interessant für die passive Immunisation, aufgrund der ständig wachsenden Zahl medikamentenresistenter Mikroorganismen, Krankheiten, die nicht auf medikamentöse Therapie ansprechen, bei Individuen mit Immundefizit, welche nicht auf die herkömmliche Vakzinierung ansprechen (Casadevall et al. 2004, Kovacs-Nolan and Mine 2012). Passiv verabreichte Ak haben die Fähigkeit zur sofortigen schützenden Wirkung, z. B. im Kontext mit Bioterrorismus (Casadevall et al. 2004, Pauly et al. 2009). Einsatz der IgY in der Prophylaxe und Therapie in der Human- (Lee et al. 2002b, Kovacs-Nolan and Mine 2012) und Veterinärmedizin (Chalghoumi et al. 2009, Xu et al. 2011, Kovacs-Nolan and Mine 2012) ist ebenfalls von großem Interesse.

3.3.2 Vorzüge der IgY-Technologie

Vorteile der IgY-Technologie sind neben dem Aspekt des Tierschutzes (reduce, replace, refine; Russel and Burch 1959) solche Aspekte wie Wissenschaft und Ökonomie.

3.3.2.1 Tierschutz

Die Gewinnung der IgY ist eine non-invasive Methode, da im Gegensatz zu der notwendigen Blutung von Säugetieren für die Ak-Präparation, die IgY-Isolierung unblutig aus dem Ei erfolgt. Somit reduziert sich die Belastung bei Hühnern auf die Antigeninjektion (Schade et al. 2007).

3.3.2.2 Ökonomie

Der Pflegeaufwand für ein Huhn, im Vergleich zu Säugern, solchen wie Kaninchen, ist weniger intensiv (Carlander et al. 2000). Hühner stellen außerdem eine preiswertere und reichlichere Ak-Quelle (e.g. Polson et al. 1980, Jensenius et al. 1981, Hatta et al. 1990, Akita and Nakai 1992, Bizhanov and Vyshniauskas 2000, Pauly et al. 2011, Tan et al. 2012, for review see De Meulenaer and Huyghebaert 2001 and Schade et al. 2005) im Vergleich zu der aus dem Säugerserum dar (Gassmann et al. 1990, Carlander et al. 2000). Außerdem entspricht die Produktion der Ak im Huhn mengenmäßig der in großen Säugern, solchen wie Schaf oder Ziege. In der Tat handelt es sich bereits bei einem Huhn um eine außerordentlich große Menge Antikörper (im Durchschnitt 20g total-IgY pro Huhn pro Jahr (unsere Werte), von denen 1-10 % antigenspezifisch sind (Schade et al. 2007).

3.3.2.3 Wissenschaft

IgY-Antikörper haben biochemische Eigenschaften, durch welche sie für die orale Immuntherapie interessant sind : Das Immunsystem des Vogels unterscheidet sich von dem des Säugers (Ambrosius 1996). Die Konsequenz ist, dass Hühner-Antikörper andere Ag-Abschnitte (sog. Epitope) erkennen. Dies resultiert in Ak-Spezifitäten, die sich unter Voraussetzung einer identischen Immunisierung deutlich von Säuger stammenden Ak-Spezifitäten unterscheiden (Carlander et al. 2000, Gassmann et al. 1990).

3.3.2.3.1 Phylogenetische Distanz

Die unterschiedliche Reaktion beider Immunsysteme ist auf die phylogenetische Distanz zwischen den Wirbeltierklassen Aves und Mammalia zurückzuführen. Hühner können auf von Säugern stammende phylogenetisch hochkonservierte Proteine, z. B. Hormone oder Prione, mit Antikörperbildung reagieren. Die Immunisierung eines Säugers mit demselben Protein führt häufig zu keiner Antikörperbildung einfach deswegen, weil die Aminosäuresequenz innerhalb der Säuger derart ähnlich ist, dass dieses Protein untereinander nicht als fremd erkannt wird (Larsson and Sjöqvist, 1990). Ein prominentes Beispiel ist die mehr als 90%-ige Homologie zwischen den Säuger-Prionproteinen. Es gibt inzwischen eine Vielzahl von Beispielen, in denen die Immunisierung eines Huhnes mit einem hochkonservierten Säuger-Antigen in der Tat wesentlich erfolgversprechender ist und zu einer Produktion von Ak mit höherer Spezifität führt, als die Immunisierung eines Säugers, z. B. YLK-40 Glykoprotein (DeCeunick et al. 2001).

3.3.3 Vorzüge der gene gun Immunisierung

Um die Invasivität der Immunisierungsprozeduren noch weiter zu reduzieren und um Proteinexpression und -purifikation zu umgehen, wurde in der Arbeit von Witkowski et al. 2009 die gene gun DNA-Immunisierung der Hühner durchgeführt. Die angewendete Gold Partikel Munition wurde mit gereinigten Expressionsvektoren für das interessierende Protein bedeckt. Ökonomisch zeigt diese Methode noch größere Vorteile, da die preisintensive Expression, komplexe Reinigung und Renaturation immunogener Epitope bei Immunisierung mit Nukleinsäuren nicht mehr notwendig ist (Witkowski et al. 2009).

Ein wichtiger Vorteil in der Anwendung von Plasmiden zur Immunisierung ist deren Produktion mittels rekombinanter DNA-Technologien: der Umgang mit gefährlichen und toxischen Materialien, die im Rahmen der konventionellen Immunisierung benötigt werden, lässt sich vermeiden. Insofern kann die DNA unter niedrigen biologischen Sicherheitsbedingungen bis zum Immunisierungszeitpunkt aufbereitet werden (Niederstadt et al. 2012).

Die Anwendung der Plasmid-DNA erlaubt präzise Immunisierung mit einem für ein bestimmtes Protein kodierenden Konstrukt. Ferner besteht die Möglichkeit, kodierende

Sequenzen durch Einführen kleiner Mutationen zu optimieren und damit die Ak-Spezifität zu modulieren (Niederstadt et al. 2012).

Die Verabreichung mittels eines Mikroprojektilsystems, bei dem DNA auf Goldpartikel aufgetragen wird, fand zum ersten Mal 1987 zur Transformation von Zwiebelzellen Anwendung (Klein et al. 1992). Die Prozedur erlaubt non-invasive Immunisierung in Verbindung mit Vorteilen der DNA-Vakzinierung.

Nachfolgend werden einige Aspekte der Eiphysiologie, des Immunsystems der Hühner, einige Details über die IgY-Antikörper, deren Synthese, Struktur und Eigenschaften und auch eine Reihe von Anwendungsgebieten erläutert.

3.3.4 Eiphysiologie

Normalerweise beginnen die Hühner mit Eierlegen in einem Alter von 16 bis 26 Wochen. Das Ei ist die größte biologische Zelle, die durch Teilungen einer Zelle entsteht und aus verschiedenartigen wichtigen chemischen Substanzen zusammengesetzt ist. Ein Ei hat drei Hauptkomponenten: die Eischale (9,5%), das Eiweiß (63%) und das Eidotter (27,5%) (Kovacs-Nolan and Mine 2004a).

Die festen Bestandteile des Eidotters betragen für gewöhnlich 50%, können aber in Abhängigkeit von dem Hühneralter und der Eigröße variieren. Die Hauptkomponenten der festen Substanz im Eidotter sind Proteine und Lipide, die vorwiegend in der Lipoproteinform präsentiert sind (Kovacs-Nolan and Mine 2004a). Das Eidotter kann durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation in sedimentierte Granula und klaren flüssigen Überstand, genannt Plasma, aufgetrennt werden. Die Granula enthalten 70% α - und β -Lipoproteine, 60% Phosvitin und 12% LDL (Burley et Cook 1961). Das Plasma ist aufgeteilt in LDL-Fraktion (33%) und wasserlösliche Fraktion (WSF) (5%), die ihrerseits Livetine enthält. Livetine sind lipidfreie globulare Proteine, inklusive γ -Livetin, auch als IgY bezeichnet (Li-Chan et al. 1995, Kovacs-Nolan et Mine 2004a).

3.3.5 Aviäres Immunsystem (Besonderheiten der Leihimmunität)

3.3.5.1 Aviäres Immunsystem

Die Bestandteile des Hühnerimmunsystems sind: Bursa Fabricii, Knochenmark, Milz, Thymus, Hardersche Drüse, Lymphknoten, zirkulierende Lymphozyten und diverses lymphatisches Gewebe. Der Thymus, das primäre lymphatische Organ, ist für die T-

Zell-Differenzierung zuständig. Die Antikörper produzierenden B-Zellen werden in der Bursa Fabricii gebildet (Sharma 1997, Carlander et al. 1999). Proliferation der Plasmazellen und der B-Gedächtniszellen erfolgt in der Milz (Carlander et al. 1999).

Die Antikörpervielfalt der Wirbeltiere wird erreicht durch immer wieder neue Kombination derselben Genabschnitte auf den Genen für die leichten und schweren Ketten der Antikörper. Diese Vielfalt wird durch zwei Mechanismen gewährleistet:

-durch somatisches Gen-Rearrangement während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark. Die leichten und die schweren Ketten der Immunglobuline werden durch verschiedene sich wiederholende Exons kodiert: variable Segmente (**V**), **D-Segmente** (D=diversity), joining-Segmente (**J**) u.a. Während der Differenzierung der B-Zellen im Knochenmark findet eine Rekombination dieser Exons statt.

-durch somatische Rekombination und Punktmutationen in den variablen Bereichen der Immunglobulin-Gene. (Dias da Silva and Tambourgi 2010, Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Königshoff 2004, Reynaud et al. 1985, Parvari et al. 1988).

Es gibt einen signifikanten Unterschied in der B-Zellentwicklung und in der Entstehung der Antikörpervielfalt zwischen Säugern und Vögeln. Bei den Vögeln sind die Rekombinationsvorgänge eingeschränkt. Das Rearrangement der Immunglobulin-Gene ist bei den Hühnern kein fortlaufender Prozess, sondern ist ein einmaliges Ereignis während der frühen Embryogenese. Demzufolge ist die Zahl der für die B-Zell-Repertoireentstehung zuständigen Gen-Rearrangements auf die B-Lymphozytenvorläufer in der Bursa Fabricii beschränkt (Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Reynaud et al., 1989, 1991). Die Hühnerimmunglobuline bestehen aus schweren (H-Ketten) und leichten Ketten (L-Ketten), die durch getrennt liegende Genloci kodiert werden. Es existiert jeweils nur ein V- und ein J-Segment für die L-Kette. Das gleiche trifft auch für die H-Kette zu. Zusätzlich enthält die schwere Kette 15 D-Segmente (Sharma, 1997). Demzufolge sorgen nur die D-Segmente für die Rekombination (Dias da Silva and Tambourgi 2010, Reynaud et al., 1985, 1987, 1989). Die Antikörpervielfalt bei den Hühnern wird durch den Gebrauch von Pseudogenen erzielt, die in den V-Bereich integriert werden (da Silva and Tambourgi 2010, Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Reynaud et al., 1987, 1989; Sharma, 1997).

Auf diese Art und Weise sind die Hühner in der Lage, trotz der extrem limitierten Zahl von Immunglobulin-Genen, spezifische Antikörper und spezifische Immunantwort gegen mehrere Millionen verschiedener Antigene zu bilden (Sharma, 1997).

3.3.5.2 Aviäre Immunglobuline (Phylogenese) und Besonderheiten der Leihimmunität

IgY ist das funktionelle Äquivalent des Säuger-IgG. Es existieren drei 3 Klassen der Immunglobuline bei den Hühnern: IgY, IgA, IgM (Leslie and Martin 1973).

Obwohl IgM der einzige universal verbreitete Ak ist und aus diesem Grunde auch als Vorgänger aller Ig-Klassen betrachtet wird, gibt es gegenwärtig Hinweise darauf, dass IgY direkter Vorläufer der IgG und IgE sein könnte (Warr et al. 1995).

Das Immunsystem eines Neugeborenen besitzt noch nicht seine volle Funktionsfähigkeit. Der immunologische Schutz der Nachkommen wird bei Säugern durch Penetration der Plazentarschranke bzw. durch die Kolostralmilch gewährleistet (Chucru et al. 2010). Dieser Schutz besteht bis zum Erreichen der vollständigen Funktionsfähigkeit des Immunsystems und wird als „Leihimmunität“ bezeichnet. Die Wirbelklasse der Aves erreicht einen vergleichbaren Effekt durch aktiven Transport spezifischer Ak in das Eidotter. Dieser Transport wird über einen Rezeptor realisiert (Homologie des FcRY Rezeptors mit dem Säuger-Phospholipase A2 Rezeptor, West et al. 2004, Lösch 1996). Für den Transport ist eine AS-Erkennungssequenz (His-Glu-Ala-Leu) erforderlich (Morrison et al. 2002, Mohammed et al. 1998, Tesar et al. 2008). Wichtig ist, dass nur ein Immunglobulin-Isotyp, nämlich IgY durch einen aktiven Transport in das Eidotter sezerniert wird, andere Isotypen (IgA, IgM) werden in das Eiklar sezerniert (Rose et al. 1974).

3.3.6 IgY, seine Struktur und Unterschiede zu IgG. Physikochemische Eigenschaften.

Trotz der funktionellen Ähnlichkeit zwischen IgG und IgY, sind einige grundlegende Unterschiede in deren Struktur zu verzeichnen (Warr 1995) (Abb.3). Sowohl IgY als auch IgG bestehen aus zwei schweren (H-Ketten) und zwei leichten (L-Ketten) Ketten. Die Molekularmasse des IgY ist mit 180 kDa höher als die des IgG (159 kDa). Im Vergleich zu der H-Kette des IgG (50 kDa) besitzt die schwere Kette des IgY ein höheres Molekulargewicht (68 kDa). Die schwere Kette von IgG enthält vier Domänen:

eine variable Domäne (VH) und drei konstante Domänen (C γ 1-C γ 3). Der bewegliche „Knick“, der das Fab- und Fc-Fragment verbindet wird als hinge-Region bezeichnet und verleiht dem Fab-Fragment eine gewisse Beweglichkeit. IgY unterscheidet sich durch eine zusätzliche konstante Domäne (Cv1-Cv4) und besitzt keine hinge-Region. Der Sequenzvergleich zwischen IgG und IgY zeigt eine große Ähnlichkeit zwischen den C γ 2-, C γ 3-Domänen von IgG und den Cv3- und Cv4-Domänen von IgY. Das Äquivalent zu Cv2 ist in IgG nicht enthalten und wurde durch die hinge-Region ersetzt (Warr et al. 1995, Kovacs-Nolan and Mine 2004a). Der Anteil an β -Faltblattstruktur in den konstanten Domänen ist in IgY niedriger als in IgG und ebenso ist IgY zwischen den Cv1 und Cv2 –Domänen, korrespondierend zu der hinge-Region des IgG, durch weniger Flexibilität gekennzeichnet (Shimizu et al. 1992, Kovacs-Nolan and Mine 2004a). Die IgY-Konformation ist ungeordneter und damit weniger stabil als die des IgG (Shimizu et al., 1992).

Die Stabilität des IgY unter Verarbeitung und in physiologischen Bedingungen ist wichtig für die Anwendung in der Immuntherapie. Die Aktivität des IgY schien mit Erhöhung der Temperatur (Erhitzen auf 70°C für 15 min) zu sinken, wobei die Aktivität von Kaninchen-IgG sich erst ab 75-80°C oder höher reduzierte (Hatta et al. 1993, Shimizu et al. 1988, 1992, 1993). Allerdings verbesserten Kohlenhydrate die Resistenz des IgY gegen Hitze (Cook & Trott 2010; Shimizu et al. 1994). Über dem pH von 12 und unter dem pH von 3,5 sinkt die IgY-Aktivität (Hatta et al. 1993, Lee et al. 2002a, Shimizu et al. 1988). IgY verliert fast vollständig seine Aktivität bei einem pH von 3 aufgrund von schnellen Konformationsänderungen (Shimizu et al., 1988, 1992, 1993). Dennoch kann die Stabilität durch Stabilisatoren wie Zucker, komplexe Kohlenhydrate und Polyole erhöht werden (Chang et al. 2000, Lee et al. 2002a, Shimizu et al. 1994). Der Aktivitätsverlust des Kaninchen-IgG tritt erst bei pH 2 oder sogar niedriger ein (Shimizu et al. 1992).

IgY zeigt eine gute Resistenz gegen Trypsin und Chymotrypsin und ist sehr anfällig für Pepsin (Shimizu et al. 1988). Um der IgY-Inaktivierung vorzubeugen wurde eine große Zahl von Einkapselungstechniken getestet. Die Makroenkapsulierung in Gelatinekapseln wies eine signifikante Erhöhung der Ak-Stabilität auf (Akita & Nakai 2000). Kürzlich hat Xun et al. (2010) die Anwendung des zytoprotektiven Agents Sucralfat beschrieben und fand, dass es dosisabhängig die IgY-Resistenz gegen niedrigen pH und Pepsin-Behandlung erhöhen kann.

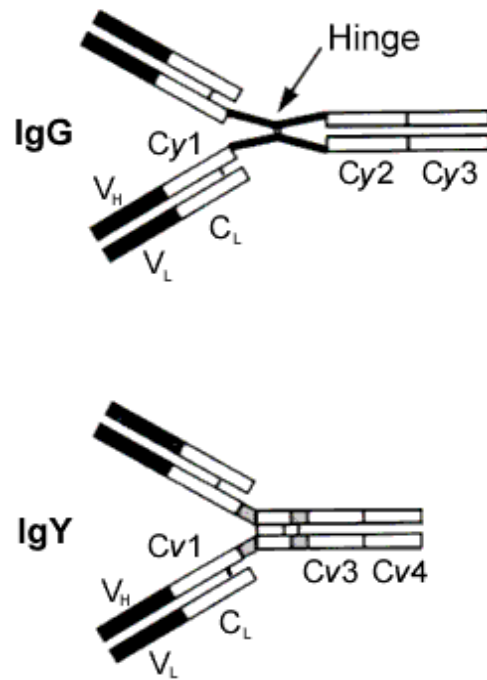


Abb 3. Molekulare Struktur des Hühner-IgY und des Kanninchen-IgG. IgG und IgY besitzen je 2 identische leichte Ketten (L) und je 2 unterschiedliche schwere Ketten (H). Die H-Kette des IgG besteht aus einer variablen (V_H) und drei konstanten (Cy1-Cy3) Domänen. Die Hinge Region verbindet Fab- und Fc-Fragment des IgG. IgY verfügt über eine zusätzliche konstante Domäne (Cv1-Cv4). Dem IgY fehlt die Hinge Region, was die Ursache seiner geringeren Flexibilität darstellt (Adaptiert von Warr et al. 1995).

3.3.7 Beispiele der Anwendung von IgY in der Veterinärmedizin

3.3.7.1 ETEC

IgY wurde gegen eine Vielzahl enterischer Pathogene getestet. Es konnte gezeigt werden, dass gegen Schweine-ETEC produzierte IgY eine Anheftung der Bakterien *in vitro* an die Epithelzellen (Yokoyama et al. 1992) und die Schleimhaut verhinderten (Jin et al. 1998). Bei der oralen IgY-Gabe schützten IgY-Ak gegen die Infektion der Schweine mit ETEC (Yokoyama et al. 1992), besonders die IgY encapsuliert in Form von Mikropartikeln (Li et al. 2009).

3.3.7.2 BRV

Anti-BRV-IgY enthaltendes Eidotter gewährleistet zu 80% den Schutz gegen die BRV-Diarrhö bei Kälbern, im Vergleich zum Eidotter nicht immunisierter Hühner. Somit stellt

es eine vielversprechende Strategie zur Senkung der Kälber-Mortalität dar (Vega et al. 2011).

3.3.8 Beispiele der Anwendung von IgY in der Humanmedizin

Es konnte gezeigt werden, dass IgY effektiv gegen eine Vielzahl humanpathogener Keime und Erkrankungen ist, sowohl in vitro und auch in Tierstudien unter Laborbedingungen und klinischen Studien (Kovacs-Nolan and Mine 2012).

3.3.8.1 Pseudomonas aeruginosa

Eine von den erfolgreichsten IgY-Einsatzgebieten ist die Prävention der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) bei Patienten mit zystischer Fibrose (CF) (Mukoviszidose). In den laufenden Studien konnte die Kolonisation mit PA mithilfe von anti-PA IgY enthaltender Mundspülung signifikant reduziert werden, womit der Bedarf an Antibiotika gesenkt werden konnte (Carlander et al. 2000, Kollberg et al. 2003, Nilsson et al. 2007, 2008). Diese Studien haben gezeigt, dass spezifisches IgY effektiv und ohne Nebenwirkungen für langwierige Immuntherapie eingesetzt werden kann (Nilsson et al. 2007).

3.3.8.2 Helicobacter pylori, kommerziell erhältliche IgY

Eine weitere vielversprechende klinische Applikation der IgY betrifft die Prävention von *Helicobacter pylori* (HP)-Infektionen. In vitro IgY gegen HP verringerte die bakterielle Adhäsion, bakterielles Wachstum und deren Ureaseaktivität und war imstande, die gastrale Schleimhautbeschädigung und Entzündung in einem Tiermodell zu reduzieren (Shin et al. 2002). Da Ak gegen HP mit der menschlichen Flora reagieren könnten (Shin et al. 2003) wurde die Produktion und Effektivität des IgY gegen immundominante HP-Proteine und Peptide untersucht, z.B. gegen Urease (Nomura et al. 2005, Shin et al. 2004). Trinkjoghurt mit 1% antiurease-IgY wurde kommerziell produziert und an freiwilligen HP-positiven Personen getestet (Horie et al. 2004). 4 Wochen später war der Harnstoff im Atemtest verringert und die Antigen-Detektion im Stuhl ebenfalls herabgesetzt als Indiz auf HP-Infektionssuppression.

3.3.8.3 Antivenom

Beschrieben ist auch die IgY-Wirkung gegen eine Zahl von verschiedenen Giften (Schlangen, Spinnen, Scorpions) (Araujo et al. 2010, Liu et al. 2010, Meenatchisundaram et al. 2008a&b, Paul et al. 2007), inklusive der Produktion eines Gegengifts gegen afrikanische Schlangen zur Anwendung gegen Bisse mehrerer unterschiedlicher Schlangen (de Almeida et al. 2008). IgY zeigte eine höhere Bioaktivität als Gegengift im Vergleich zu von Pferden erhaltenen Ak und rief weniger Nebenwirkungen hervor, solche wie Serumkrankheit und anaphylaktischer Schock, welche durch Gabe von Säugerproteinen verursacht werden kann (de Almeida et al. 2008, Thalley & Carroll 1990).

3.3.8.4 Andere Einsatzgebiete

Es gibt viele weitere Einsatzgebiete des IgY. Beispiele:

Bei Streptococcus mutans reduzierte IgY in einer Mundspülung den S.mutans-Spiegel (Hatta et al. 1997), IgY gegen S. mutans-Glykosyltransferase reduzierte die Inzidenz und die Schwere von Karies in Ratten (Krüger et al. 2004). IgY gegen TNF- α senkte die Entzündung in experimenteller Colitis in Ratten (Worledge et al. 2000). IgY gegen Influenza schützte Mäuse vor einer letalen Infektion mit H5N1, H5N2 und H1N1 (Nguyen et al. 2010). LeClaire et al. 2002 haben IgY gegen das hochtoxische Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) produziert. SEB wird als potentielle biologische Waffe betrachtet. Schutz gegen SEB konnte in Mäusen und Rhesus-Affen gegen eine letale SEB-Dosis erreicht werden.

3.3.9 Beispiele der IgY-Anwendung in der Aquakultur

IgY beugt E. tarda (Edwardsiella tarda)-induzierter Mortalität der Aale vor (Hatta et al. 1994). Dieser Antikörper ist im kommerziellen Gebrauch (Hatta et al. 2008).

4 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Generierung von spezifischen IgY-Antikörpern, die in der Lage sind, die funktionale Aktivität der BRV (bovine Rotaviren) zu blockieren und somit eine neutralisierende Wirkung darauf zu zeigen. Die virale Neutralisation ist ein Prozess, in dem eine Verbindung aus Virus und Antikörper zustande kommt, was zu einem Infektiositätsverlust führt (Dimmock 1993). Dieser Vorgang korreliert im Wesentlichen, jedoch nicht ausschließlich mit Infektionsschutz in vivo. Neutralisation der Rotavirus-Infektiosität scheint ein bedeutender immunologischer Schutzmechanismus bei RV-Infektion zu sein (Ludert et al. 2002). Rotaviren aus der Familie Reoviridae sind icosaedrische Viren mit einem Genom, bestehend aus 11 Segmenten doppelsträngiger RNA. Ein Virion besitzt 6 Strukturproteine, die sich in 3 Schichten anordnen. Das innere Capsid besteht aus dem Virusprotein 6 (VP6) das äußere aus VP7 und VP4 (Spikeproteinen) (Angel et al. 2007, Kovacs-Nolan et al. 2003). Alle diese Proteine sind Zielstrukturen der humoralen Immunantwort (Hoshino et al. 1985). RV sind die häufigsten Erreger der Kälberdiarrhö und sind für hohe Morbiditäts- und Mortalitätszahlen der Kälber zuständig (Bendali et al. 1999a). Kälber sind in den ersten 8 Lebenswochen für die BRV-Diarrhö anfällig und ab der 3. Woche lässt die Anfälligkeit mit steigendem Alter nach (Dhama et al. 2009). Es gibt keine spezifische Behandlung der Kälber-Diarrhö. Den betroffenen Tieren werden symptomatisch Flüssigkeit und Elektrolyte substituiert und sie erhalten Antibiotika zur Prophylaxe bakterieller Superinfektion. Derzeitige Strategie der Kontrolle über die Krankheit ist die Vakzinierung der Muttertiere, um den Nachwuchs durch den Transfer von passiven Ak zu schützen (Bellinzoni et al. 1990, Saif et al. 1987), was zur einer Milderung der Symptome führt, jedoch die Infektion nicht verhindert (Bendali et al. 1999a, Parreño et al. 2010). Es wurde beobachtet, dass trotz mäßig hoher, im Serum der Kälber zirkulierender Ak aus der Kolostralmilch, die Kälber sehr anfällig für RV-Diarrhö sind (Kohara und Tsunemitsu 2000).

Orale Gabe spezifischer Hühner-Ak (IgY) wurde erfolgreich im Tiermodell gegen eine Mehrzahl enterischer Pathogene eingesetzt (e.g. Hirai 2010, Kovacs-Nolan and Mine 2004a, Nilsson et al. 2007).

In Berücksichtigungen dieser Informationen stellt die Produktion virusspezifischer Hühner-Ak (IgY) eine vielversprechende, ökonomisch günstige Behandlungsstrategie dar (Kovacs-Nolan and Mine 2012). Die IgY-Technologie bietet mehrere Vorteile im

Vergleich zur Ak-Produktion in Säugern. IgY ist ein IgG-ähnliches Protein, das als einziger Ig-Isootyp im Eidotter vorhanden ist (Rose et al. 1974, Mohammed et al. 1998, Morrison et al. 2002, Schade 2007 a, Li-Chan et al. 1995, Kovacs-Nolan et al. 2012) und mit einer einfachen Methode, z. B. der sog. PEG (Polyethylen Glykol) Präzipitation (Pauly et al. 2011) unblutig aus dem Ei präpariert werden kann, was weniger Stress für die Hühner bedeutet als die Extraktion der IgG aus dem Blut der Säuger (Schade et al. 2007). Ein Huhn produziert mehr Ak als ein Kaninchen bei weniger aufwändigen und preiswerteren Haltungsbedingungen (Carlander et al. 2000). Aufgrund der phylogenetischen Distanz der Klassen Mammalia und Aves zeigen IgY einen weiteren Vorteil, und zwar u. a. beim Einsatz zur Detektion von phylogenetisch hochkonservierten Säuger-Ag (Larsson and Sjökvist 1990, De Ceunick et al. 2001). IgY besitzen keine Kreuzreaktivität mit Säuger-Komplementsystem, Rheumafaktoren (Larsson and Sjökvist 1990), HAMA (Carlander et al. 2000) oder humanen Fc-Rezeptoren (Larsson et al. 1993). Mehrere Studien bestätigen, dass der Einsatz von IgY zur Prävention und Behandlung von vielen bakteriellen und viralen Erkrankungen erfolgreich ist (Carlander et al. 2000).

Vega et al. 2011 publizierten, dass orale Gabe von rohem Ei mit RV-spezifischen IgY als Milchsupplement sehr effektiv gegen die RV-Diarrhö ist. Derartige Ak haben einen starken protektiven Effekt in den ersten 14 Lebenstagen der Kälber. Außerdem findet eine positive Modulation der Immunantwort der neonatalen Kälber statt, einschließlich einer höheren Zahl der ASC (Ak sekretierenden Zellen) und eine bedeutende Isotyp-Vielfalt in der Darmmukosa. Der immunmodulatorische IgY-Effekt kann als ein weiterer Vorteil der IgY-Technologie interpretiert werden.

Eine der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war, ob der Einsatz des Gesamtvirus oder nur bestimmter Proteine, die für Erkennung von Targetstrukturen bedeutsam sind zu neutralisierenden Antikörpern führen. Die Immunisierung der Hühner erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen, zum einen die klassische Immunisierung mit Vollvirus und zum anderen eine DNA-Immunisierung. Dank der Fortschritte der ballistischen Technologien "gene gun" erlebt die Plasmidvektor-Immunisierung eine schnelle Entwicklung (Lian et al. 2011). Bis jetzt existieren nur wenige Studien zu diesem Thema (Witkowski et al. 2009, Ludert et al. 2002). In den meisten dieser Studien wurde jedoch die DNA-Immunisierung i.m. (intramuskulär) durchgeführt, mit einer starken Ak-Antwort auf HP-Urease (Kazimierczuk et al. 2005), und in einer schwachen Immunantwort auf

Interferon –Gamma (Nikbath Brujeni et al. 2011). Witkowski et al. 2009 demonstrierten hohe Titer spezifischer Ak auf Pockenproteine mittels gene gun Immunisierung.

Die Immunisierung mittels gene gun mit Plasmiden, kodierend für die Virusproteine VP4, VP6 und VP7 erfolgte mit den jeweiligen Plasmiden einzeln oder in Kombination.

Durch die Immunisierung mit einem VP4/VP6/VP7 Mix sollte untersucht werden, ob durch die Kombination evtl. neutralisierende Eigenschaften verstärkt werden.

Die bis heute in der Literatur beschriebenen effizientesten rotavirus-neutralisierende Ak richten sich alle gegen VP7. In Dormitzers (2000) Hypothese binden neutralisierende Ak an VP7 am Virion und inhibieren seine Dacapsidierung.

Klärung des Mechanismus der RV-Neutralisation ist ein wichtiger Aspekt zum Verständnis der Grundlagen der RV-Infektion (Vega et al. 2011).

5 Tiere, Material, Methoden

5.1 Hühnerhaltung

Allgemeine Haltungsbedingungen:

Die Legehennen (Lohmann braun und Lohmann weiß, Spreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH, Bestensee, Deutschland) wurden in klimatisierten Laboratorien mit künstlicher Beleuchtung (12h Tag, 12h Nacht) gehalten und bekamen Nahrung (ssniff Legehühner-Zucht 1 and 2; ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Germany) und Wasser ad libitum. Mit ca. 23-25 Wochen haben die Hühner mit Eierlegen begonnen. Die Eier wurden täglich gesammelt, beschriftet, und bei 4°C gelagert bis zum Zeitpunkt der Aufbereitung/ Präparation. Die Haltung fand im Rahmen eines Tierversuchsantrages H0069/03 statt.

Die mit Vollvirus immunisierten Legehennen (M1 Gefiederfarbe (GF): weiß und M2 GF: braun) wurden in Spezialkäfigen der Firma EBECO (Deutschland) mit einer Grundfläche von 0,8 m² zuzüglich von 2 x 0,19 m² (Legenester) unter S2 Bedingungen im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), (Berlin, Deutschland) gehalten (Abb. 4)



Abb. 4 Ansicht einer Käfigeinheit (internes Foto).

Die mit Gene Gun immunisierten Hühner: H88 GF: weiß und H89 GF: braun, Antigen VP4; H91 GF: braun und H92 GF: weiß, Antigen VP6; H93 GF: braun und H95 GF braun, Antigen VP7 wurden in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin Charité-Universitätsmedizin Berlin gehalten. Diese Hühner befanden sich in Bodenhaltung (Abb. 5)

Die Triple-immunisierten Hühner H 288 und H 289 (VP4/6/7 Mix) waren in Käfighaltung in der Ovalehn GmbH (Damsdorf, Deutschland). Die Haltung fand nach den Richtlinien eines Tierversuchsantrages Brandenburg (No.39.1.700.7) statt.



Abb. 5 Hühner in Bodenhaltung (internes Foto).

5.2 Antikörperproduktion

5.2.1 Antigenherstellung

Das virulente BRV Präparat wurde von Herr Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp, bereitgestellt, damals Leiter des Instituts für Infektionsmedizin am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) (Labor für Molekular- und Immunbiologie der Retro- und Rotaviren, Greifswald, Deutschland). Das bovine Rotavirus B223 (G10P[11]) wurde in Zellkultur auf MA104 Zellen vermehrt und über einen Sucrose-Gradienten gereinigt. Dieses Material lag in einer Konzentration von 25µg/100µl vor.

Für die Produktion der Immunisierungsmatrizen zur Anwendung in der DNA-Immunisierung wurden Expressionsvektoren, die komplette für die BRV Gene (VP4, VP6 und VP7) kodierende Sequenzen enthielten in die pCMV-Plasmide kloniert. Dies geschah unter der Kontrolle von CMV-Promotor und wurde für die Expression in Säugerzellkulturen getestet. Die Amplifikation der Plasmide erfolgte durch Transformation von E.coli und Purifikation durch expandierte Wachstumskulturen von ca. 250 ml durch Plasmidpurifikation via Endofree Maxikit (Qiagen, Stockach, Deutschland).

5.2.2 Immunisierung

5.2.2.1 „Klassische Immunisierung“

Für die „klassische“ Immunisierung bedienten wir uns eines Gemisches aus 100µl Originallösung von einem konzentrierten Virusisolat, 200µl PBS, 300µl Freund's Complete (erste Immunisierung)/Incomplete Adjuvans (Boost) (FCA/FIA).

Die Antigeninjektion erfolgte in den Musculus pectoralis (Abb. 6) (Volumen 0,5-1,0ml) unter Verwendung von FCA, gefolgt vom 1. Boost nach ungefähr 4 Wochen und weiteren drei Boosts je in einem Zeitabstand von ca. 4 Wochen (unter Verwendung von FIA), basierend auf einer Beobachtung, dass die memory cells nicht früher als 3 Wochen post Immunisierung nachweisbar sind (Pei and Collison 2005). Insgesamt wurde 5 Mal immunisiert.



Abb. 6 „Klassische“ Immunisierung. „Klassische“ Immunisierung mit Vollvirus mit Antigeninjektion i.m. in den M.pectoralis (internes Foto).

5.2.2.2 Gene gun Immunisierung



Abb. 7 Gene gun. Gene gun Immunisierung durch Aufsetzen des Distanzrings auf ein federfreies Areal mit Applikation des Antigens (Plasmide auf Goldpartikeln) intracutan (internes Foto).

Bei der Gene Gun Immunisierung (Abb. 7) wird das Antigen in die Haut der Hühner appliziert. Hierfür werden Goldpartikel, auf denen das Plasmid adsorbiert ist, unter

Druck (300 psi) in die Haut „geschossen“. Hierzu setzt man den an der gene gun befestigten Distanzring auf ein federfreies Brustareal, um die Interaktion zwischen Goldpartikeln und Federn zu vermeiden. Es werden insgesamt vier „Schüsse“ gesetzt, um eine ausreichende Antigenkonzentration zu erreichen, je zwei pro Brustseite (insgesamt 4 µg DNA pro Plasmidvektor). Um die Belastung der Tiere möglichst gering zu halten, wurde die Dauer des gesamten Immunisierungsprozess auf max. 3 Minuten begrenzt. Die gene gun Immunisierung erfolgte in einem separaten Behandlungsraum um den Stress der Nachbartiere durch die Schussgeräusche zu minimieren.

Die Immunisierung und die Boosterungen haben in einem zeitlichen Abstand von ca. vier Wochen stattgefunden, von denen es insgesamt 5 bei den Hühnern 88-95 und insgesamt 9 bei den Hühnern 288 und 289 gab.

5.2.3 IgY-Reinigung mittels PEG-Präzipitation

Zur IgY-Gewinnung aus dem Eigelb wurde die PEG-Präzipitation eingesetzt (modifiziert nach Polson, 1980, siehe auch Pauly et al. 2011). Diese Methode umfasst mehrere Schritte (alles unter Benutzung von Latexhandschuhen):

Abschnitt 1: IgY-Extraktion mittels PEG-Präzipitation (Abb. 8):

1. Der erste Abschnitt beinhaltet die Entfernung von Lipiden. Dazu wurden die Eier vorsichtig aufgeschlagen und auf einen Löffel (Yolk spoon, Falkemann (household effects), Germany) zum Abtrennen des Eiweißes gegeben.
2. Vom Löffel wurde das Eidotter auf ein Filterpapier übertragen um die Reste des Eiweißes zu beseitigen. Anschließend wurde das Eidotter mit einer Pipettenspitze aufgestochen und das Eigelb kam in ein 50ml Falcon Tube (Falcon tubes Blue Max™, 50 ml Polypropylene Conical Tube, Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes NY, USA).
3. Anschließend wurde das Eidottervolumen bestimmt und dann das doppelte Volumen an PBS (phosphate-buffered saline, Premixed PBS10x, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) sowie 3,5% des Gesamtvolumens an PEG 6000 (PEG 6000, Art.-Nr. 0158.2, Rotipuran® Ph. Eur., Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) dazugegeben. Die Dotter-Puffer-Mischung wurde mittels eines Vortex-Gerätes (Vibrofix VF2, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Germany) homogenisiert und kam für weitere 10 Minuten auf einen Roller (Roller mixer Sigma SRT2, Stuart, Staffordshire, UK).

1 part of egg yolk + 2 parts of PBS (pH 7.5) + pulverized PEG 6000, 3.5 % (w/v) stir well, incubate for 20 min at RT, centrifuge for 10 min (14 000 x g, RT)

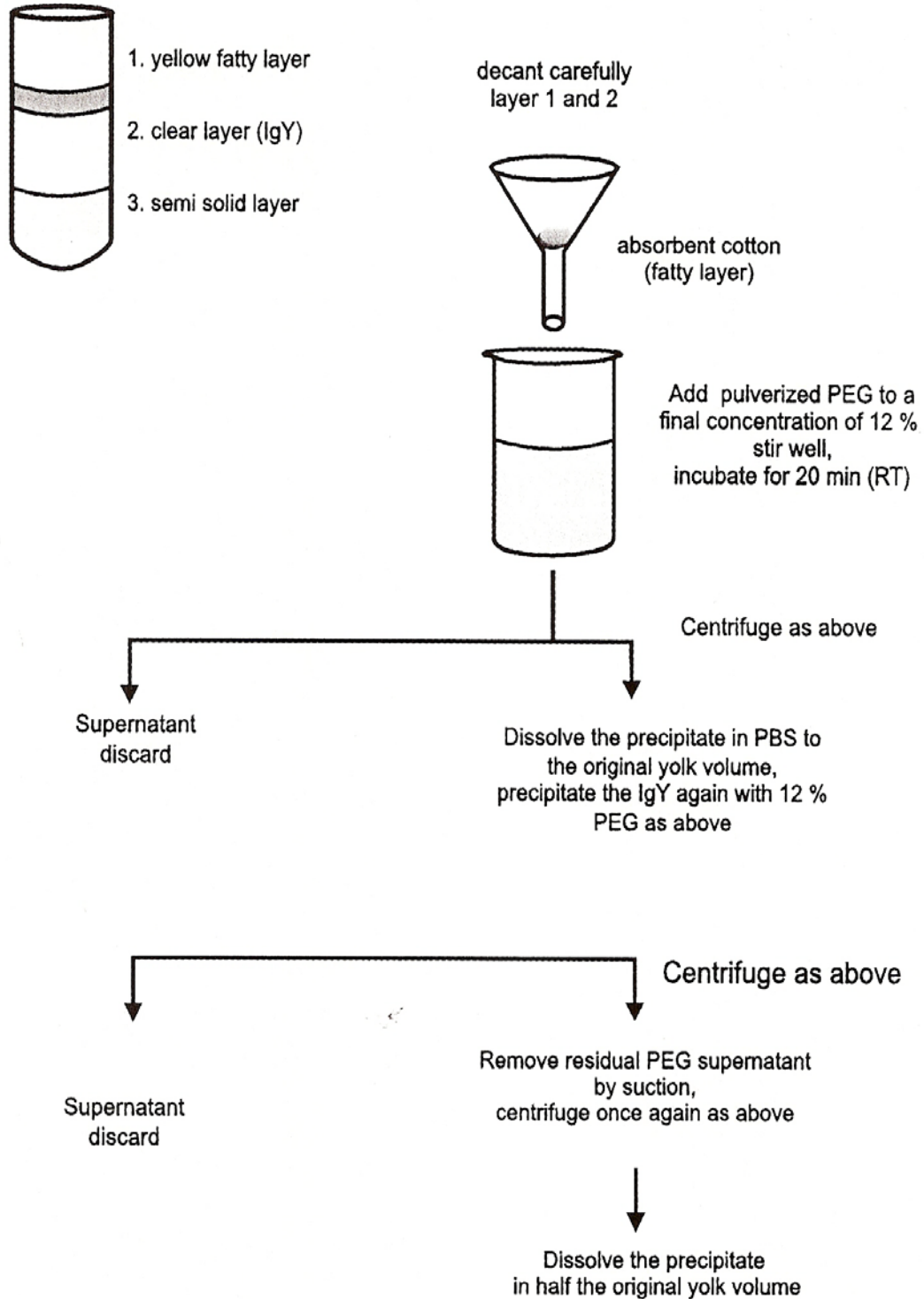


Abb. 8 Schematische Darstellung der IgY-Reinigung mittels PEG-Präzipitation entsprechend der originalen Beschreibung von Polson et al. 1980.

4. Dann wurde die Falcon Tube 15min bei 4°C zentrifugiert (10.000U entsprechend 17105xg, Heraeus Multifuge 3 SR+, Thermo Scientific, Langenselbold, Germany). Der Überstand wurde durch einen Trichter mit Filterpapier (Folded Filter MN 615 ¼, 150 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany Heraeus) in eine neue Tube gefiltert.
5. Im zweiten Abschnitt wurden 8,5% vom neuen Gesamtvolumen berechnet und diese Menge an PEG 6000 wurde in Gramm abgewogen und dem Überstand beigemischt. Es folgte ein erneutes Homogenisieren wie in Schritt 1 (Vortex, Roller) für weitere 10 Minuten.
6. Die Falcon Tube wurde bei gleichen Einstellungen diesmal jedoch 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt.
7. Ein Pellet blieb in der Tube zurück. Das Pellet wurde mittels eines Glasstabes und Vortex erst in 1ml PBS gelöst und dann auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. 12% vom Gesamtvolumen wurden berechnet und diese Menge an PEG 6000 in Gramm abgewogen und dazugegeben. Anschließend wiederholte sich der Homogenisierungsschritt wie unter Punkt 3 beschrieben und es erfolgte eine letzte Zentrifugierung bei gleichen Einstellungen für weitere 20 Minuten.
8. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit einem Glasstab in 800µl PBS vorsichtig auf dem Vortex gelöst. Nach dem Auflösen der Luftblasen kam der Extrakt mittels einer Pipette in eine Mikro-Dialysierkapsel (Micro-Dialyse-Capsule QuixSep^R 5ml, Art. 0671.1 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Dies ist ein wiederverwendbares Dialysesystem. Anschließend wurde die Falcon Tube mit 400µl PBS nachgespült und dieses Volumen auf dasselbe Dialysegefäß gegeben. Die Dialysekapsel wurde mit einem kleinen Stück Dialyseschlauch (Dialyse Bag Visking, Type 27/32, cut off -14 kD, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) bedeckt, der vorher mit desinfizierter Pinzette und Schere abgetrennt und mit Aqua dest ab gespült worden ist. Die Fixierung der Dialysemembran erfolgte mit einem dicht schließenden Ring.
9. Anschließend wurde der IgY Extrakt in 1600ml einer 0,1% NaCl-Lösung über Nacht auf einem Magnetrührer (Magnetic stirrer, Variomag Mono, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Germany) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde die NaCl-Lösung durch PBS ersetzt und es erfolgte eine weitere Dialyse für 3 Stunden.

10. Nach der Dialyse wurde die Dialysemembran aufgestochen und der IgY-Extrakt in ein 2ml großes Eppendorfgefäß überführt. Das endgültige Volumen beträgt im Durchschnitt 2ml.
11. Die Proteinmenge (mg/ml) der Probe (in einer 1:50 Verdünnung mit PBS) kann bei 280nm photometrisch gemessen und gemäß dem Lambert-Beer Gesetz mit einem Extinktionskoeffizienten von 1,33 für IgY berechnet werden.
Es erwies sich als ratsam die Proben bei -20° C aufzubewahren und nicht bei -70° C einzufrieren, da bei dieser Temperatur erfahrungsgemäß ein Aktivitätsverlust eintritt (Schade et al. 2001). Bei häufiger Verwendung der Proben empfiehlt es sich, die Proben bei +4° C zu lagern, da häufiges Einfrieren und Auftauen zur chemischen Veränderung der Ak im Sinne von Denaturierung führt.
12. Die qualitative Analyse der Proben kann mit SDS-PAGE durchgeführt werden.

Anhang:

1. 20 Dialysemembranen wurden in 30cm-lange Segmente geschnitten und kamen in ein Becherglas.
2. 1,750 ml einer 5 mM EDTA-Lösung wurden hinzugegeben.
3. Die Lösung wurde aufgekocht für 5 min. Die Lösung wurde abgegossen und die Membranen wurden 3 Mal mit destilliertem Wasser gewaschen.
4. Der Schritt mit Zugabe von 1,750 l EDTA-Lsg und 5-minütiges Aufkochen mit anschließendem Auswaschen mit aqua destillata wurde wiederholt.
5. Schließlich wurden die Membranen im dest. Wasser für 10 min gekocht und anschließend bei 4° C aufbewahrt. Die zur Verwendung entnommenen Membranen wurden mit sterilisierten Scheren behandelt.

5.3 PAGE

Die Durchführung der PAGE erfolgte in einer Mini-Protean Tetra Cell- Apparatur (Bio-Rad, Germany).

1. Gießstand zusammenbauen, mit entsprechenden Größen der Glasplatten.
2. Bevor das Trenngel in die Kammer gegossen wird, erst den Gießstand mit EtOH auf Dichtigkeit überprüfen.
3. Das Gel gießen (Resolving: Trenngel, Stacking: Sammelgel)

Volumina der einzelnen Komponenten zusammenpipettieren. Trenngel 12%: Auftauen des tiefgefrorenen 10% APS (Bio-Rad, Germany). In ein Erlenmeyer kommt 6,8 ml H₂O bidest.; 5 ml 1,5M Tris pH 8,8; 200 µl 10% SDS; 8 ml Rotiphirese Gel/Acrylamid Gel 30 % (Bio-Rad, Germany); 100 µl 10% APS (0,05g + 500 µl Wasser); 10 µl TEMED (Bio-Rad, Germany). Gut durchmischen und das Gel gießen. Überschichten mit Buthanol damit die Geloberfläche glatt ist, nach 10 min warten ist das Gel polymerisiert.

Parallel Vorbereitung des 5% Sammelgels: 5,7 ml H₂O bidest.; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 100µl 10 % SDS; 1,7 ml Acrylamid Gel 30 %; 75 µl 10% APS; 10µl TEMED.

In dem Trenngel wird Buthanol mit Filterpapier weggesaugt, ohne die Geloberfläche zu beschädigen, danach wird das Sammelgel gegossen, bis zum Rand zwischen den Glasplatten einfüllen, Kamm einsetzen. Nach 10-15 min ist die Polymerisation vollendet.

4. Gel in die Laufkammer einsetzen:

-Laufpuffer (pro Liter : 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 1g SDS) erst nur in das Mittelteil der Laufkammer gießen, um auf Dichtigkeit zu prüfen, danach auch in die äußere Kammer Laufpuffer geben, bis die Elektroden überdeckt sind.

-anschließend den Kamm ziehen und die Proben mit langen Pipettenspitzen auftragen. Die Proben vorher 5-10 min bei 95 °C in kochendem Wasserbad erwärmen. 21 µl Probe + 7 µl Probepuffer, bis ca. 35 µl des Gemisches zentrifugieren und in die Taschen auftragen. Marker (Bio-Rad, Germany) ebenfalls erhitzen, zentrifugieren und ca. 10 µl auftragen.

5. Auftrennung der Proben

-der Trennvorgang erfolgt in den ersten 10 min bei 100 Volt.

-anschließend wird für 30 bis 40 min auf 180 Volt erhöht (ist abhängig von der Prozentigkeit des Gels bzw. der Fragmentgröße)

-die Gesamtzeit beträgt ca. 45 min; die Proben sollen bis knapp an den unteren Rand des Gels laufen.

-nach Ende des Laufes die Kammer auseinanderbauen und die kleinere Platte vorsichtig vom Gel lösen, das Sammelgel mit dem Skalpell abtrennen und das Trenngel nun für mindestens 20 min in Transferpuffer (Tris-Base 3g, Glycin 14,4g, 10-20 % Methanol 100-200 ml auf 1 l dest. Wasser) eingelegt schwenken lassen.

-Laufkammer und Glasplatten gut säubern. Glasplatten mit EtOH abspülen und trocknen; Laufpuffer verwerfen.

Wenn kein Western Blot angeschlossen wird, dann:

-Gel in Behälter mit Färbelösung legen (50 ml H₂O +16,6 MeOH + 16,6 Roti Blue, Germany)

-Schütteln über Nacht

-anschließend Entfärbung (250 ml MeOH und 750 H₂O. Entfärbezeit 2-3h.

5.4 **Western Blot** (modifiziert nach: Towbin et al. 1989 sowie Blake et al. 1984)

1. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 min mit 1xTGS-Transferpuffer auf dem Schüttler äquilibriert.
2. Die Blot-Apparatur- Tank-Blot-Apparat (Typ: Trans-Blot®-cell SD Semi-Dry Blot-Kammer; Bio-Rad #170-3940, Germany) wird mit einem Papiertuch, das sich zwischen den beiden Elektroden befindet aufgehoben. Vor dem Gebrauch wird für 10 min ein nasses Papiertuch (H₂O bidest) zwischen die Elektroden gelegt.
3. Pro Blot werden immer vier Stück Blot-Papier (oder 6 Stück Whatmann 3 mm Paper und ein Stück PVDF-Membran vom Typ ImmobilonP (Millipore, Sigma, Germany) mit einer Porengröße von 0,45µ in Gelgröße zugeschnitten.
4. Das Papier wird in Transferpuffer (Puffer nach Towbin et al. 1989, mit 25mM Tris, 192mM Glycin und 10% Methanol-Gehalt) gelegt.

Zusammensetzen des Blots:

Auf Anode (+):

1. Zwei Stück extra dickes Blot-Papier (7x8,4cm # 170-3966, Bio-Rad) oder 3 Whatmann 3 mm-Papiere, welches zuvor mit Transferpuffer äquilibriert wurde. Jedes Papier einmal mit Glasstäbchen walzen, um Luftblase zu entfernen.
 2. Auflegen der Membran (wurde zur Aktivierung kurz zuvor 30 sec. in Methanol und 60 sec. in H₂O bidest. getaucht).
 3. Auflegen des Gels
 4. Wieder zwei Stück extra dickes Blot-Papier (wie oben).
5. Blot-Bedingungen:
50min/200mA für 1 Bio-Rad Miniprotean Gel (50min/400mA für 2 Bio-Rad

Miniprotean Gele). Die Voltzahl darf den Wert 25 nicht übersteigen (Zerstörung der Elektroden), Empfehlung: 10V.

6. Nach dem Blotten wird die Membran in 50ml-Falcon-Tube überführt.
7. Blockieren der Reaktion mit Blockierungslösung (10% Magermilchpulver/TBS-T 0,05%) für 60 min bei RT.
8. Waschen der Membran mit TBS-T 0,05% (Tris-buffered Saline-Tween 0,05%)
 - Dekantieren der Lösung
 - Ca. 30 ml TBS-T0,05% zum Spülen in Falcon Tube geben, Schütteln von Hand
 - Vorgang 3x wiederholen
9. Inkubation mit dem primären Antikörper (Huhn)
 - Verdünnung 1:50
 - z.B. (Huhn) 100 μ l Ak/4900 μ l Blockierungspuffer (10%Magermilchpulver/TBS-T 0,05%)
10. Inkubation auf dem Rollenmischer über Nacht bei 4°C.
11. Waschen der Membran mit TBS-T 0,05%
 - Dekantieren der Lösung
 - Ca. 30 ml TBS-T 0,05% zum Spülen in Falcon Tube geben, Schütteln von Hand
 - Vorgang 3x wiederholen
 - 20ml TBS-T 0,05% in Falcon-Tube geben.
 - 5 min auf Rollenmischer geben
 - dekantieren
12. Inkubation mit dem sekundären Ak (10 μ l in 10ml Blockierungspuffer)
Verdünnung 1:1000 Antichicken (Anti-Chicken-IgG horse-radish-peroxidase-markiert, Sigma, Germany).
13. 60 min auf Rollenmischer bei RT.
14. Waschen der Membran mit TBS-T 0,05%:
 - Dekantieren der Lösung
 - Ca. 30 ml TBS-T0,05% zum Spülen in Falcon Tube geben, Schütteln von Hand
 - Vorgang 3x wiederholen
 - dekantieren
 - 30 ml TBS (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7,5) in Falcon-Tube geben
 - 5 min auf Rollenmischer geben
 - dekantieren

15. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit DAB (3,3` Diaminobenzidin, Sigma, Germany) nach den Vorgaben des Herstellers
 - Falcon-Tube mit den gelösten Komponenten und der Blot-Membran auf Rollenmischer legen, Reaktion durchgehend beobachten bis Färbung stark genug ist.
 - DAB-Lösung dekantieren
 - Reaktion stoppen mit H₂O bidest.
16. Membran trocknen im Brutschrank.

5.5 ELISA

Tag 1:

1. Coating mit Capture-Ak: Verdünnung 1:4000 in PBS pH 7,2 (polyklonaler Schwein anti-Rotavirus-Ak) Menge des Coatings in 96 wells der PRO Bind Platte™ à 50 µl/well (Falcon® Assay-Platte , 96 Vertiefungen ohne Deckel, nicht sterilisiert, BectonDickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA)
2. Inkubation über Nacht bei 4°C mit Folie abgedeckt und versiegelt.

Tag 2:

1. Waschen der Platte mit PBS-T mit dem ELISA-Wascher (Scan-Washer 300, Version B, Scatron Instruments, Norway), der standardmäßig 3 x wäscht. (PBS + 0.1% Tween 20; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany).
2. Blockieren der Platte mit 10 % Humanserum in PBS-T (2,5 l PBS-T + 0,1 % tween 20), 200 µl/ well; Inkubation bei Raumtemperatur für 1h.
3. Waschen s.o. + Ausschlagen der Restflüssigkeit + mit Zellstoff trocknen.
4. Captureschritt Zugabe von Rotavirus in 1:20 PBS-T (keine extra Deaktivierung von Virus mit Tween, die Menge an Tween in PBS-T reicht aus); Inkubation für 1,5 – 2 h bei RT.
5. Waschen mit ELISA-Wascher wie oben.
6. Zugabe des primären Ak (präparierte Proben) in der Verd. (mit Blockierpuffer) 1:1000 (Hühner M1 und M2) und 1:500 (Hühner 88, 89, 91, 92,93 und 95) und 1:500 (Hühner 288 und 289), 50 µl/well; Inkub. 1h bei RT.
7. Waschen wie oben.

8. Zugabe des sekundären Ak anti chicken IgG horseradisch peroxidase (HPRo, Sigma-Aldrich, Germany) 1:30 000 in 10 % Humanserum PBS-T; Inkubation 1h bei RT.
9. 2x waschen im ELISA-Washer wie oben
10. Detektionslösung, OPD Tablette (Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Germany) 5mg in 5 ml PBS pH 6,0 lösen und sofort 8µl H₂O₂ zugeben, RT
11. Detektionslösung pro well zugeben: 50µl; Inkub. 30 min bei RT
12. Stoppen mit 1 M H₂O₂; 25 µl pro well 1 M H₂SO₄
13. Auswerten mit ELISA reader (Bio-Rad, Germany) 492/ 620 nm.

5.6 Immunhistochemie, Zellzucht

15 mm Deckgläser wurden mit 70 % Äthanol abgespült, gründlich getrocknet, in eine 12 well-Zellkulturplatte platziert und mit PBS gewaschen. HEK-293T-Zellen wurden auf der vorbereiteten Deckglasplatte für 24h kultiviert und transfiziert mit codierten Plasmidvektoren pCMV_VP4, pCMV_VP6 oder pCMV_VP7 mittels Polyfect Transfektionsreagenz (Qiagen AG, Hilden). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2,5 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 30 min bei RT fixiert. Der PFA-Überschuss wurde entfernt und die Präparate mit PBS-T (PBS +0,1% Tween 20(v/v)) gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Präparate auf Eis gelegt. 0,5% Triton X-Lösung in H₂O wurde für 15 min zur Erhöhung der Zellpermeabilität verwendet, danach wurden die Zellen mit PBS-T gewaschen. Vor der Färbung wurden die Präparate für 1h bei 37 °C mit Blockierpuffer (1% (w/v) Ovalbumin in PBS+0,1% Tween 20 (v/v)) inkubiert und mit PBS gewaschen. Zur spezifischen Färbung wurden die Zellen bei 37 °C 1h mit IgY-Präparaten in Verdünnung 1:1000 (IgY von der DNA-Immunisierung) und in Verd. 1:5000 (IgY von der Vollvirusimmunisierung) im Blockierpuffer inkubiert. Danach wurden die Proben 3 Mal mit PBS-T gewaschen und in einer 1.250 Verdünnung von Ziegen-anti-chicken-IgY sekundärem Ak im Blockierpuffer für 1h bei 37 °C inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte 3-maliges Waschen in PBS-T und 3 Mal in H₂O, die Proben wurden auf einer Mikroskopierplatte durch ein Bindemedium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) fixiert und via Confokal Mikroskopie analysiert.

5.7 Neutralisationstest

Zu Beginn erfolgte die Hemmung der MA104-Zellen im MEM (ergänzt durch 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% (v/v) nicht essentielle AS).

100 µl der MA104-Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml wurden auf eine 96-well-Zellkulturplatte aufgetragen und wurden bei 37 °C und bei 5% CO₂ inkubiert bis zu deren Zusammenfluss (36-48 h), gefolgt von einem Waschschrift in einem serumfreien Medium.

Auf einer weiteren Platte wurde ein Gemisch aus 50 µl IgY in einer Reihe zweifacher Verdünnung (begonnen mit 1:4) in einem serumfreien Medium und 50 µl von 100x ID₅₀ des bovinen Rotavirus (B223) für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Schließlich wurden 75 µl des Ak-Virus-Mix auf eine Zellkulturplatte mit 25 µl eines serumfreien Mediums und Trypsin (10 µg/ml) transferiert.

Das Virus induzierte einen zytopathischen Effekt, der nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂ evaluiert wurde. Der Titer äußerte sich in einem Kehrwert der Neutralisation erzeugenden Ak-Verdünnung.

5.8 Statistische Analyse

Statistische Analysen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3).

6 Ergebnisse

6.1 Legeleistung und Einfluss der Immunisierung auf die Legeleistung

Die höchste Stabilität der Legeleistung ist bei den Hühnern 288 und 289 beobachtet worden, die mit dem VP 4/6/7 Mix immunisiert worden sind, gefolgt von den Tieren M1 und M2, deren Immunisierung mit dem Vollvirus erfolgte (virulentes BRV). Die durchschnittliche Legeleistung der Plasmid-immunisierten (VP 4, 6, 7) Hühner erschien nicht so regelmäßig. Der ausschlaggebende Einflussfaktor scheint in diesem Fall die Art der Hühnerhaltung zu sein. Die Hühner 288/289 und M1/M2 lebten in Käfighaltung, die anderen 6 Hühner in Bodenhaltung.

Kein sicherer Einfluss der Immunisierungsart -traditionell vs. gene gun- konnte beobachtet werden.

Zu Legeleistung der Hühner 88-95, M1/M2 und 288/289 siehe Bilder 9-11.

Abb. 9 Legeleistung der Hühner, immunisiert mit Plasmiden, kodierend für VP4 (Huhn 88/89), VP6 (Huhn 91/92) und für VP7 (Huhn 93/95) mittels gene gun Methode. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Immunisierung.

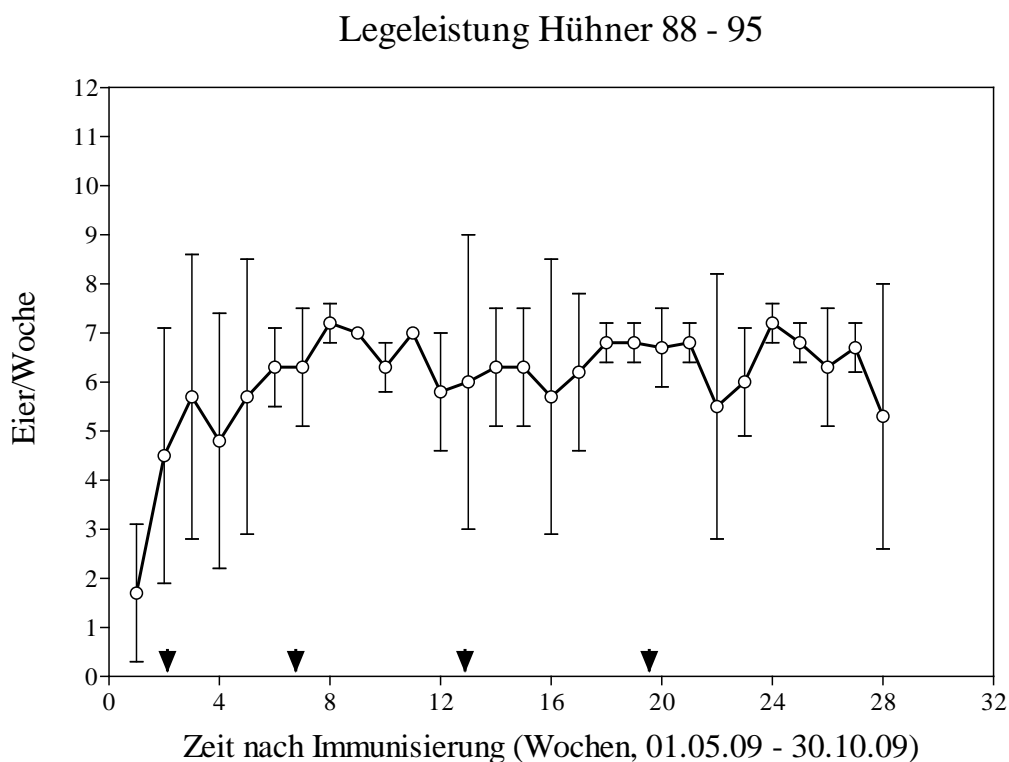


Abb. 10 Legeleistung der mit virulentem Vollvirus („klassisch“) immunisierten Hühner M1 und M2. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Immunisierung und der Boosts.

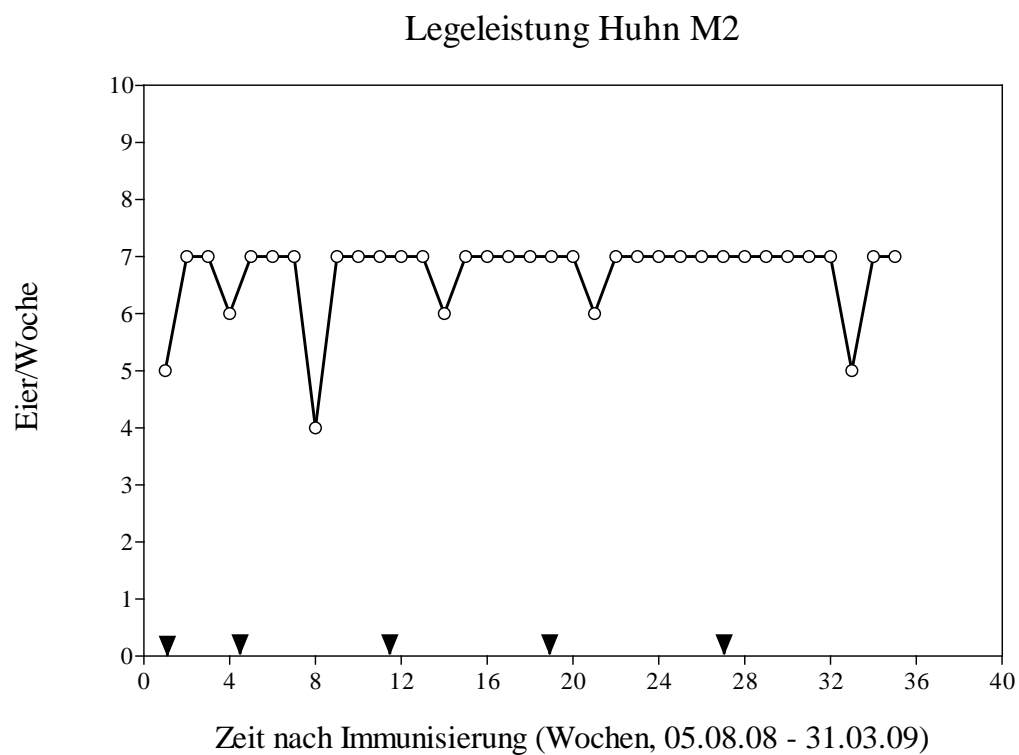
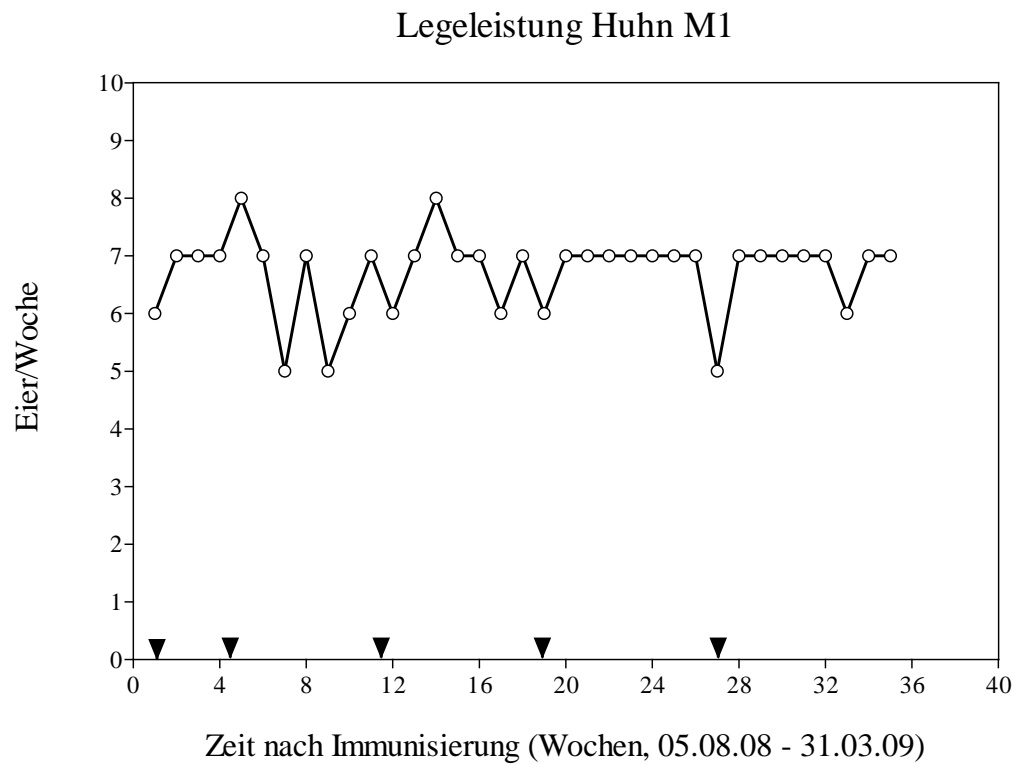
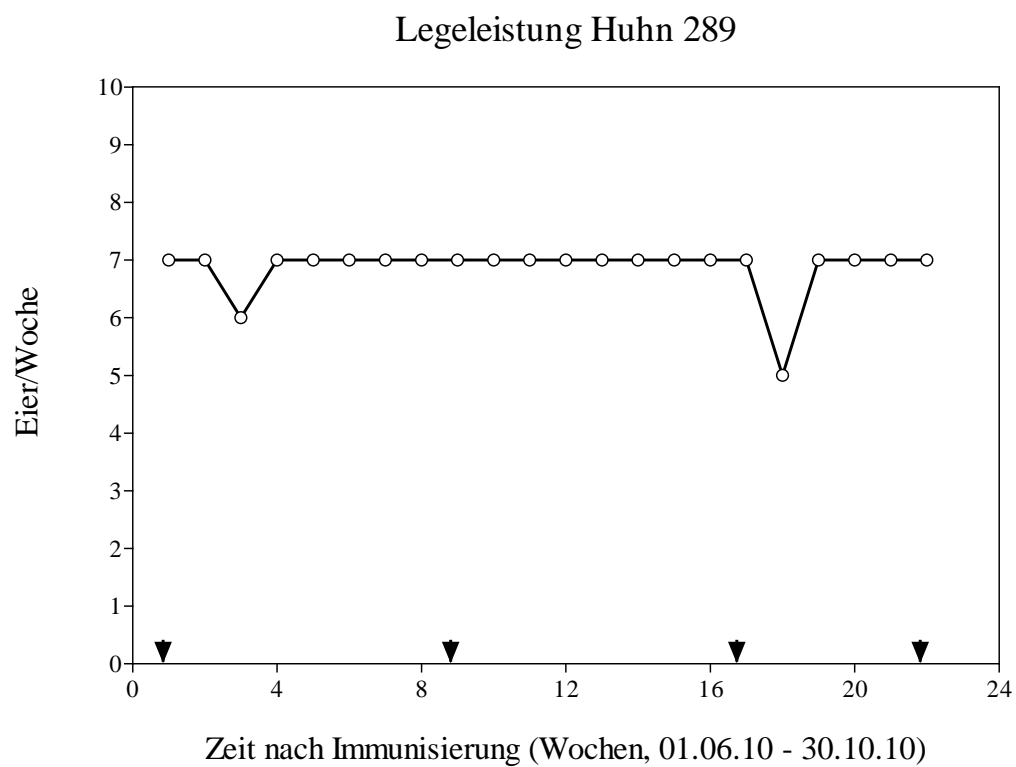
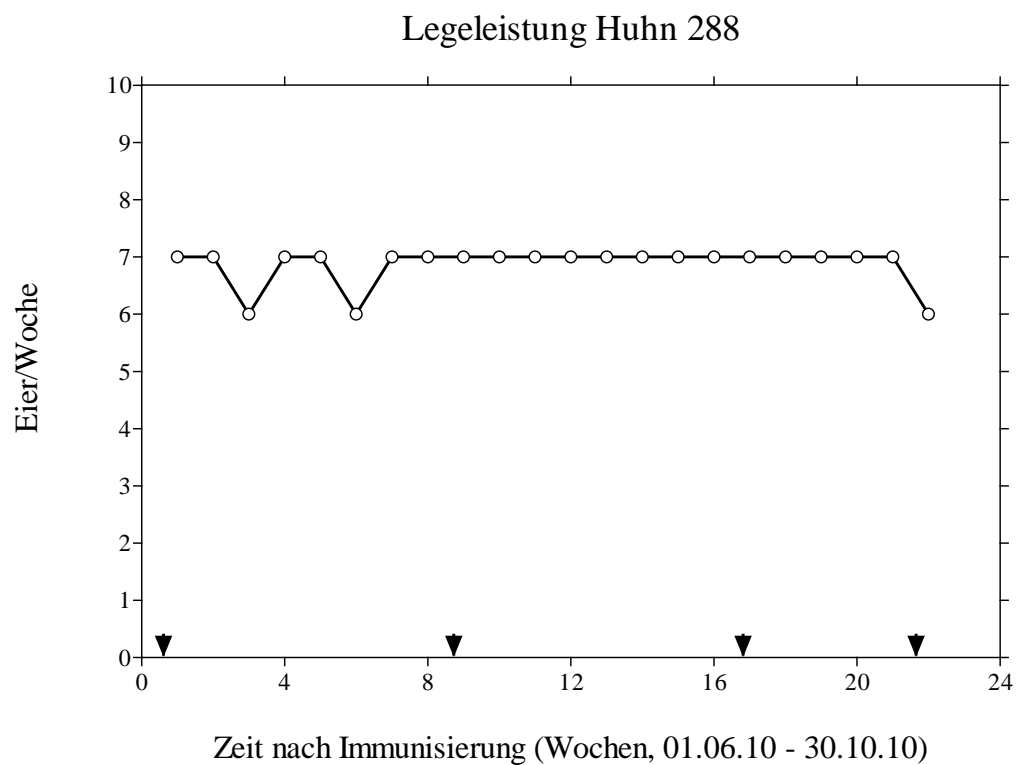


Abb. 11. Legeleistung der mit Plasmidmix (VP4/6/7) mittels gene gun immunisierten Hühner (Huhn 288/289). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Immunisierung und der Boosts.



6.2 Total-IgY-Entwicklung

Die Bilder Nr. 12 bis Nr. 15 zeigen die IgY-Konzentration im Verlauf der Beobachtungsperiode.

Bemerkenswert ist die zeitabhängige Konzentrationsänderung des IgY, welche bei den Hühnern M1 und M2 (Käfighaltung, Immunisierung mit Vollvirus) ähnlich ist (Abb. 14). Ähnliche Entwicklung war ebenfalls bei den Hühnern 288 und 289 (Käfighaltung, gene gun Immunisierung) festzustellen (Daten nicht gezeigt). Die Werte der IgY-Konzentration bei dem Huhn M1 lagen zwischen 37 mg IgY/Eidotter und ca. 70 mg IgY/Eidotter, bei M2 zwischen 32 mg IgY/Eidotter und ca. 70 mg IgY/Eidotter (Abb. 14). Das Volumen der Proben lag durchschnittlich bei 2 ml pro präpariertes Ei. Beim Vergleich der Mittelwerte der IgY-Gesamtkonzentration zwischen M1/M2 (47,14 mg IgY/Eidotter \pm 0,85, MW \pm SEM) und 288/289 (40,51 mg IgY/Eidotter \pm 0,56, MW \pm SEM) ergab sich eine signifikante Differenz von ($p < 0,05$).

Die IgY-Konzentration bei den Hühnern 88-95 (Bodenhaltung, gene gun-Immunisierung) variiert zwischen (Tabelle 1):

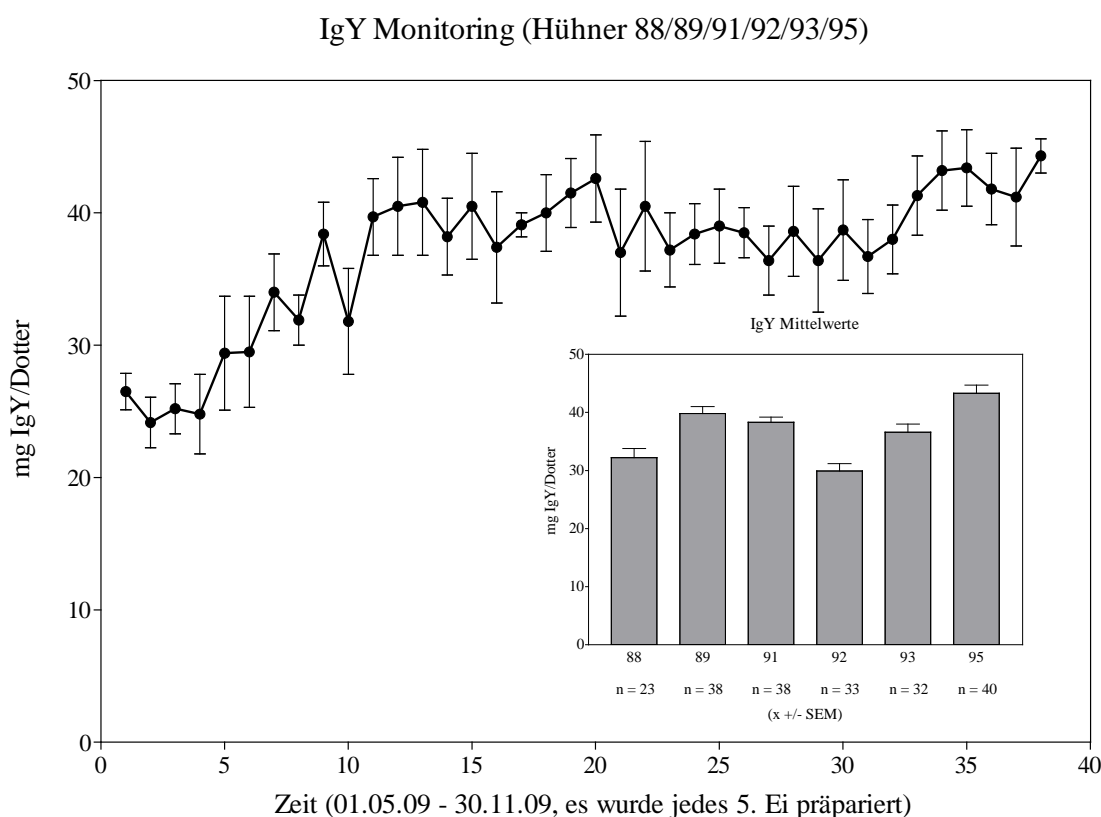
Tabelle 1.

Huhn	Minimale IgY-Konzentration (mg IgY/Eidotter)	Maximale IgY-Konzentration (mg IgY/Eidotter)
88	24,82	57,9
89	33,16	64,28
91	26,32	54,82
92	19,62	50,3
93	23,6	60,08
95	36,1	70,3

Differenzen zwischen einzelnen individuellen Mittelwerten der Hühner 88-95 sind teils statistisch signifikant, z. B. zwischen Huhn 92 und 95 ($p < 0,05$, Mann Whitney Test). Beim Betrachten dieser Mittelwerte zeigt sich ein zeitabhängiger Anstieg der IgY-Konzentration. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert des IgY der M1/M2-Hühner (47,14 mg IgY/Eidotter \pm 0,85, MW \pm SEM) und der Hühner 88-95 (35,92 mg IgY/Eidotter \pm 0,53, MW \pm SEM).

Betreffend Hühner M1/M2 erkennt man im Verlauf der Beobachtung eine offensichtliche periodische Fluktuationen (Abb. 14) .

Abb. 12 Entwicklung von total-IgY (Hühner 88/89/91/92/93/95) im Laufe der Beobachtungsperiode. Gezeigt als Mittelwert \pm SD (standard deviation).



Immunisierungs-/Boostdatum der gene gun immunisierten Hühner

Immunisierung- 29.04.2009

Boost 1- 09.06.2009

Boost 2- 20.07.2009

Boost 3- 27.08.2009

Boost 4- 20.10.2009

Immunisierungs-/Boostdatum der M1/M2 immunisierten Hühner

Immunisierung- 05.08.2008

Boost 1- 27.08.2008

Boost 2- 28.10.2008

Boost 3- 22.12.2008

Boost 4- 25.02.2009

Abb. 13 zeigt den Verlauf der IgY-Konzentration speziell bei Huhn 95. Aus dem Bild sind sowohl zeitabhängige Oszillationen des IgY als auch eine altersabhängige Steigerung der IgY-Konzentration ersichtlich.

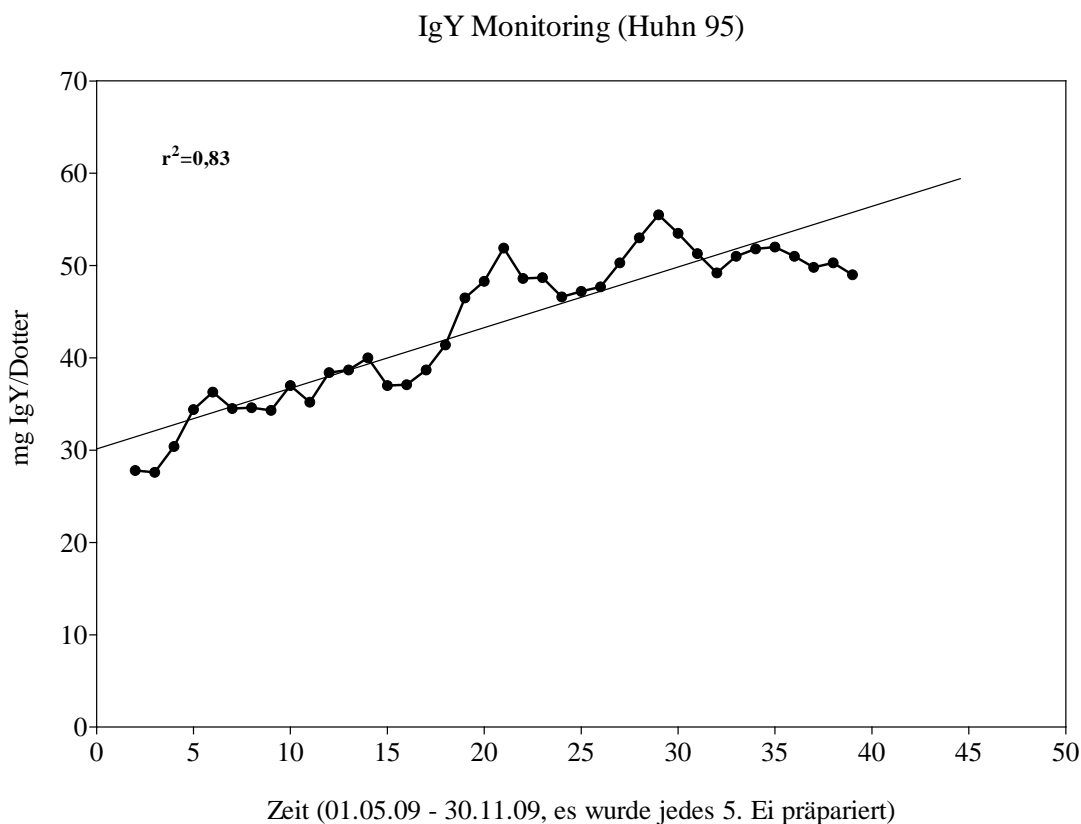


Abb. 14 Entwicklung von total-IgY im Laufe der Beobachtungsperiode (Huhn M1/M2)

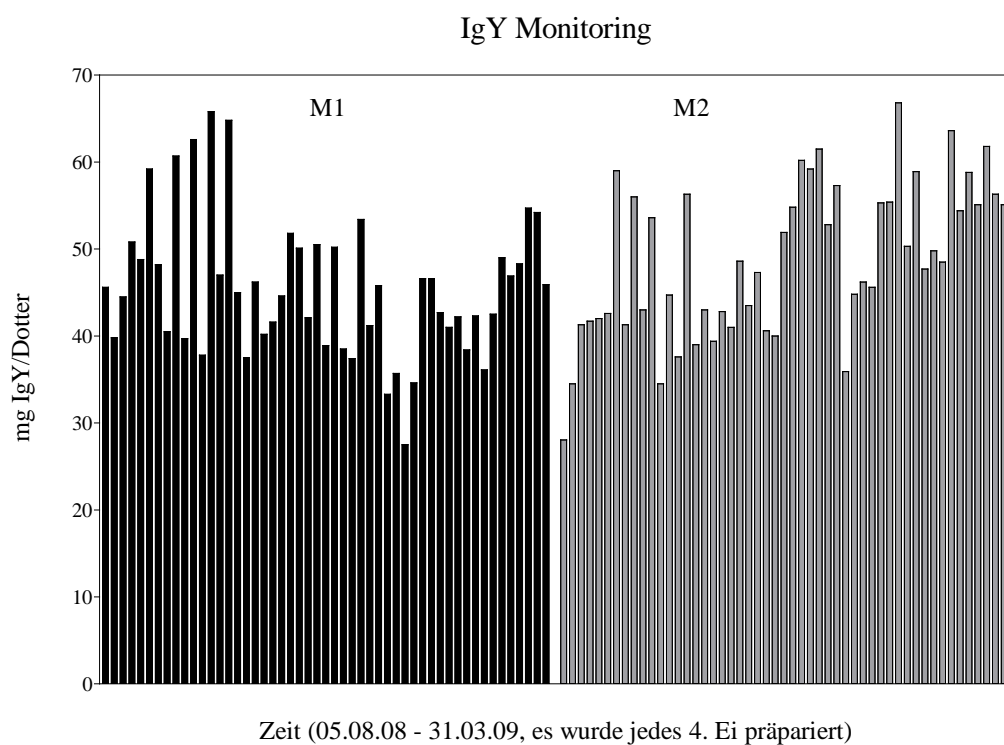
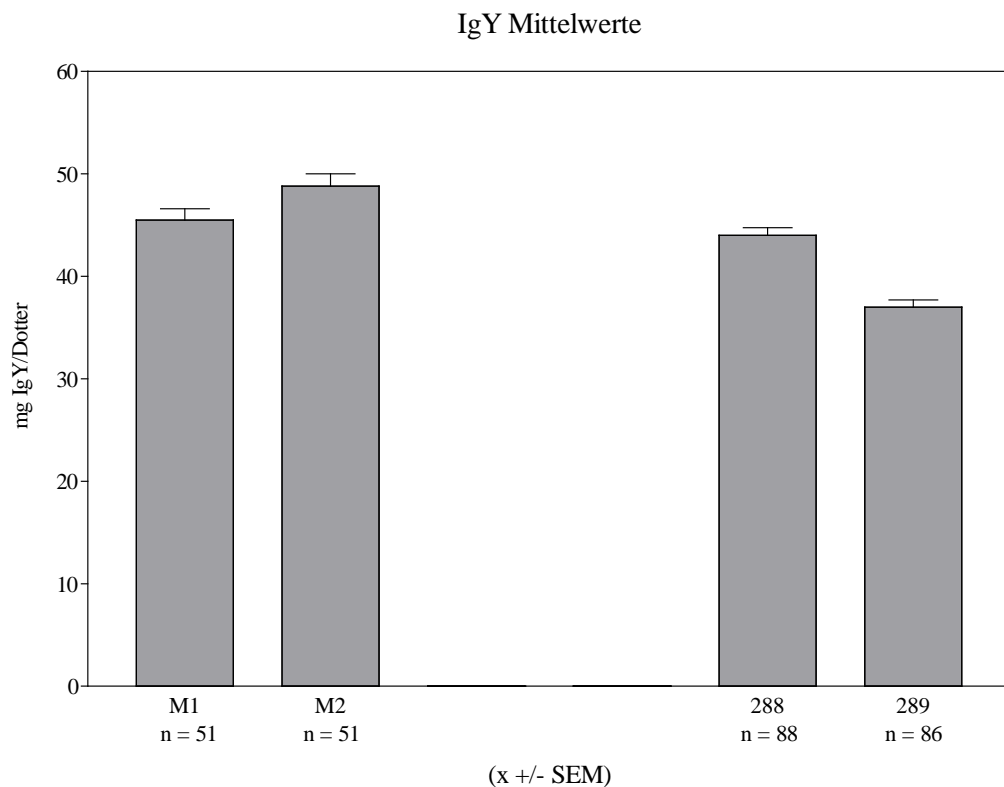


Abb. 15 IgYMittelwerte der Hühner M1/M2 und 288/289 ± SD



6.3 Titermonitoring (ELISA)

Die unter Verwendung der spezifischen Ak erhaltenen ELISA-Ergebnisse zeigen für beide Hühner M1 und M2 einen stabilen Titer in einer Zeit von ca. 7 Monaten (Abb. 16).

Die Boosterung schien die Titerentwicklung nicht signifikant zu beeinflussen.

Im Gegensatz dazu wiesen die mittels gene gun Triple-Ag-immunisierten Hühner 288/289 (VP4/6/7) niedrigere Titer auf und es gab den Anschein, dass nach Boosterung der Titer erstmal stieg, ein Plateau erreichte und wieder fiel (Abb.17).

Die Titerentwicklung bei den mit einem einzelnen Antigen (VP4, VP6, VP7) immunisierten Hühner ist im Allgemeinen sehr niedrig mit signifikanten individuellen Unterschieden (Abb.18). Die Boosterung beeinflusste nur teilweise die Titerentwicklung. Interessanterweise korrelierte der niedrigste Titer (Hühner 88/92) mit der niedrigsten Total-IgY-Konzentration, Abbildung nicht gezeigt.

Abbildungen zur Entwicklung des Anti-BRV-Titers. Die Pfeile markieren die Immunisierung und die Boosterungen.

Abb. 16. Monitoring der Ak-Titer Entwicklung im ELISA nach Immunisierung mit virulentem BRV (Huhn M1/M2). Die Pfeile markieren die Immunisierungen.

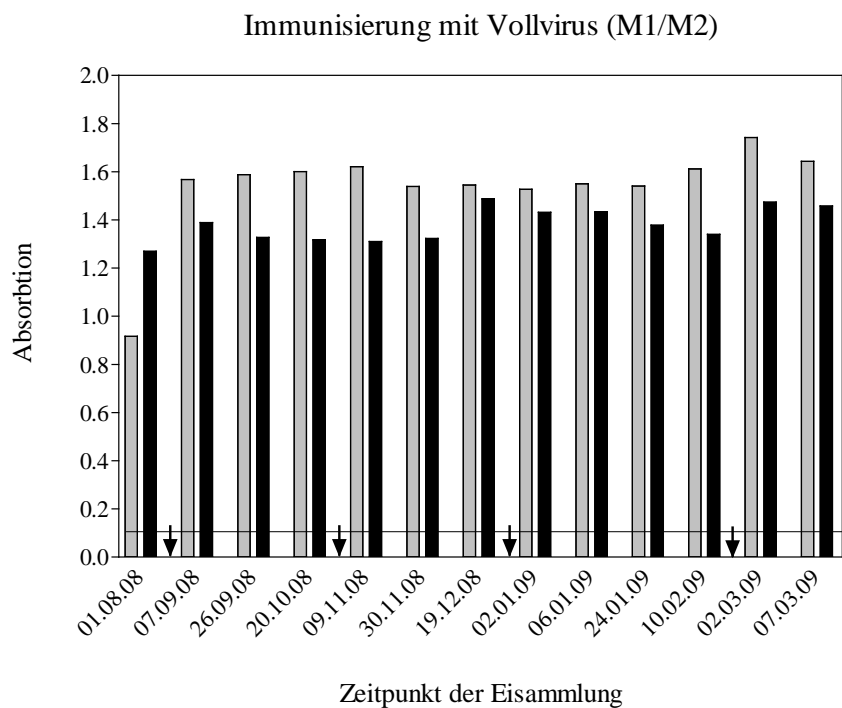


Abb. 17. Monitoring der Ak-Titer im ELISA nach Immunisierung mit einem Antigenmix VP4/VP6/VP7 (Huhn 288/289). Die Pfeile markieren die Immunisierungen.

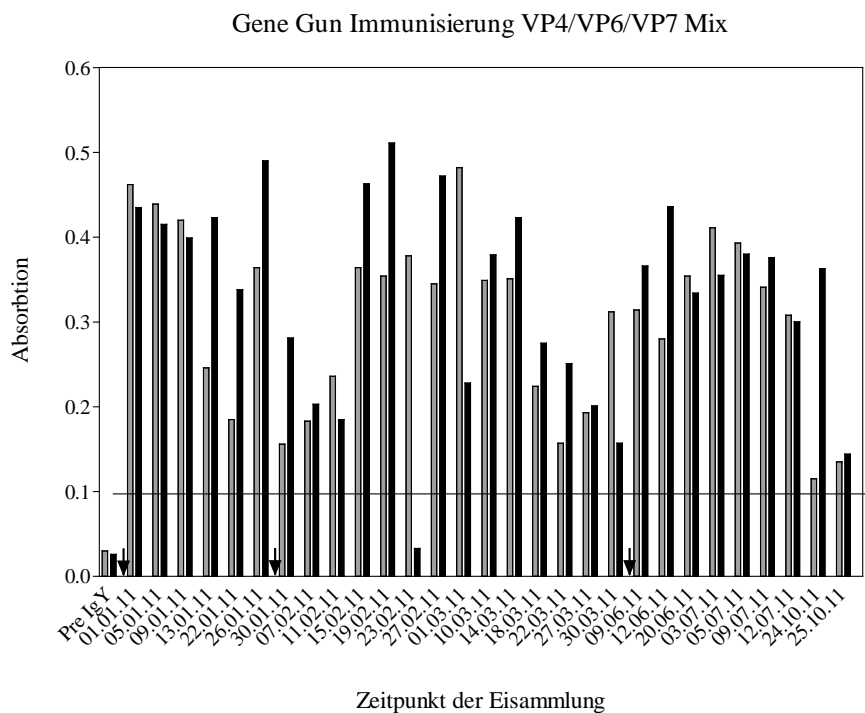
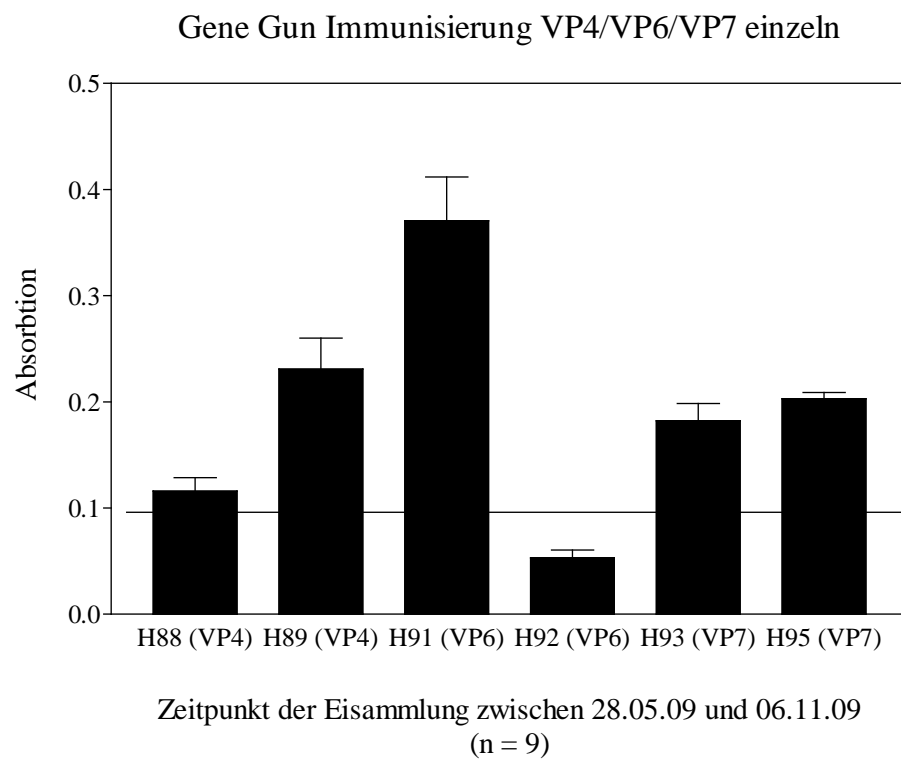


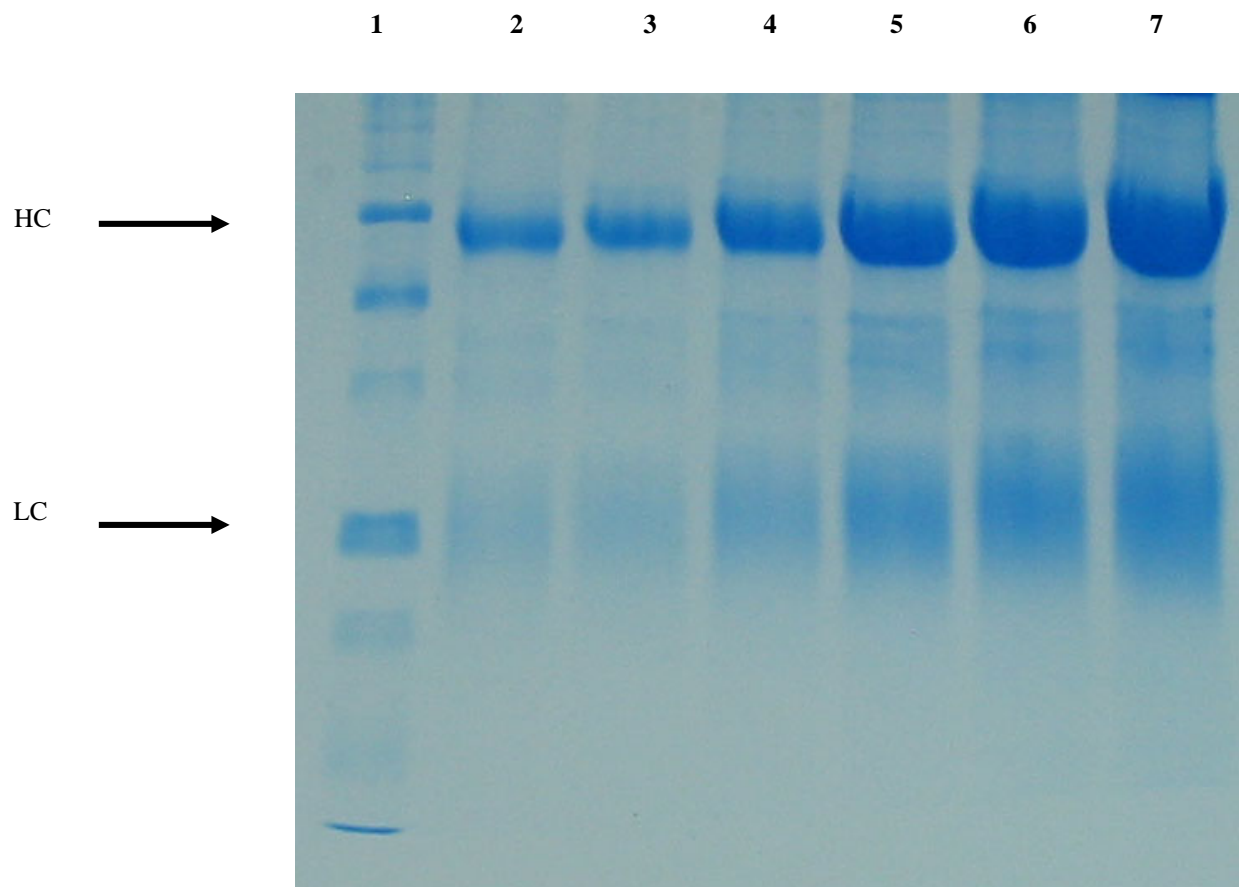
Abb. 18 ELISA-Mittelwerte der Antikörper gegen einzelne Antigene (VP4/VP6/VP7). Gezeigt als Mittelwert \pm SD (standard deviation).



6.4 PAGE

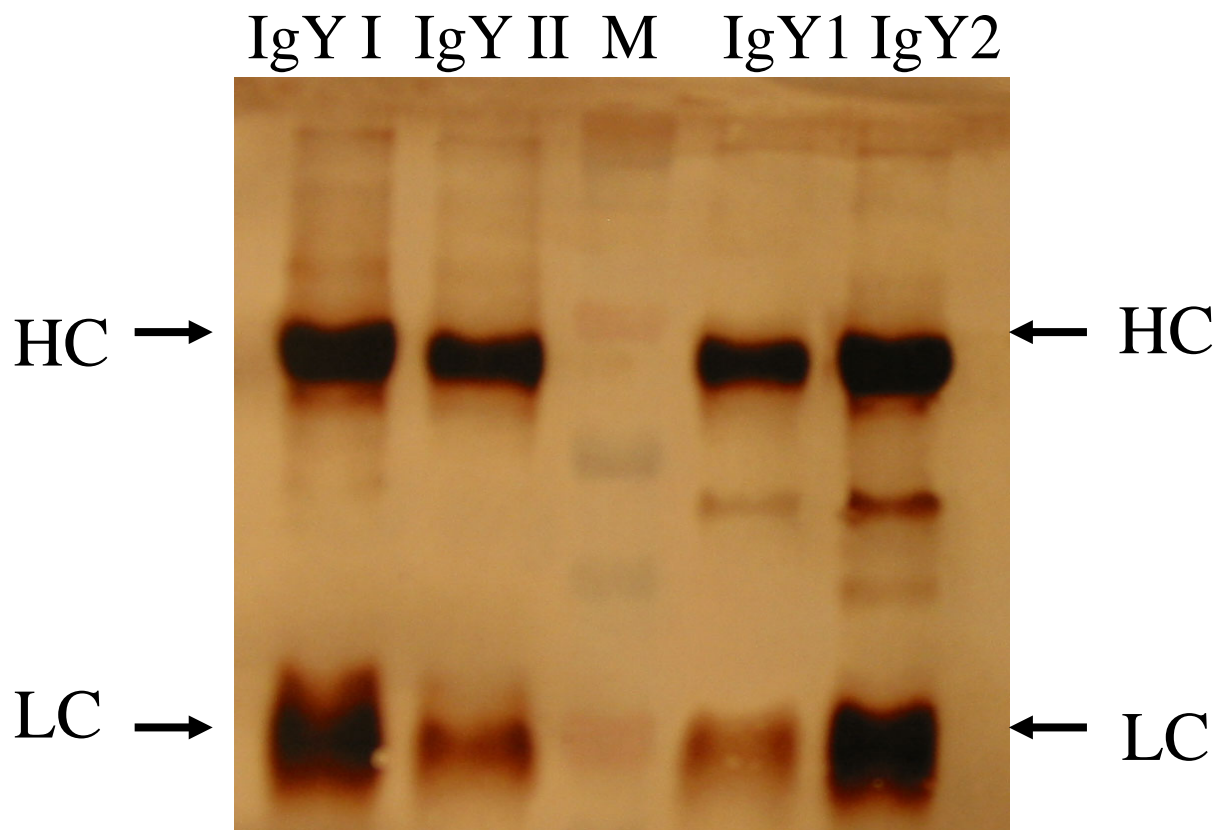
Das mittels PEG-Methode präparierte IgY zeigt einen für den kommerziell erworbenen IgY typischen Verlauf. Aus der Abb. 19 ist ersichtlich, dass die schweren Ketten des IgY zwischen den Markierungen 50kDa-75kDa liegen und somit ungefähr dem Molekulargewicht von 65kDa entsprechen (siehe auch Sun et al. 2001).

Abb.19 Polyacrylamidgelelektrophorese von mittels PEG-Methode präpariertem IgY. Links in der 1. Kolumne Protein-Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein standards, unstained 10-250, Bio-Rad, Deutschland). In der 2. Kolumne IgY Standard 7,5 µg (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). In den Kolumnen 3-7: IgY präpariert via PEG-Methode (Pauly et al. 2011) In der 3. Kolumne in einer Konzentration von 6,5 µg. In der 4. Kolumne von 8,5 µg. In der 5. Kolumne von 10 µg. In der 6. Kolumne von 11 und in der 7. Kolumne von 12,5 µg. HC-heavy chain/schwere Kette des IgY. LC light chain/leichte Kette.



6.5 Western Blot

Abb. 20 Western Blot. Sekundärer Antikörper: Sigma Antichicken 9046. Gefärbt mit DAB. Im mittleren Spalt Marker, BIO-RAD, Dual Color. In der 1. Kolumne kommerzieller IgY 5 μ g, in der 2. Kolumne kommerzieller IgY 2 μ g. In der 4. Kolumne IgY von Huhn M1 2 μ g von einer Präparation von 28.01.2009. In der 5. Kolumne IgY von Huhn M1 5 μ g. HC- heavy chain/schwere Kette, LC light chain /leichte Kette. Die von mir mittels PEG präpariertem Proben haben im Bereich zwischen den LC und HC Verunreinigungen gezeigt.



6.6 Immunhistochemie

Demonstration der anti BRV Antikörper Aktivität in Zellkultur

Wie im Bild Nr. 21 sichtbar resultiert die Applikation der IgY-Präparate nach der 4ten Immunisierung mit für einzelne Proteine kodierenden (VP4-Huhn 89, VP6-Huhn 91, VP7-Huhn 93) DNA in einer effizienten Anfärbung der Zellkulturen, exprimierend das

isolierte VP 24 h post Transfektion. Der Ak von Huhn 89 mit Spezifität gegen VP4 zeigt eine deutliche Lokalisierung der Signale auf der Zytoplasmenmembran, während Signale von VP6 und VP7 eine eher gleichmäßige Verteilung in den Zellen zeigten. Im Vergleich zu der spezifischen immunfluoreszenten Analyse haben die Mock-transfizierten HEK-293T- Zellen keine detektierbaren Signale gezeigt.

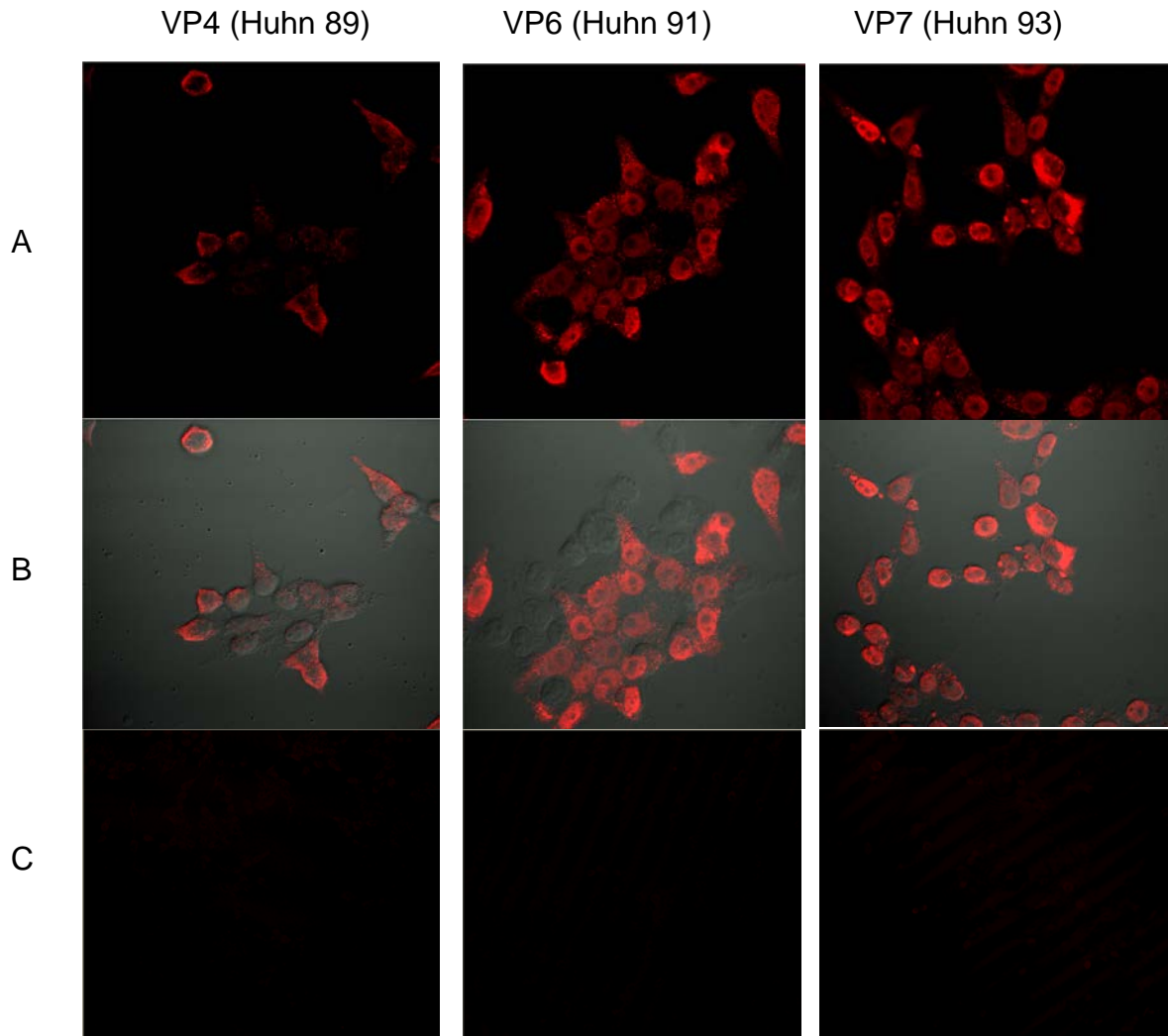


Abb. 21. Mikroskopische Immunofluoreszenz. A) Erste Reihe HEK-293T Zellen transfiziert mit kodierenden Konstrukten VP4 / VP6 oder VP7, Färbung erfolgte mit IgY Präparationen (IgY von der DNA-Immunisierung) kombiniert mit Cy3 Ziegen-anti-chicken-IgY sekundärem Ak.

B) Zweite Reihe zeigt erste Reihe in Kombination mit Überlagerung durch Lichttransmission.

C) Dritte Reihe zeigt HEK-294T transfizierte mit leeren Vektoren mit identischer Färbung wie Reihe 1 und 2.

Alle Bilder wurden mit Zeiss LSM 510 (63x Ölimmersionsobjektiv) aufgenommen.

6.7 Neutralisationstest

Demonstration der anti BRV-Antikörper im Neutralisationstest

Signifikante Neutralisationsaktivität konnte nur bei spezifischen Antikörpern von den M1/M2-Hühnern beobachtet werden. Der Titer zwischen 1:4096 und 1:8192 (Huhn M1) und zwischen 1:2048 und 1:4096 (Huhn M2) jeweils trat nach dem 1. Boost ein und blieb stabil für den Zeitraum von 6 Monaten (Tabelle 2). Obwohl die gene gun Immunisierung in spezifischen anti VP-Antikörpern (ELISA) resultierte, konnte keine signifikante Neutralisationsaktivität festgestellt werden (nur Titer zwischen 1:4 und 1:16) (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Tabelle 2

Antikörpertiter der mit Vollvirus und mit Antigenmix (VP4/VP6/VP7) immunisierter Hühner

Huhn	Titer
M1	1 : 4.096 – 1 : 8.192
M2	1 : 2.048 – 1: 4.096
288	1 : 4
289	1 : 4

Tabelle 3

Antikörpertiter der mit einzelnen Antigenen (VP4; VP6; VP7) immunisierter Hühner

Huhn	Titer
88	1 : 4
89	1 : 4
91	1 : 4
92	1 : 16
93	1 : 4
95	1 : 16

7 Diskussion

7.1 Übersicht IgY-Antikörper, deren Vorzüge und IgY-Technologie

Die Anwendung der IgY-Technologie zeigte in den letzten drei-vier Dekaden eine rasche Entwicklung sowohl in der biomedizinischen Forschung als auch in der Human- und Veterinärmedizin. Hühner sind eine hervorragende Quelle spezifischer Ak. Dies wurde durch eine große Menge wissenschaftlicher Literatur belegt (Pauly et al. 2009, Matheis and Schade 2011, Vega et al. 2011, Sarker et al. 2001, Lee et al. 2002b; Nomura 2005, Hirai 2010, Kovacs-Nola and Mine 2004a, Nilsson 2007, 2008, Schade et al. 2005, Narat 2003) Nach der Immunisierung erfolgt der rezeptorvermittelte Transport der Ak in das Eidotter (West et al. 2004, Morrison et al. 2002, Mohammed et al. 1998, Tesar et al. 2008, Rose et al. 1974) aus welchem spezifische Ak mit einer einfachen PEG-Methode (Pauly et al. 2011) präpariert werden können. Die Immunisierung erfolgt meistens intramuskulär. Chang et al. haben 1999 demonstriert, dass die intramuskuläre Immunisierung in einer höheren Ausbeute spezifischer IgY resultiert verglichen mit subcutaner Ag Injektion.

Die Hühnerantikörper bieten mehrere Vorteile gegenüber den Säuger-Antikörpern bei der Anwendung zur Detektion von Säuger-Antigenen. Dank ihrer evolutionären Unterschiede (Ambrosius 1996) reagieren Hühner-IgY mit mehr Epitopen der Säuger-Ag (Larsson and Sjökvist 1990), was zu einer Signalverstärkung führt. Außerdem können Hühner-Ak benutzt werden, um Interferenzen in immunologischen Assays zu vermeiden, die z.B. durch das humane Komplementsystem, Rheumafaktoren (Larsson and Sjökvist 1990) sowie das human anti-mouse IgG (HAMA) (Carlander et al. 2000) verursacht werden. Ein Huhn produziert eine größere Menge Antikörper als ein Kaninchen in der gleichen Zeit, somit stellt es eine preiswerte Möglichkeit dar, hohe Mengen spezifischer Antikörper zu erhalten (Carlander et al. 2000) (ein einzelnes Huhn produziert im Durchschnitt 20 mg IgY pro Jahr). Aus diesem Grund eröffnet die IgY-Technologie Möglichkeiten zum Einsatz der Antikörper in unterschiedlichen Bereichen wie Immuntherapie, Immunprophylaxe für virale und bakterielle Infektionen sowohl in der klinischen Medizin als auch in der Wissenschaft (Carlander et al. 2000, Schade et al. 2007).

7.2 Lagerung der IgY-Antikörper

Die aus dem Eidotter präparierten IgY-Ak sollten nach der Empfehlung der Extraktionsmethode nach Polson et al. 1980 und Pauly et al. 2011 bei einer Temperatur von -20 °C eingefroren werden. Bei häufiger Verwendung der Proben, verbunden mit deren Auftauen, kommt es zur chemischen Veränderungen der Antikörper und damit Aktivitätsverlusten. Somit ist eine Lagerung solcher Proben bei Kühlschranktemperaturen von 4°C eine optimale Alternative, vorausgesetzt, dass Antibiotika wie z.B. Natriumazid zugesetzt werden.

7.3 Teilprozesse der IgY-Technologie und Beeinflussung dieser Vorgänge

Die IgY-Technologie stellt ein komplexes Geschehen dar, in welchem folgende Teilprozesse von Bedeutung sind: die IgY-Biosynthese und dessen rezeptorvermittelter Transport in das Eidotter (Tressler and Roth 1987, Kowalczyk et al. 1985), die Legeleistung der Hühner, die Entwicklung des total-IgY und Einflussfaktoren die sich auf die Legeleistung bzw. Titerentwicklung auswirken können (Pauly et al. 2009).

7.4 Einfluß der unterschiedlichen Haltungssysteme auf die Legeleistung und die humorale Immunantwort.

In der Studie von Erhard et al. 2000 wurde der Einfluss der Haltungssysteme, Käfighaltung versus Bodenhaltung, auf die Legeleistung der Hühner und deren humorale Immunantwort untersucht. Hierbei handelte es sich um eine Bestrebung, das Wohlbefinden der Hühner durch die Optimierung der Haltungsbedingungen zu erhöhen. Es wurde erwartet, dass die Erhöhung des Wohlbefindens der Vögel einen positiven Einfluss auf deren Gesundheit haben wird und dies wiederum mit einer höheren Legeleistung korreliert.

Die Bodenhaltung, was als eine Art natürlicher Lebensraum betrachtet wurde, ist durch den Platzmangel limitiert (die minimale empfohlene Fläche beträgt 4m² für 10 Vögel). Für die Käfighaltung wird vorausgesetzt, dass Hühner die Gelegenheit haben, ihr natürliches Verhalten ausüben zu können.

In der Studie von Erhard et al. 2000 wurden insgesamt 80 Hühner auf 4 Gruppen aufgeteilt: 2 Gruppen je 20 Hühner in Bodenhaltung und 2 Gruppen je 20 in Käfighaltung. Alle Vögel wurden subcutan mit 100µg humanem Serum IgG immunisiert.

Die Immunisierung wurde zweimalig in Abstand von vier Wochen durchgeführt. In je einer Gruppe von den unterschiedlichen Haltungssystemen wurde das Lipopeptid PCSL als Alternative zum Freund'schen Adjuvans in einer Dosierung von 0.25mg injiziert (Adjuvansgruppen). In den beiden anderen wurde kein Adjuvans verwendet (Antigen Kontrollgruppe).

In der Zeit von 11 Wochen hat man Folgendes beobachtet:

- Die durchschnittliche Ausbeute an Eiern war signifikant höher in der Antigen Kontrollgruppe und in der Adjuvansgruppe von den in Käfigen gehaltenen Hühnern.
- Das Mittelgewicht von den Eiern und den Eischalen blieb konstant während der gesamten Beobachtungsdauer.
- Das mittlere Gewicht von dem Eidotter war größer in der Bodenhaltung, das von dem Eiweiß in der Käfighaltung.
- Die Haltung der Hühner in Käfigen resultierte in einem höheren mittleren Titer der spezifischen Antikörper und in einer höheren mittleren IgY-Konzentration im Eidotter (Erhard et al. 2000).

In dieser Studie zeigten sich die Produktivität und die Immunantwort negativ beeinflusst durch die Bodenhaltung. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu genießen, da die Möglichkeit besteht, dass einige unbeachtete Faktoren, wie z.B. Hygieneprobleme in der Bodenhaltung, die Ergebnisse verfälscht haben könnten und es sehr wichtig ist, weitere Studien zu diesem Thema durchzuführen, damit der Einfluss der Haltung ausreichend verstanden werden kann (Erhard et al. 2000).

Unter den heutigen Haltungsbedingungen beträgt die Legeleistung von einem Huhn durchschnittlich 1 Ei/ Tag (unsere Werte).

Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich beobachten, dass die Käfighaltung mit einer stabileren Legeleistung assoziiert war (Hühner M1/M2 und 288/289) im Vergleich zur weniger konstanten Legeleistung der in der Bodenhaltung lebenden Tiere (Huhn 88-95). Ebenfalls der IgY-Gehalt und der im ELISA untersuchte Titer der spezifischen Ak wurde durch die Käfighaltung eventuell positiv beeinflusst. Die Ergebnisse der beiden Studien stehen somit im Einklang. Dennoch sollten weitere Studien zu diesem Thema durchgeführt werden, um Haltungsbedingungen weiter zu optimieren.

7.5 Einfluß der unterschiedlichen Adjuvantien auf die Legeleistung und auf den Antikörpertiter, Nebenwirkungen der Adjuvantien.

Die Auswirkungen von FCA/FIA (Freund's complete/incomplete adjuvans) auf die Legeleistung wurde von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. Der Artikel von Bollen und Hau (1999) berichtet über eine signifikante Frequenzreduktion der Legeleistung unter FCA-Einsatz im Vergleich zu FIA und Hunter's TiterMax. Hierbei haben die Autoren jedoch beobachtet, dass der spezifische Ak-Titer unter Verwendung von FCA höher war, hielten es jedoch für inkonsequent die Ak-Ausbeute aufgrund von FCA-Einsatz zu verringern. Andere Autoren haben keinen negativen Effekt des FCA beobachten können (Matheis und Schade 2011). Wanke et al. 1996 haben gezeigt, dass die Zugabe von FCA im Vergleich zu NaCl in einer langanhaltenden Erhöhung des Ak-Titers resultiert, jedoch leider mit einer persistierenden granulomatösen Myositis in der Injektionsstelle vergesellschaftet ist im Vergleich zu einer leichten transienten Form der interstitiellen Myositis bei NaCl-Gabe. Trott et al. haben 2008 feststellen können, dass die Zugabe von abgetöteten Streptococcus suis oder Streptococcus aureus zu FCA mit einer höheren Produktion spezifischer IgY gegen PLA2 (Phospholipase A2) einherging. Levesque et al 2007 haben demonstriert, dass die Ergänzung des FIA durch synthetische Oligonucleotide ebenfalls zu einer Steigerung des spezifischen IgY führt. Erhard et al. 2000 verwendete PCSL-Adjuvans als Alternative zu FCA in einer untersuchten Vogelgruppe im Vergleich zu NaCl in der Antigen-Kontroll-Gruppe. Die Legeleistung zeigte in beiden Gruppen wenig Unterschied und war gering höher in der Ag-Kontroll-Gruppe. Schniering et al. (1996) immunisierten Hühner mit einem Mix aus FCA oder FIA und einem toxischen somatischen oder exkretorisch/sekretorischen Antigen von Ascaris suum. Nach der Immunisierung mit dem o. g. Mix haben die Hühner das Eierlegen zum Teil für einige Wochen eingestellt. Der Grund dafür war jedoch in diesem Fall vielmehr die toxische Natur des Antigens und nicht die FCA/FIA-Anwendung.

In der vorliegenden Arbeit erfuhr die Legeleistung keinen negativen Einfluss bei FCA/FIA-Anwendung, jedoch gab es Gewebsreaktionen (Muskel) an der Applikationsstelle.

7.6 Altersabhängige Kinetik der Legeleistung und des total-IgY

In der Studie von Pauly et al. 2009 wurde ein Monitoring der Legeleistung, der IgY-Konzentration und des Ak-Titer bei mit Ricin und Botulinum-Toxin immunisierten Hühnern durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Legeleistung der Hühner im Verlauf von zwei Jahren abnimmt (Information der Hühnerfarm Bestensee). In der vorliegenden Studie blieb die Legeleistung im Verlauf der Beobachtungszeit von maximal 8 Monaten stabil.

Die Entwicklung des total-IgY ist altersabhängig und stieg über den Beobachtungszeitrahmen (01.05.09 – 30.11.09) bei den Hühnern 88-95 auf ca. 160%. Auch Pauly et al. 2009 fanden eine eindeutige altersabhängige Kinetik der IgY-Konzentration.

Es hat den Anschein, dass der Charakter des applizierten Antigens und oder die Immunisierungsart und/oder auch das ausgewählte Adjuvans einen Einfluss auf die totale IgY-Konzentration hat, da das total-IgY der klassisch immunisierten Hühner M1/M2 (virulenter kompletter Virus) signifikant höher als das total-IgY der gene gun-immunisierten Hühner (Huhn 88-95 und 288/289) ist. Zusammenfassend lässt sich auch sagen, dass bei allen Tieren die IgY-Konzentration im Laufe der Zeit steigt.

7.7 Einfluß der IgY-Extraktionsmethode auf die IgY-Konzentration.

Laut Bizhanov und Vyshniauskis 2000 hängt die IgY-Konzentration unter anderem auch von der Extraktions-Methode ab. Die Wahl der Extraktionsmethode ist abhängig von mehreren Faktoren, unter anderem vom Purifikationsmaßstab (Labor oder Industrie), Kosteneffizienz, Technologie (Laborausrüstung) (Pauly et al. 2011). Unterschiedliche Extraktionsmethoden wurden von De Meulenaer & Huyghebaert 2001 und Schade et al. 2005 ausführlich beschrieben. Es existieren 3 Gruppen: 1.Präzipitationsmethoden, hier unter anderem PEG; 2.Chromatographie, z. B. Affinitätschromatographie und 3. Ultrafiltration. Der Reinheitsgrad des IgY kann durch Kombination der Methoden erhöht werden. Nicht der gesamte IgY wird mittels der PEG-Methode nach Polson 1980 gereinigt und es existieren effizientere Methoden ([Stålberg and Larsson 2001](#)). Die PEG-Methode wurde jedoch von uns verwendet und zeigte einen ausreichend hohen Reinheitsgrad des IgY. Außerdem ist diese Methode sehr schnell und preiswert.

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten IgY-Präparation mittels PEG-Methode haben im Western Blot (siehe Abb. 20) drei unterschiedliche Banden ergeben, und zwar die für schwere Ketten mit einem Molekulargewicht von etwas

weniger als 70 kDa, für leichte Ketten bei 25 kDa und eine weitere Bande bei ca. 35 kDa. Dies steht in Übereinstimmung mit den SDS-PAGE-Resultaten von Klimentzou et al. 2006. In der Studie von Klimentzou et al. 2006 erfolgte die IgY-Präparation mittels einer Verdünnung des Eidotters in einem säurehaltigem Wasser (pH 5.2). Neben dem Standardbanden für die schwere und leichte Kette wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa co-isoliert. Durch Anwendung der Standard Proteomtechnologie wurde diese Bande von Klimentzou et al. 2006 als C-terminales Fragment des Eidotterproteins Vitellogenin II Precursor identifiziert.

7.8 Biologische Oszillationen der IgY-Konzentration

Betreffend Hühner M1/M2 lässt sich im Verlauf der Beobachtung eine offensichtliche biologische Oszillation des total IgY beobachten. In einer kürzlich durchgeführten Studie (Pauly et al. 2009) wurde die biologische Fluktuation des total-IgY exemplarisch untersucht und man kam zu der Erkenntnis, dass IgY einem septadianen Rhythmus bzw. seinem Mehrfachen folgt. Die Herkunft des septadianen Rhythmus wurde bereits in einigen Studien diskutiert und in Verbindung mit z. B. Herztod, Blutdruck, Steroidexkretion gebracht (Cornélissen et al. 1993, Labreque et al. 1995, Halberg et al. 2003). Der circaseptane Rhythmus wurde ebenfalls für einige Komponenten des Immunsystems beschrieben (Haus und Smolensky 1999).

7.9 Wirksamkeit des protektiven IgY im Mausmodell und im Kälbermodell. Durch das IgY bewirkte Immunmodulation im Darm.

Seit ungefähr 1980 gibt es mehrere Veröffentlichungen, die die Wirksamkeit des protektiven IgY in einem Mausmodell von RV-induzierter Diarrhö beschreiben (Ebina et al. 1990, Bartz et al. 1980, Kuroki et al. 1993). Kuroki et al. 1993 stellten fest, dass der durch die BRV (Serotyp 6 und 10) induzierten Diarrhö durch orale Gabe der IgY-Präparate vorgebeugt werden konnte, die Protektionsrate war dosisabhängig und erreichte 100% bei den höchsten IgY-Konzentrationen. Diese Studie war als Vorbereitung auf eine Studie mit Kälbern gedacht. Das Mausmodell kann jedoch nicht als ein exaktes Modell der humanen Rotavirenerkrankungen gelten, da BRV eine suboptimale Replikation in der Maus zeigt.

Bereits aus den 90er Jahren gibt es mindestens zwei unter Feldbedingungen durchgeführten Studien (in Japan und in der Türkei), die in der Lage waren, signifikante

protektive Effekte der IgY-Präparate mit einer gegen die BRV-Stränge gerichteten Spezifität bei infizierten neonatalen Kälbern nachzuweisen (Özpinar et al. 1996, Kuroki et al. 1997). Kuroki et al. 1997 haben in ihrer Feldstudie gezeigt, dass die orale Gabe von BRV-spezifischem IgY in einer signifikanten Gewichtszunahme der Kälber und Reduktion der Anzahl der Tiere mit hohen BRV-Konzentrationen im Stuhl resultiert. Kürzlich in Argentinien durchgeführte Studien bestätigen diese Ergebnisse (Vega et al. 2011). Das Ziel der Studie von Vega et al. 2011 war die Evaluation der durch die orale Gabe von BRV-spezifischem IgY induzierten Protektion und der Immunmodulation bei experimentell mit BRV infizierten neonatalen Kälbern. 80% der infizierten Kälber, die mit BRV-spezifischem IgY supplementierte Milch bekamen, waren gegen die BRV-Diarrhö geschützt. Bovine RV-spezifische IgY-Ak wurden im Stuhl der Kälber detektiert, als Hinweis darauf, dass die Hühner-Ak nach der Passage durch den gastrointestinalen Trakt intakt bleiben. Drei Wochen post infectionem war der Zwölffingerdarm der Hauptort der BRV-spezifischen ASC (Ak sekretierenden Zellen). Mukosale Immunantwort wurde auch bei Kälbern beobachtet, denen man Milch mit unspezifischen IgY-Ak verabreichte, was ein Indikator dafür ist, dass Eidotterkomponenten die Immunantwort gegen BRV auf der mukosalen Ebene modulieren. Jedoch waren diese Kälber von schwerer Diarrhö nicht verschont sowie auch Kälber, die nur Colostrum oder Ak-freie Milch bekamen. Welche Komponenten des rohen Eidotters die ASC-Zahl erhöhen, ist noch nicht geklärt. Es existieren mehrere Erklärungen für die immunmodulatorischen Eidotter-Eigenschaften. Eidotter enthält bioaktive Moleküle (Hormone und Zytokine). Xu et al. 2006 demonstrierten immunomodulatorische Eigenschaften des im Eidotter entdeckten TF (transfer factor) auf die Thymus-Milz-Achse mit stimulierender Wirkung auf die Lymphozytenproliferation im Mausmodell. Nelson et al. 2007 haben gezeigt, dass Dotterproteine nicht immunisierter Hühner immunmodulatorisch im Darm in vivo wirken, z. B. durch direkte Blockade des Pathogeneintritts. Die Dotterproteine induzieren außerdem IgA ASC im Darm um die Colonisierung des Darmlumens durch Pathogene zu vermeiden. Somit stellt die Gabe von RV-spezifischen Ak in den ersten 14 Lebenstagen der Kälber eine vielversprechende Strategie zur Prävention der BRV-Diarrhö dar (Vega et al. 2011).

7.10 Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Immunisierung mit Vollvirus bzw. mit Plasmiden, mögliche Ursachen. Gene gun Immunisierung.

Mit wenigen Ausnahmen (e.g. Kovacs-Nolan et al. 2001) handelt es sich bei den zitierten Studien um Projekte, in denen zur Immunisierung der Legehennen virulenter oder inaktivierter Vollvirus eingesetzt worden ist. Auf diese Weise immunisierte Hühner produzierten spezifische Ak mit neutralisierenden Eigenschaften. Das steht in Übereinstimmung mit dieser Studie (siehe Hühner M1/M2).

Kovacs-Nolan et al. (2001, 2003) produzierten IgY-Ak gegen VP8* (ein Spaltprodukt von VP4) der humanen RV. Die spezifischen anti-VP8* -Antikörper zeigten eine neutralisierende Aktivität. Kovacs-Nolan et al. (2001, 2003) diskutierten, dass der rekombinante Wa-Strang VP8, welcher in der Lage ist die Produktion spezifischer neutralisierender Ak gegen humane RV auszulösen, das Potential eines Vakzinekandidaten hat. Die Ergebnisse der Studie erlauben die Isolierung der Aminosäure-Sequenzen, die verantwortlich sind für die Synthese von hochspezifischen neutralisierenden IgY-Ak und welche möglicherweise signifikante Konsequenzen für die Vakzineforschung hat (Kovacs-Nolan et al. 2003).

Erfolgreich waren auch Dai et al. (2013). Diese Autoren immunisierten Hühner mit bivalenten Antigenen, konstruiert aus P-Partikeln des Norovirus und VP8* (P-VP8*) und erhielten Antikörper mit neutralisierender Eigenschaften sowohl gegen Noro- als auch gegen Rotavirus.

Die gene gun Immunisierung der Hühner ist eine relativ neue Methode und deswegen findet sich aktuell noch wenig Literatur zu diesem Thema. Witkowski et al. (2009) produzierten erfolgreich Ak gegen die Pockenproteine F1L und p28. Bei der gene gun Immunisierung der Hühner konnten große Mengen Antikörper gegen die Pockenproteine generiert werden und das bei einer weiteren Stressreduktion der Tiere durch eine geringe Invasivität. Die DNA-Immunisierung stellt eine effektive Möglichkeit für Ak-Design und –Produktion dar. Diese zeitökonomische Methode spart Ressourcen, die normalerweise zur Proteinexpression und Purifikation erforderlich sind. Das interessierende Protein/Peptid wird direkt im Gewebe der Tiere exprimiert und bleibt in seiner nativen Konformation, was eine große Bedeutung für die Spezifität der resultierenden Ak hat. Das System, basierend auf der Anwendung von „naked DNA“ auf kleinen Partikeln aus Edelmetallen wurde zum ersten Mal 1987 zur Transformation von Zwiebelzellen eingeführt (Klein et al. 1992). Sanford et al. 1987 adaptierten den Prozess zur Transformation von Tiergewebe in situ und schließlich in lebenden Tieren

(Williams et al. 1991) Die Prozedur erlaubt eine non-invasive Immunisierung kombiniert mit Vorteilen der DNA-Vakzine.

Niederstadt et al. (2012) setzten Plasmidkombinationen ein, die sowohl für Botulinum Toxin A1 als auch für Hühner-Interleukin 1 β (IL-1 β) und IL-6 kodieren. Ebenfalls in diesem Fall war die gene gun Immunisierung erfolgreich. Niederstadt et al. 2012 haben den Effekt von Hühner-IL (IL-1 β) und IL-6 in der Rolle eines genetischen Adjuvans bei der Hühnerimmunisierung untersucht. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von für immunstimulatorische Zytokine kodierende Vektoren in der humoralen Immunantwort für höhere Ak-Titer sorgt. Die Eier der gene gun immunisierten Hühner haben keine Unterschiede in deren total-IgY-Gehalt gezeigt, die spezifische Immunantwort auf aBoNT A1 wurde leicht erhöht durch IL-1 β und stärker erhöht durch den IL-6-Vektor. Die Legeleistung der Hühner wurde durch IL-1 β positiv und durch IL-6 negativ beeinflusst.

Genetische Zytokine sind dafür bekannt, die Effizienz der DNA-Immunisierung zu erhöhen (Mahdavi et al. 2011). Bis jetzt existiert jedoch nur wenige Studien, die zeigen, dass die Immunantwort auf Zielantigene durch IL-6-Anwendung als Adjuvans im Rahmen von intramuskulärer Immunisierung (Cho et al. 2004) und im Rahmen von gene gun-Immunisierung verstärkt wird (Niederstadt et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass gene gun Immunisierung der Hühner mit Plasmiden kodierend für VP4/ VP6/ VP7 als einzelne Antigene oder in Kombination zur Produktion von Antikörpern unterschiedlicher Qualität führte. In Übereinstimmung mit ELISA-Ergebnissen waren die Ak, die durch triple antigen Immunisierung zustande kamen (Huhn 288/289) denen von der Einzel-Ag-Immunisierung überlegen (Hühner 88-95). Diese Tatsache könnte folgendermaßen interpretiert werden, dass je mehr immunogene Substanzen den Tieren appliziert werden umso höher der Ak-Titer ist. Ähnlich ist es in der Studie von Niederstadt et al. 2012 in welcher mehrere immunogene Komponenten zu einer stärkeren Immunantwort führen. Außerdem demonstriert die Studie von Dai et al. 2013 eine erfolgreiche Generierung von IgY-Doppelantikörpern gegen die Rota- und die Noroviren. Rota- und Noroviren stellen die 2 wichtigsten Kandidaten bei den viralen Gastroenteritiden dar. Dai et al. 2013 entwickelten den IgY-Doppelantikörper durch die Immunisierung der Hühner mit einer bivalenten Vakzine P-VP8*, bestehend aus Norovirus P-Partikeln als

Träger für die VP8*-Oberflächenspikeproteine der RV. Ca. 45 mg IgY wurden aus jedem der präparierten Eier erhalten mit hohem Titer der anti-P-Partikel und der anti-VP8*-Antikörper, erfasst im ELISA, Western Blot und in einem Neutralisationstest (RV). Der Rückgang der RV-Replikation wurde beobachtet nach der IgY-Behandlung sowohl vor als auch nach der Inokulation in die Zellen, hinweisend darauf, dass IgY-Applikation sowohl therapeutische als auch prophylaktische Wirkungen bietet. Die Studiendaten suggerieren, dass auf P-VP8* basierte IgY-Ak könnten eine praktische Anwendung gegen beide Viren (Nora- und RV) ergeben (Dai et al. 2013).

Obwohl alle in meiner Arbeit untersuchten „gene gun“ Antikörper im ELISA und in der Immunhistochemie aktiv waren, ließ sich keine Aktivität im Neutralisationstest beobachten. Die Gründe dafür können unterschiedlich sein.

Eine Erklärung dafür ist, dass die Antikörper-Reaktion mit nur einem Virusprotein nicht in einer Virusneutralisation resultiert, obwohl VP7 eine wichtige Funktion in der Neutralisation erfüllt. Ludert et al. 2002 haben neutralisierende Ak gegen VP7 untersucht. Neutralisation wird als einer der Schlüsselmechanismen im durch Ak vermittelten Virusinhibierungsprozess aufgefasst. Es gibt mehrere Mechanismen mittels denen Ak die Viren inaktivieren. Diese sind Inhibierung des Virusanschluss an die Rezeptoren der Zielzelle und Inhibierung der post-Anschluss Prozesse. Die in der Studie von Ludert et al. 2002 benutzten monoklonalen Ak (mAk gegen Rotavirusproteine des äußeren Capsids, VP4 (VP8* und VP 5*) und VP7, haben neutralisierende Aktivität gezeigt. Die in vitro Löslichkeit des Außenkapsids induziert durch niedrige Ca²⁺-Konzentration konnte direkt mithilfe von mAk gegen VP7 verhindert werden, jedoch nicht durch mAk mit Spezifität gegen VP8* oder VP5*. Die Studienergebnisse weisen darauf hin, dass der Prozess ebenfalls in vivo abläuft. Die inhibitorische Aktivität von den anti-VP7 neutralisierenden mAk war abhängig von der Ak-Konzentration und von den bivalenten Ak-Bindungen. Diese Erkenntnis macht deutlich, dass Ak gegen das RV-Außenkapsidprotein VP7 neutralisieren die Virusinfektiosität durch Verhinderung der Decapsidation (Ludert et al. 2002).

Eine andere Erklärung dafür, dass die in der vorliegenden Arbeit erhaltene Ak keine Neutralisationsaktivität gezeigt haben, ist der niedrige Titer der gene gun generierten Antikörper. Ludert et al. 2002 haben z. B. gezeigt, dass die inhibitorische Aktivität des gegen VP7 gerichteten mAk eine eindeutige Dosisabhängigkeit hat. Sarker et Hammarström 2006 wiesen darauf hin, dass die passive Immuntherapie dosisabhängig

ist und haben in ihrer Studie mit Kindern herausgefunden, dass wahrscheinlich bei der RV-induzierten Diarrhö effektivere RV-Neutralisation durch höhere Ak-Titer erreicht werden kann.

Die Immunogenität des virulenten Virus ist sicherlich viel höher als die der gene gun applizierten Plasmide. Außerdem gibt es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dem Ak-Titer und der Zahl der Immunisierungen. Hühner 288/289 wurden 9 mal immunisiert mit einem Triple Antigen, wohingegen die Hühner 88-95 nur 5 Mal immunisiert wurden. So könnte man spekulieren, dass längere Immunisierungsperioden höhere Antikörpertiter ergeben und sich auch Eigenschaften bezüglich der Neutralisationsaktivität verändern. Zusätzlich lässt sich hier wiederholt beobachten, dass eine Immunisierung mit mehreren immunogenen Substanzen möglicherweise ebenfalls für höhere Ak-Titer verantwortlich sind.

Schließlich konnte bestätigt werden, dass die gene gun Immunisierung mit für VP4/VP6/VP7 codierenden Plasmiden in einer Aktivität im BRV ELISA und der BRV Immunhistochemie resultiert, jedoch aber nicht im Neutralisationstest.

Die Immunisierung mit dem Mix der für VP4/6/7 kodierender Plasmide ergab höhere Titer spezifischer Antikörper im ELISA als die für einzelne VP kodierender Plasmide. Wahrscheinlich wirken mehrere Komponenten immunmodulatorisch verstärkend aufeinander, im Sinne eines Adjuvans. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären ob bei der gene gun Immunisierung die Adjuvansanwendung eine herausragende Rolle spielt. Von Bedeutung ist auch die Adjuvansnatur. Eine weitere interessante Fragestellung, die auch unbedingt geklärt werden soll ist auch, ob ein Zusammenhang zwischen Neutralisationsaktivität und Antikörpertiter besteht.

8 Schlussfolgerung für die Zukunft

Aufgrund der Erfolge der IgY-Technologie ist davon auszugehen, dass weitere Studien zu intensiven und ausführlichen Untersuchung der IgY-Anwendung durchgeführt werden. Weiteres Optimieren der Haltungsbedingungen (Erhard et al. 2000), der Immunisierungsmethoden (Chang et al. 1999), der Wahl des Adjuvans (Wanke et al. 1996, Trott et al. 2008, Levesque et al. 2007), der Extraktionsmethode (Polson et al. 1980, Pauly et al. 2011, De Meulenaer & Huyghebaert 2001, Bizhanov and Vyshniauskis 2000, Stålberg and Larsson 2001), der Wahl der Enkapsulierung bei oraler therapeutischer/prophylaktischer IgY-Applikation (Akita & Nakai 2000, Xun et al. 2010) sind Vorsätze um die IgY-Technologie zu vervollkommen. Außerdem Weiterentwicklung der vielversprechenden gene gun Methode (Witkowski et. al 2009) und Einsatz der rekombinanten humanisierten IgY, in denen die konstante Domäne des IgY durch die korrespondierende Domäne der menschlichen Ak ersetzt ist. Diese rekombinanten humanisierten Ak wurden produziert, um Antikörper zu entwickeln, die alle immunologischen Vorteile der IgY erfüllen, jedoch besser für die Anwendung in vivo zu diagnostischen/therapeutischen Zwecken beim Mensch (Tsurushita et al. 2004) geeignet sind. Die Geschwindigkeit mit der IgY-Ak immer mehr Einsatzgebiete gewinnt, führt in näherer Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit zu ihrem universellen Einsatz in der medizinisch/veterinärmedizinischen Forschung und Praxis.

9 Literatur

Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolks: Isolation and purification. *Journal of Food Science* 1992;57:629-34.

Akita EM, Nakai S. Preparation of enteric-coated gelatin capsules of IgY with cellulose acetate phthalate. In: Sim JS, Nakai S, Guenter W, editors. *Egg nutrition and biotechnology*. New York: CAB Int; 2000. p. 301-10.

Ambrosius H. Developmental aspects of immunoglobulins and antibodies. *ALTEX*. 1996; 13:10-14.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:529-39.

Araujo AS, Lobato ZI, Chavez-Olortegui C, Velarde DT. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon*. 2010;55:739-44.

Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J Infect Dis*. 1980;142:439-41.

Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR, Moreira AR, Auza N, Mattion N, Micheo GL, La Torre JL, Scodeller EA. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 1990;22:130-6.

Bendali F, Bichet H, Schelcher F, Sanaa M. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet Res*. 1999a;30:61-74.

Bendali F, Sanaa M, Bichet H, Schelcher F. Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. *Vet Res.* 1999b;30:509-22.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2:1281-3.

Bizhanov G, Vyshniauskas G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet Res Commun.* 2000;24:103-13.

Blake MS, Johnston KH, Russel-Jones GJ, Gotschlich EC. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem.* 1984;136:175-9.

Bollen LS, Hau J. Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunised chickens. *In Vivo.* 1999;13:107-8.

Bridger JC. A definition of bovine rotavirus virulence. *J Gen Virol.* 1994;75:2807-12.

Burley RW, Cook WH. Isolation of avian egg yolk granules and their constituent alpha- and beta-lipovitellins. *Can J Biochem Physiol.* 1961;39:1295-307.

Carlander D, Stålberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci.* 1999;104:179-89.

Carlander D, Kollberg H, Wejåker P-E, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res.* 2000;21:1-6.

Carlander D. Avian IgY antibody. In vitro and in vivo. Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119; 2002. p. 1-53.

Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004;2:695-703.

Chacana PA, Terzolo HR, Gutierrez Calzado E, Schade R. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. Rev Med Vet. 2004;85:179-89.

Chalghoumi R, Beckers Y, Portelle D, Théwis A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnol Agron Soc Environ. 2009;13:295-308.

Chang HM, Qu-Yang RF, Chen YT, Chen CC. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against Streptococcus mutans serotype c in chicken egg yolk (IgY). J Agric Food Chem. 1999;47:61-6.

Chang HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. J Agric Food Chem. 2000;48:995-9.

Cho SH, Loewen PC, Marquardt RR. A plasmid DNA encoding chicken interleukin and Escherichia coli K88 fimbrial protein FaeG stimulates the production of anti K-88 fimbrial antibodies in chickens. Poult Sci. 2004;83:1973-8.

Chucrí TM, Monteiro JM, Lima AR, Salvadori ML, Kfoury JR Jr, Miglino MA. A review of immune transfer by the placenta. J Reprod Immunol. 2010;87:14-20.

Cohen J, Laporte J, Charpilienne A, Scherrer R. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.* 1979;60:177-86.

Cook ME, Trott DL. IgY: immune components of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. *World Poult Sci. J.* 2010;66:215-25.

Cornélissen G, Breus TK, Bingham C, Zaslavskaya R, Varshitsky M, Mirsky B, Teibloom M, Tarquini B, Bakken E, Halberg F. Beyond circadian chronorisk: worldwide circaseptan-circasemiseptan patterns of myocardial infarctions, other vascular events, and emergencies. *Chronobiologia.* 1993;20:87-115.

Dai YC, Zhang XF, Tan M, Huang P, Lei W, Fang H, Zhong W, Jiang X. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. *Antiviral Res.* 2013;97:293-300.

de Almeida CM, da Silva CL, Couto HP, Escocard Rde C, da Rocha DG, Sentinelli Lde P, Kipnis TL, da Silva WD. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon.* 2008;52:293-301.

De Ceuninck F, Pastoureau P, Aqnellet S, Bonnet J, Vanhouette PM. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40 (cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *J. Immunol Methods.* 2001;252:153-61.

De Meulenaer B, Huyghebaert A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. *Food Agric. Immunol.* 2001;13:275-88.

Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun.* 2009;33:1-23.

Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135:173-80.

Dimmock NJ. Neutralization of animal viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1993;183:1-149.

Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology.* 2000;277:420-28.

Ebina T, Tsukada K, Umezu K, Nose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol Immunol.* 1990;34:617-29.

Erhard MH, Özpınar H, Bilal T, Abbas Y, Kutay C, Eseceli H, Stangassinger M. The humoral immun response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages. *ATLA* 2000;28:699-705.

Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.* 2001;238:82-96, discussion 96-100.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA; 2001. p. 1747-85.

Estes MK. The rotavirus NSP4 enterotoxin: current status and challenges. In: Desselberger U, Gray J, editors. *Viral gastroenteritis,* Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands; 2003. p. 207-44.

Garaicoechea L, Bok K, Jones LR, Combessies G, Odeón A, Fernandez F, Parreño V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Vet Microbiol.* 2006;118:1-11.

Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 1990;4:2528-32.

Gilbert JM, Greenberg HB. Virus-like particle-induced fusion from without in tissue culture cells: role of outer-layer proteins VP4 and VP7. *J Virol.* 1997;7:4555-63.

Halberg F, Cornélissen G, Wang Z, Wan C, Ulmer W, Katinas G, Singh R, Singh RK, Singh RK, Gupta BD, Singh RB, Kumar A, Kanabrocki E, Sothern RB, Rao G, Bhatt ML, Srivastava M, Rai G, Singh S, Pati AK, Nath P, Halberg F, Halberg J, Schwartzkopff O, Bakken E, Governor Shri Vishnu Kant Shastri. Chronomics: circadian and circaseptan timing of radiotherapy, drugs, calories, perhaps nutraceuticals and beyond. *J Exp Ther Oncol.* 2003;3:223-60.

Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem.* 1990;54:2531-35.

Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993;57:450-4.

Hatta H, Mabe K, Kim M, Yamamoto T, Gutierrez MA, Miyazaki T. Prevention of fish disease using egg yolk antibody. In: Sim JS, Nakai S, editors. *Egg Uses and Processing Technologies, New Developments.* Oxon, UK: CAB Int; 1994. p. 241-9.

Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect

of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1997;31:268-74.

Hatta H, Kapoor MP, Juneja IR. Bioactive components in egg yolk. In: Mine Y, editor. *Egg Bioscience and Biotechnology*. Hoboken, NJ: John Wiley Sons, Inc; 2008. p. 185-237.

Hauri AM, Westbrock H-J, Bettge-Weller G. Rotavirus-Erkrankungen. Situation in Hessen und Einführung neuer Impfstoffe. *Hessisches Ärzteblatt* 2006;8:570-2.

Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol. Int.* 1999;16:581-622.

Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol.* 2000;74:228-36.

Hirai K, Arimitsu H, Umeda K, Yokota K, Shen L, Ayada K, Kodama Y, Tsuji T, Hirai Y, Oguma K. Passive oral immunisation by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. *Acta Med Okayama.* 2010;64:163-70.

Hodek P, Stiborova M. Chicken antibodies – Superior alternative for conventional immunoglobulins. *Proc. Indian natnl. Sci. Acad.* 2003;B69:461-8.

Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, Park CK, Kim M, Hatta H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. *J Dairy Sci.* 2004;87:4073-9.

Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:8701-4.

Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC, Yokoyama H, Kodama Y. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res*. 1992;53:2005-8.

Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, Icatlo FC Jr, Kuroki M, Yokoyama H, Kodama Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol*. 1997;58:105-11.

Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981;46:63-8.

Jin LZ, Baidoo SK, Marquardt RR, Fröhlich AA. In vitro inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;21:313-21.

Kazimierczuk K, Cova L, Ndeboko B, Szczyrk U, Targosz A, Brzowski T, Sirko A. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to *Helicobacter pylori* UreB in egg yolks. *Acta Biochim Pol*. 2005;52:261-6.

Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology*. 1992;24:384-6.

Klemperer F. Über natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 1893;31:356-82.

Klimentzou P, Paravatou-Petsotas M, Zikos C, Beck A, Skopeliti M, Czarnecki J, Tsitsilonis O, Voelter W, Livaniou E, Evangelatos GP. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides*. 2006;27:183-93.

Kohara J, Tsunemitsu H. Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. *J Vet Med Sci*. 2000;62:219-21.

Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejåker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol*. 2003;35:433-40.

Kovacs-Nolan J, Sasaki E, Yoo D, Mine Y. Cloning and expression of human rotavirus spike protein, VP8* in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:1183-1188.

Kovacs-Nolan J, Yoo D, Mine Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochem J*. 2003;376:269-75.

Kovacs-Nolan J, Mine Y. Avian egg antibodies : basic and potential applications. *Avian Poult Biol Rev*. 2004a;15:25-46.

Kovacs-Nolan J, Mine Y. Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnol*. 2004b;18:39-62.

Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;3:163-82.

Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*. 1985;54:755-62.

Königshoff M, Brandenburg T, Duszenko M. Immunsystem. In: Königshoff M, Brandenburg T, Duszenko M, Hrsgg. *Kurzlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2004. p. 323-57.

Krüger C, Pearson SK, Kodama Y, Vacca Smith A, Bowen WH, Hammaström L. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. *Caries Res*. 2004;38:9-14.

Kuroki M, Ikemori Y, Yokoyama H, Peralta RC, Icatlo FC, Kodama Y. Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Vet. Microbiol*. 1993;37:135-46.

Kuroki M, Ohta M, Ikemori Y, Icatlo FC Jr, Kobayashi C, Yokoyama H, Kodama Y. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. *Arch Virol*. 1997;142:843-51.

Labreque G, Bureau JP, Reinberg AE. Biological rhythms in the inflammatory response and in the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacol Ther*. 1995;66:285-300.

Larsson A, Sjöquist J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1990;13:199-201.

Larsson A, Balöw R-M, Lindahl TL, Forsberg P-O. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution – a review. *Poult Sci*. 1993;72:1807-12.

Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food. Agric. Immunol*. 1998;10:29-36.

LeClaire RD, Hunt RE, Bavari S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun.* 2002;70:2278-81.

Lee KA, Chang SK, Lee YJ, Lee JH, Koo NS. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J Biochem Mol Biol.* 2002a;35:488-93.

Lee YW, Jung T, Ahn KJ. Development and applications of anti-acne IgY containing anti-*P.acnes* and anti-*S.epidermis*. *Korean J. Invest. Dermatol.* 2002b;9:41-7.

Leslie GA, Martin LN. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken. *J Immunol.* 1973;110:1-9.

Levesque S, Martinez G, Fairbrother JM. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poult Sci.* 2007;86: 630-5.

Li XY, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, Li HQ, Lu YN, Zhen YH, Xu YP. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;129:132-6.

Lian B, Cheng A, Wang M, Zhu D, Luo Q, Jia R, Liu F, Han X, Chen X. Induction of immune responses in ducks with a DNA vaccine encoding duck plague virus glycoprotein C. *Virology.* 2011;8:214.

Li-Chan EYC, Powrie WD, Nakai S. The chemistry of eggs and eggs products. In: Stadelman WJ, Cotterill OJ, editors. *Egg Science and Technology*. The Hawroth Press, Inc., New York; 1995. p.105-175.

Liu S, Dong W, Kong T. Preparation and characterization of immunoglobulin yolk against the venom of *Naja naja atra*. *Indian J Exp Biol* 2010;48:778-85.

Lösch U, Schraner I, Wanke R, Jürgens L. The chicken egg, an antibody source. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1986;33:609-19.

Lösch U. How do the antibodies get into the chicken egg? *ALTEX*. 1996;13:15-17.

Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F. Antibodies to rotavirus outer capsid glykoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol*. 2002;76:6643-51.

Mahdavi M, Ebtekar M, Khorram Khorshid HR, Azadmanesh K, Hartoonian C, Hassan ZM. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. *Immunol Lett*. 2011;140:14-20.

Martella V, Bányai K, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 2006;20:509-19.

Matheis W, Schade R. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *J Immunol Methods* 2011;369:125-32.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, De Vos S, De Leener K, Ciarlet M, Buonavoglia C, Van Ranst M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol*. 2006;80:3801-10.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 2012;157:1177-82.

Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, Ramalingam S. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. *Toxicon*. 2008a;52:221-7.

Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, Ramalingam S. (2008b).

Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. *Int Immunopharmacol*. 2008b;8:1067-73.

Michael A, Meenatchisundaram S, Parameswari G, Subbraj T, Selvakumaran R, Ramalingam S. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J Sci Technol*. 2010;3:468-74.

Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food*. 2002;5:159-69.

Mitra AK, Mahalanabis D, Ashraf H, Unicomb L, Eeckels R, Tzipori S. Hyperimmune cow colostrum reduces diarrhoea due to rotavirus: a double-blind, controlled clinical trial. *Acta Paediatr*. 1995;84:996-1001.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzli H. Viren mit doppelsträngigem, segmentiertem RNA-Genom. In: Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzli H, Hrsgg. *Molekulare Virologie*. Spektrum akademischer Verlag: 2010. p. 370-9.

Mohammed SM, Morrison S, Wims L, Trinh KR, Wildeman AG, Bonselaar J, Etches RJ. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*. 1998;4:115-25.

Morrison SL, Mohammed MS, Wims LA, Trinh R, Etches R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into chicken egg yolk. *Mol Immunol*. 2002;38:619-25.

Narat M. Production of Antibodies in Chicken. *Food Technol. Biotechnol*. 2003;41:259-67.

Nelson R, Katayama S, Mine Y, Duarte J, Matar C. Immunomodulating effects of egg yolk low lipid peptic digests in a murine model. *Food Agric. Immunol*. 2007;18:15

Nguyen HH, Tumpey TM, Park HJ, Buyn YH, Tran LD, Nguyen VD, Kilgore PE, Czerkinsky C, Katz JM, Seong BL, Song JM, Kim YB, Do HT, Nguyen T, Nguyen CV. Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PloS One*. 2010;5: e10152

Niederstadt L, Hohn O, Dorner BG, Schade R, Bannert N. Stimulation of IgY in gene gun immunized laying hens by combined administration of vector DNA coding for the target antigen Botulinum toxin A1 and for avian cytokine adjuvants. *J Immunol Methods*. 2012;382:58-67.

Nikbath Brujeni G, Jalali SA, Koohi MK. Development of DNA-designed avian IgY antibodies for quantitative determination of bovine interferon-gamma. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163:338-45.

Nilsson E, Kollberg H, Johannesson M, Wejåker PE, Carlander D, Larsson A. More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the

prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case report. *J Med Food*. 2007;10:375-8.

Nilsson E, Larsson A, Olesen HV, Wejåker PE, Kollberg H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43:892-9.

Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 2005;10:43-52.

Okada N, Matsumoto Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Vet Microbiol*. 2002;84:297-305.

Otto, P. Bekämpfung bakterieller Infektionen- eine ständige Aufgabe des gesundheitlichen Verbraucherschutzes. Zoonosen der Wiederkäuer und respiratorische Erkrankungen bei Tieren. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. Springer Verlag. 2001;44:738-45.

Özpinar H, Erhard MH, Aytug N, Özpinar A, Baklaci C, Karamüptüoğlu S, Hofman A, Löscher, U. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. *Preventive Veterinary Medicine* 1996;27:67-73.

Pammi M, Haque KN. Oral immunoglobulin for the prevention of rotavirus infection in low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 11. Art. No.: CD003740. DOI: 10.1002/14651858.CD003740.pub2.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:565-72.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:304-6.

Parreño V, Béjar C, Vagnozzi A, Barrandeguy M, Constantini V, Craig MI, Yuan L, Hodgins D, Saif L, Fernández F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100:7-24.

Parreño V, Marcoppido G, Vega C, Garaicoechea L, Rodriguez D, Saif L, Fernández F. Milk supplemented with immune colostrum: protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;136:12-27.

Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Tel-Or S, Burstein Y, Schlechter I. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 1988;7:739-44.

Paul K, Manjula J, Deepa, EP, Selvanayagam ZE, Ganesh KA, Subba Rao PV. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon.* 2007;50:893-900.

Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult Sci.* 2009;88:281-90.

Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk bei polyethylene glycol (PEG) precepitation. JoVE. 2011;51. <http://www.jove.com/details.php?id=3084>, doi: 10.3791/3084

Pei J, Collisson EW. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus. Dev Comp Immunol. 2005;29:153-60.

Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun. 1980;9:475-93.

Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. Three-dimensional structure of rotavirus. J Mol Biol. 1988;20:269-75.

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. J Virol. 2004;78:10213-20.

Reynaud CA, Anquez V, Dahan A, Weill JC. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. Cell. 1985;40:283-91.

Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, Weill JC. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. Cell. 1987;48:379-88.

Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, Weill JC. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. Cell. 1989;59:171-83.

Reynaud CA, Anquez V, Weill JC. The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. Eur J Immunol. 1991;21: 2661-70.

Rose ME, Orleans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol.* 1974;4:521-3.

Ruggeri FM, Greenberg HB. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to the target cells in culture. *J Virol.* 1991;65:2211-9.

Russell WMS, Burch RL. *The principles of human experimental technique.* Methuen, London. 1959.

Saif LJ, Redman DR, Smith KL, Theil KW. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. *Infect Immun.* 1983;41:1118-31.

Saif LJ, Weilnau P, Miller K, Sitzlein L. Isotypes of intestinal and systemic antibodies in colostrum-fed and colostrum-deprived calves challenged with rotavirus. *Adv Exp Med Biol.* 1987;216B:1815-23.

Sanford JC. The biolistic process. *Trends Biotechnol.* 1988;6:299-302.

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Part Sci Technol.* 1987;27-37.

Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, Hammarström L. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32:19-25.

Sarker SA, Hammarström L. Egg-yolk Antibodies (IgY) in human enteric infections: future prospects. In: Sim JS, Sunwoo HH, editors. *The amazing egg.* Library of

Congress Cataloging-in-Publication Data, University of Alberta, Canada; 2006. p. 405-13.

Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim.* 2005;33:129-54.

Schade R, Hlinak A. Egg yolk antibodies, state of art and future prospects. *ALTEX.* 1996;13:5-9.

Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staak C. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology. *Springer Lab Manuals*, Berlin, Heidelberg New York; 2001, p. 1-255.

Schade R, Zhang X-Y, Terzolo HR. Use of IgY antibodies in human and veterinary medicine. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive egg compounds*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007. p. 213-22.

Schade R, Chacana PA. Livetin Fractions (IgY). In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive egg compounds*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007a. p. 25-32.

Schniering A, Schade R, Hiepe T. Development of an IgY-based assay for the detection of ascaris-suum-antigens. *ALTEX.* 1996;13:62-65.

Schwermer H-P. Feldversuch zum Einfluß eines Volleipulvers mit coronavirusspezifischen Antikörpern auf die Kälberdiarrhöe und deren blutchemische Folgen. *Inaugural-Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany; 2002.

Sharma JM. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hung.* 1997;45:229-38.

Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S. Anti-E.coli immunoglobulin Y isolated from egg yolks of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food. Sci.* 1988;53:1360-8.

Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K, Hatta H. (1992). Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992;56:270-4.

Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp Biochem Physiol B.* 1993;106:255-61.

Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, Suzuki T. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *J. Food. Sci.* 1994;59:763-72.

Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9: 1061-6.

Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H. pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol.* 2003;52:217-22.

Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of *H. pylori* urease. *J Med Microbiol.* 2004;53:31-4.

Staak C. Egg yolk Antibodies (IgY) in Routine Diagnostic Work. *ALTEX.* 1996;13:73-5.

Stålberg J, Larsson A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. Ups J Med Sci. 2001;106:99-110.

Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Commun Mass Spectrom: RCM. 2001;15:708-12.

Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson SO. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. Prev Vet Med. 2003;58:179-97.

Tan SH, Mohamedali A, Kapur A, Lukjanenko L, Baker MS. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. J Immunol Methods 2012;380:73-6.

Tesar DB, Cheung EJ, Bjorkman PJ. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. Mol Biol Cell. 2008;19:1587-93.

Thalley BS, Carroll SB. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. Biotechnology (N Y). 1990;8:934-8.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. J Clin Chem Clin Biochem. 1989;27:495-501.

Tressler RL, Roth TF. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. J Biol Chem. 1987;262:15406-12.

Trott DL, Hellestad EM, Yang M, Cook ME. Additions of killed whole cell bacteria preparations to Freund complete adjuvant alter laying hen antibody response to soluble protein antigen. *Poult Sci.* 2008;87:912-7.

Tsunemitsu H, Shimizu M, Hirai T, Yonemichi H, Kudo T, Mori K, Onoe S. Protection against bovine rotaviruses in newborn calves by continuous feeding of immune colostrum. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1989;51:300-8.

Tsurushita N, Park M, Pakabunto K, Ong K, Avdalovic A, Fu H, Jia A, Vàsquez M, Kumar S. Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody. *J Immunol Methods.* 2004;295:9-19.

Vega C, Bok M, Chacana P, Saif L, Fernandez F, Parreño V. Egg yolk IgY: Protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;142:156-69.

Wanke R, Schmidt P, Erhard MH, Sprick-Sanjose Messing A, Stangassinger M, Schmahl W, Hermanns W. [Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction]. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1996;43:243-53.

Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today.* 1995;16:392-8.

West AP, Herr AB, Bjorkmann PJ. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A₂ receptor homolog. *Immunity.* 2004;20:601-10.

Williams RS, Johnston SA, Riedly M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JS. Introduction of foreign genes into tissue of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2726-30.

Witkowski PT, Bourquain DR, Hohn O, Schade R, Nitsche A. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. *J Immunol Methods*. 2009;341:146-53.

Woode GN, Bridger JC, Jones JM, Flewett TH, Davies HA, Davis HA, White GB. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals. *Infection and immunity* 1976;14:804-10.

Worledge KL, Godiska R, Baret TA, Kink JA. Oral administration of avian tumor necrosis factor antibodies effectively treats experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2000;45:2298-2305.

Xu YP, Zou WM, Zhan XJ, Yang SH, Xie DZ, Peng SL. Preparation and determination of immunological activities of anti-HBV egg yolk extraction. *Cell Mol Immunol*. 2006;3:67-71.

Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol Adv*. 2011;29:860-8.

Xun Z, Li-Yang G, Zhibang Y, Xiaoping C. Protective effects of sucralofate on Anti-H. pylori VacA IgY in vivo and in vitro. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2010;4:1091-9.

Yeager M, Berriman JA, Baker TS, Bellamy AR. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO J.* 1994;13:1011-8.

Yegani M, Korver DR. Applikation of egg yolk antibodies as replacement for antibiotics in poultry. *World Poult Sci J.* 2010;66:27-37.

Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sendo S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun.* 1992;60:998-1007.

10 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Viktoriya Tokaryeva, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Produktion von aviären Antikörpern (IgY) gegen virulente bovine Rotaviren B223 (G10P[11]) und gegen Plasmide, kodierend für RV-Proteine mit dem Ziel zur Anwendung als therapeutische/prophylaktische Antikörper bei Durchfallerkrankungen in der Kälberaufzucht“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Rüdiger Schade, der mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand und viel von seiner Zeit für mich opferte. Dank seiner enthusiastischen Betreuung und der wertvollen Ratschlägen ist diese Dissertation möglich geworden.

Ich danke Herrn Dr. Niederstadt und Herrn Dr. Hohn für viele relevante und anregende Diskussionen während der experimentellen Arbeit (ELISA und Western Blot) im Robert-Koch-Institut Berlin. Ebenfalls möchte ich mich gern bei Frau Dr. Diedrich und Herrn Dr. Mas Marques für deren Unterstützung bei dem Neutralisationstest bedanken. Ich bin sehr dankbar auch Frau Beate Diemar für ihre Unterstützung bei dem Erlernen verschiedener experimenteller Methoden in unserem Labor (Pharmakologie Institut an der Charité Berlin) und den Kollegen aus FEM und BfR für die Tierhaltung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Vahlenkamp für die Bereitstellung der Viren.

Ich danke den Kollegen von INTA Castelar und INTA Balcarce, Argentinien für die lehrreichen Diskussionen und den Erfahrungsaustausch.

Ich danke allen Beteiligten für die angenehme Zusammenarbeit, Umsicht und Aufmerksamkeit, für die bereitgestellten Materialien und Reagenzien.

Sehr großer Dank geht auch an meine Mutter für die moralische Unterstützung und Motivation.