

## 6. Zusammenfassung

### S. Frink: Experimentelle Mucosal Disease: Veränderungen in der Verteilung der Lymphozytensubtypen in Tonsille, Lymphknoten, Peyerschen Platten und Darmschleimhaut von Rindern in der Frühphase der Erkrankung

Die Mucosal Disease (MD) des Rindes, als eine Folge der Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV), verläuft tödlich. Zuvor kommt es im Verlauf der Erkrankung zu hochgradigen Gewebeveränderungen in den Lymphorganen einschließlich des Darmschleimhautimmunsystems sowie der Dünn- und Dickdarmschleimhaut. Der Nachweis des zytopathogenen (zp) BVDV korreliert mit dem Auftreten der Gewebealterationen in den verschiedenen Lymphorganen und der Darmschleimhaut. Da der zp Biotyp des BVDV in der Zellkultur morphologische Veränderungen auslöst, die für das Vorliegen von Apoptose typisch sind und bei ultrastrukturellen Untersuchungen der Darmschleimhaut und Peyerschen Platten von Rindern mit experimentell induzierter Mucosal Disease vermehrt Apoptosen nachgewiesen werden konnten; kann von einem direkten schädigenden Einfluß des zp BVDV ausgegangen werden. Darüberhinaus können Apoptosen aber auch durch Zellen des Immunsystems ausgelöst werden.

Mit den vorliegenden Untersuchungen an den Tonsillen, den Nil. caecales, den Peyerschen Platten im Jejunum und Ileum sowie der Dünn- und Dickdarmschleimhaut sollten Hinweise gewonnen werden, ob immunvermittelte Vorgänge an der Entwicklung der Gewebeveränderungen beteiligt sind.

Da die mit den Gewebeveränderungen assoziierten Apoptosen besonders in der frühen Phase der MD nachgewiesen werden können, wurden neben moribunden Rindern persistierend virämische Tiere in der Frühphase der experimentell induzierten MD, vor dem Auftreten klinischer Symptome, die in definierten Abständen am Tag 5, 7 und 9 nach der Inokulation von zp BVDV getötet worden waren, ausgewählt. Drei Tiere aus denselben Herden, die mit azp BVDV persistierend virämisch waren, dienten als Kontrollen.

Von den gewonnenen Gewebeproben wurden Kryostatschnitte hergestellt, anhand derer IgM<sup>+</sup> und IgA<sup>+</sup> B-Lymphozyten, IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Plasmazellen, BoCD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sowie BoCD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in den Geweben dargestellt werden konnten. Nachfolgend wurden Anzahl und Verteilung dieser Lymphozytensubtypen semiquantitativ erfaßt und ausgewertet.

Die Befunde zur Morphologie der Gewebe sowie die Anzahl und Verteilung dieser Lymphozytenpopulationen in Tonsille, Nil. caecales, Peyerschen Platten im Jejunum und Ileum sowie der Dünn- und Dickdarmschleimhaut der persistierend virämischen Tiere stimmte mit

den Ergebnissen bei Untersuchungen von Rindern, die nicht mit BVDV infiziert sind, überein. Bei den Rindern mit experimentell induzierter MD war zp BVDV vorzugsweise in Lymphfollikeln der Lymphorgane, vor allem aber in den Peyerschen Platten im Jejunum und Ileum, vorhanden. Das Antigen konnte in unterschiedlichem Grad zunächst in einzelnen Zellen mit dendritischer Morphologie, später diffus in den Lymphfollikeln nachgewiesen werden. In den Peyerschen Platten im Jejunum und Ileum konnte das zp BVDV-Antigen in besonders großer Intensität nachgewiesen werden. Synchron mit dem Nachweis des zp BVDV-Antigens konnte ein Verlust der B-Lymphozyten und der Zonierungen der Lymphfollikel festgestellt werden. Bereits zu dem Zeitpunkt als wenig zp BVDV-Antigen in Zellen mit dendritischer Morphologie vorhanden waren, nahm die Anzahl der BoCD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Regionen, in denen zp BVDV-Antigen lokalisiert war, zu. Ein Anstieg der Bo CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten war erst zeitlich versetzt zu bemerken.

In der Darmschleimhaut konnte zp BVDV zeitlich verzögert zu dem Auftreten in den Lymphorganen festgestellt werden. Abweichend von der Entwicklung in den Lymphorganen blieb die Anzahl BoCD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lamina propria unverändert, als einzelne Kryptepithelzellen Antigen des zp BVDV enthielten. Sie stieg erst zu einem Zeitpunkt (Tag 9 nach der Inokulation) an, zu dem das zp BVDV-Antigen in zahlreichen Epithelzellen in Gruppen von Krypten vorhanden war. Zeitgleich mit der Zunahme des zp BVDV-Antigens in dieser Form, war eine deutliche Abnahme der IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Plasmazellen festzustellen. Die Abnahme ist als Folge der Depletion der B-Lymphozyten in den Lymphfollikeln der Peyerschen Platten, die die Vorläuferzellen für die IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Plasmazellen darstellen, zu betrachten. Darüber hinaus war in den Regionen in denen zp BVDV in den Kryptepithelien nachweisbar war, ein Verlust des IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Niederschlages im Zytoplasma und auf dem luminalen Saum der Kryptepithelzellen zu beobachten. Der Verlust des IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Präzipitates wurde als Auswirkung der direkten Schädigung des zp BVDV gesehen, kann aber außerdem auf der Verminderung der Immunglobulin-sezernierenden IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Plasmazellen basieren. Erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Erkrankung konnte auch eine Reduktion der intraepithelialen BoCD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beobachtet werden.

CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nehmen nicht nur eine Helferfunktion gegenüber den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und B-Lymphozyten wahr, sondern üben ebenfalls zytotoxische Wirkungen auf Gewebe aus. Die von löslichen immunmodulierenden Substanzen stimulierten T-Helferzellen exprimieren dabei das Fas-Liganden-Membranprotein und können auf diese Weise mit dem auf einer Zielzelle induzierten Fas-Molekül interagieren und diese über die Induktion der Apoptose zerstören. Aus den vorliegenden Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Mechanismen bei der Entstehung der MD beteiligt sind.

## 7. Summary

**S. Frink: Experimental mucosal disease in cattle: changes in the distribution of lymphocyte subsets in tonsils, lymph nodes, Peyer's patches and in the mucosa of small and large intestine in the early phase of disease.**

Mucosal Disease (MD) in cattle is one consequence of the infection with Bovine Virus Diarrhea virus (BVDV). It develops only in animals persistently infected with non cytopathogenic (ncp) BVDV. When these animals are infected with an antigenically homologous cytopathic (cp) BVDV, they become moribund within 2 to 3 weeks. During the course of the disease, severe depletion of the lymphoid tissues and erosions and ulcerations in the digestive tract occur. Initial alterations which are characterized by increased apoptotic cell death are associated with the presence of antigen of the cp BVDV. Cp BVDV has been shown to induce apoptosis in permissible bovine cells in culture. Therefore it appears likely that the tissue alterations in MD are caused by the cp BVDV directly. On the other hand apoptosis can also be initiated by cells of the immune system.

The present study was performed to investigate whether immune-mediated reactions contribute to the development of tissue alterations in the tonsils, Nil. caecales, Peyer's patches in jejunum and ileum as well as in the small and large intestinal mucosa. Since increased apoptosis is especially marked in the early lesions, cattle in the early phase of MD, before the onset of clinical signs, which were euthanized at days 5, 7 and 9 post inoculation (pi) with cp BVDV were included in addition to moribund animals at days 11, 13 and 14 pi and clinically healthy persistently viremic animals which served as controls.

Antigen of the cp BVDV, IgM<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> B-lymphocytes, IgM<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> plasma cells, BoCD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, BoCD8<sup>+</sup> T-lymphocytes as well as  $\gamma\delta$  T-lymphocytes were identified in consecutive cryostat sections using monoclonal antibodies in the indirect immunoperoxidase method. The distribution and quantity of the viral antigen and the lymphocyte subtypes were evaluated semiquantitatively.

Tissue morphology and the quantity and distribution of the lymphocyte subtypes in the clinically healthy persistently viremic control animals was in accordance with published data for cattle not infected with BVDV. In the animals with experimentally induced MD, cp BVDV was predominantly present in the lymphoid follicles of all lymphoid tissues examined. Antigen was first detected in/on single cells with dendritic morphology and a few lymphocytes. During the course of disease it spread throughout the follicular centres. As soon as cp BVDV was present in the lymphoid follicles, a loss of B-lymphocytes and an

increasing loss of follicular structure was observed. At the time when antigen of the cp BVDV was present in a few cells, the number of BoCD4+ T-lymphocytes was increased in those areas where zp BVDV was present. An increase in the number of BoCD8+ T-lymphocytes occurred with some delay.

In the intestinal mucosa antigen of the cp BVDV was found with some delay compared to the lymphoid tissues. In contrast to the lymphoid tissues, the number and distribution of BoCD4+ T-lymphocytes in the lamina propria of the intestine remained unchanged, when antigen of the cp BVDV was present in single crypt epithelial cells. Their number was increased only when antigen of the cp BVDV could be demonstrated in numerous epithelial cells in groups of crypts (day 9 pi). At the same time a distinct decrease of IgA+ and IgM+ plasma cells was found. This decrease is most likely due to the severe depletion of lymphoid follicles in the Peyer's patches, because B-lymphocytes produced there are known to be precursors for IgA+ and IgM+ plasma cells in the mucosa. In addition a loss of IgA and IgM precipitate was observed in the cytoplasm and at the luminal surface of the crypt epithelial cells in crypt where cp BVDV was present. This was interpreted as direct damage of the infected cells by cp BVDV, although it might have been enhanced by the decreased number of immunoglobulin-secreting IgA+ and IgM+ plasma cells. A reduced number of BoCD8+ T-lymphocytes was observed at a more advanced phase of the disease.

CD4+ T-lymphocytes are not only helper cells for CD8+ T-lymphocytes and B-lymphocytes, but may also mediate cytotoxic effects. T helper cells can be induced by soluble immunomodulating substances to express the Fas-ligand membrane protein. When this binds to a Fas molecule on a target cell, it might induce apoptosis of the target cell. Based on the present investigation the hypothesis is proposed that this cell-mediated mechanism contributes to the tissue destruction in MD.