

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Konzentration von Trächtigkeits-assoziierten  
Glykoproteinen sowie der Immunglobuline IgG und  
IgM im postpartalen Zeitraum bei Schafen und  
Ziegen unterschiedlicher Nutzungsrichtungen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
Bianca Wiebusch  
Hamburg

Hannover 2019

Anlage 5b: § 9 Abs. 1 PromO – Rückseite von 5a

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Gerhard Breves

Physiologisches Institut

Prof. Dr. Matthias Gaily

Freie Universität Bozen

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Breves

2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Sieme

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2019

<b>1</b>	<b>Inhalt</b>	
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>3</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>4</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>vi</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung und Literaturübersicht</b> .....	<b>1</b>
5.1	Die Trächtigkeit bei kleinen Wiederkäuern.....	1
5.1.1	Fortpflanzungszyklus und Zucht reife .....	1
5.1.2	Etablierung der Gravidität .....	2
5.1.3	Plazentation .....	2
5.2	Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine .....	4
5.2.1	Historische, phylogenetische und biochemische Einordnung .....	4
5.2.2	Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine bei Wiederkäuern .....	5
5.2.3	Nachweis von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen.....	6
5.2.4	Mögliche Funktionen von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen ....	8
5.2.5	Einflüsse auf die Konzentration von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen .....	8
5.3	Immunsystem.....	9
5.3.1	Angeborenes Immunsystem .....	10
5.3.2	Erworbenes Immunsystem .....	12
5.3.3	Nachweismöglichkeiten von Immunglobulinen .....	17
5.3.4	Peripartale Immunität.....	18
5.3.5	Neonatale Immunität und Kolostrum.....	19
5.4	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit .....	21
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
6.1	Versuchstiere .....	23
6.2	Probenentnahme.....	23
6.2.1	Entnahmetechnik und Probenverarbeitung.....	24
6.3	Laboruntersuchungen .....	25

6.3.1	Methodische Vorarbeiten .....	25
6.3.2	Inter-Assay-Varianz .....	25
6.3.3	Intra-Assay-Varianz .....	26
6.4	ELISA-Protokolle .....	26
6.4.1	Immunglobulin G (Ziege) .....	26
6.4.2	Immunglobulin M (Ziege) .....	27
6.4.3	Immunglobulin G (Schaf) .....	27
6.4.4	Immunglobulin M (Schaf) .....	27
6.4.5	Verdünnungsreihe .....	29
6.5	ELISA zum Nachweis Trächtigkeits-assoziiertes Glykoproteine .....	29
6.6	Statistische Methoden .....	31
<b>7</b>	<b>Zur Veröffentlichung vorbereitete Manuskripte .....</b>	<b>32</b>
7.1	Concentrations of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and immunoglobulins G and M in plasma of post partum dairy and meat goats and their offspring .....	32
7.1.1	Abstract .....	32
7.1.2	Introduction .....	33
7.1.3	Material and Methods .....	35
7.1.4	Results .....	38
7.1.5	Discussion .....	46
7.2	Post partum pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and immunoglobulin G and M plasma concentration in sheep and their offspring: comparison of two different breeds .....	50
7.2.1	Abstract .....	50
7.2.2	Introduction .....	51
7.2.3	Material and Methods .....	54
7.2.4	Results .....	57
7.2.5	Discussion .....	62
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>

8.1	Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine .....	65
8.1.1	Nutzen der Bestimmung der Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteine	65
8.1.2	Messmethoden für Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine .....	66
8.1.3	Messzeitraum und Einordnung der Ergebnisse .....	66
8.2	Immunglobuline G und M .....	69
8.2.1	Etablierung der Messmethode .....	69
8.2.2	Immunglobuline G und M im postpartalen Zeitraum .....	71
8.3	Peripartale Immunität und Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine .....	72
8.4	Methodenkritik .....	75
8.4.1	Verwendete Tiere .....	75
8.4.2	Labormethoden .....	75
8.5	Fazit und Ausblick .....	76
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>90</b>
10.1	Material und Reagenzien: ELISA zum Nachweis Trächtigkeits-assoziiertes Glykoproteine .....	90
10.1.1	Verdünnungsreihe Standard .....	90
10.1.2	Reagenzien .....	90
10.1.3	Antikörper .....	92
10.1.4	Material .....	92
10.2	Reagenzien & Material: ELISA zum Nachweis von Immunglobulin G und M 92	
10.2.1	Antikörper .....	92
10.2.2	Reagenzien .....	93
10.2.3	Material .....	94
10.3	Rohdaten Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine .....	95
10.3.1	Schafmüttern .....	95
10.3.2	Schafklämmer .....	96
10.3.3	Ziegenmüttern .....	97

10.3.4	Ziegenlammer .....	98
10.4	Rohdaten Immunglobulin G und M .....	99
10.4.1	Schafmuttern IgG .....	99
10.4.2	Schaflammer IgG .....	100
10.4.3	Ziegenmuttern IgG .....	101
10.4.4	Ziegenlammer IgG .....	102
10.4.5	Ziegenmuttern IgM .....	103
10.4.6	Ziegenlammer IgM .....	104
<b>11</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>12</b>	<b>Summary .....</b>	<b>107</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>109</b>

## 2 Abkurzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$ <i>Mikrogramm</i>	ml <i>Milliliter, Siehe</i>
BSA <i>Bovines Serum-Albumin</i>	mm <i>Millimeter</i>
CD <i>cluster of differentiation</i>	ng <i>Nanogramm</i>
EDTA <i>Ethylendiamintetraacetat</i>	NKZ <i>Naturliche Killer-Zellen</i>
ELISA <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	p.ov. <i>post ovulationem</i>
Fab <i>Fragment antigen-binding</i>	P50 <i>Median</i>
Fc <i>Fragment crystalline</i>	PAG <i>pregnancy-associated glycoproteins</i>
GALT <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>	PAMP <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
IFN <i>Interferon</i>	PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> <i>Prostaglandin-F-2alpha</i>
Ig <i>Immunglobulin</i>	PRR <i>pattern-recognition-receptors</i>
IL <i>Interleukin</i>	PSPB <i>pregnancy-specific protein B</i>
kg <i>Kilogramm</i>	RIA <i>Radioimmunoassay</i>
MHC <i>Major Histocompatibility Complex</i>	rpm <i>rounds per minute</i>

SDS-Page *sodium dodecyl sulfate*  
*polyacrylamid gel electrophoresis*  
 TGF *Transforming growth factor*

TLR *Toll-like receptors*  
 TMB *Tetramethylbenzidin*

### 3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 IgG-Molekül, schematische Darstellung (eigene Grafik) .....	15
Abbildung 2 Probenentnahmeplan .....	24
Abbildung 3 Blocking-Versuch IgM-ELISA .....	28
Abbildung 4 Standardwerte Messkurve für PAG-ELISA.....	31
Abbildung 5 Median PAG concentration of Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn Does (N=11, full line), asterisks mark significant ( $p < 0,05$ ) differences within each sampling time .....	39
Abbildung 6 Median PAG-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisks mark significant differences within each sampling time.....	40
Abbildung 7 Median IgG-concentrations in Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn does (N=11, full line).....	42
Abbildung 8 Median IgG-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisk marks significant difference ( $p < 0.05$ ) on day 26.....	43
Abbildung 9 Median IgM-concentrations in Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn does (N=11, full line), asterisks mark significant ( $p < 0.05$ ) differences within each sampling time .....	44
Abbildung 10 Median IgM-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisks mark significant differences ( $p < 0,05$ ) .....	45
Abbildung 11 Median PAG concentration of Friesian sheep ewes (N=12, dotted line) and Black-headed mutton sheep ewes (N=14, full line), asterisks mark significant ( $p < 0.05$ ) differences within each sampling time .....	58

Abbildung 12 Median PAG-concentrations in Friesian lambs (N=19, dotted line) and Black-headed mutton lambs (N=22, full line), asterisk marks significant ( $p < 0.05$ ) difference .....	59
Abbildung 13 Median IgG-concentrations in Friesian sheep ewes (N=12, dotted line) and Black-headed mutton sheep ewes (N=14, full line), asterisk marks significant ( $p < 0.05$ ) difference on day 25.....	60
Abbildung 14 Median IgG-concentrations in Friesian sheep lambs (N=19, dotted line) and Black-headed mutton sheep lambs (N=22, full line).....	61

## 4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Referenzwerte für Immunglobuline bei Schaf und Ziege nach verschiedenen Autoren.....	18
Tabelle 2 Verdünnungsstufen der Plasmen, IgG und IgM-ELISA .....	29
Tabelle 3 Average PAG, IgG and IgM concentrations in unsuckled goat kids on the day of parturition compared to kids having uptaken colostrum .....	43
Tabelle 4 Average PAG and IgG concentrations in lambs on the day of parturition with and without colostrum uptake prior to sampling.....	61

## **5 Einleitung und Literaturübersicht**

### **5.1 Die Trächtigkeit bei kleinen Wiederkäuern**

#### **5.1.1 Fortpflanzungszyklus und Zuchtreife**

Bei Schaf und Ziege dauert die Trächtigkeit durchschnittlich 150 Tage. Sie gehören zumeist zu den saisonal polyöstrischen Tieren: Ihr Sexualzyklus ist abhängig von der Photoperiode und dem dadurch in unterschiedlicher Menge gebildeten Melatonin. Sie zyklisieren vorzugsweise ab Herbst, wenn die Tage kürzer werden (short day breeders). Moduliert werden kann diese Saisonalität durch Fütterungsregime, Umgebungstemperatur, Laktationsperiode und den Kontakt zum anderen Geschlecht. Schafe- und Ziegenrassen aus gemäßigten Breiten und Höhenlagen weisen meist eine stärker ausgeprägte Saisonalität auf als solche aus subtropischen und tropischen Regionen (Poulton, 1987). Bei Burenziegen in Südafrika oder den Niederlanden wird z.B. durch eine reichliche Fütterung und das Absetzen der Lämmer mit 6 Wochen eine durchgehende Zyklusaktivität unterstützt. Das Einbringen eines Bockes in die Herde führte dann innerhalb von 8 Tagen wieder zu einem Östrusgeschehen bei den weiblichen Ziegen. So werden zwei Geburten in einem Jahr oder drei Geburten in zwei Jahren erreicht (Casey u. Van Niekerk, 1988). Auch Australische Merinoschafe und einige mediterrane Schafrassen zeigen eine (beinahe) durchgängige Paarungsbereitschaft (Rosa u. Bryant, 2003), und bei vielen Zwergziegen sieht man ebenfalls eine asaisonale Fortpflanzung.

Weibliche Tiere erreichen die Fortpflanzungsfähigkeit mit etwa sechs, die Zuchtreife mit ca. neun Monaten (Busch, 2009), wobei beides stark von der jeweiligen Rasse abhängt. Der Zyklus des weiblichen Schafes dauert durchschnittlich 17 Tage (Entrican u. Wheelhouse, 2006), die Brunst zwischen 16 und 36 Stunden (Busch, 2009). Die Ovulation findet gegen Ende der Brunst statt. Bei weiblichen Ziegen ist der Zyklus mit 20-21 Tagen etwas länger, die Brunst dauert 24-48 Stunden. Auch hier findet die Ovulation gegen Ende der Brunst statt (Meinecke, 2015).

Die Befruchtung der weiblichen Tiere kann im Natursprung erfolgen oder via künstliche Besamung erreicht werden. Für letzteres werden Suchböcke eingesetzt, um den optimalen Zeitpunkt für die Besamung festzustellen (Busch, 2009).

### 5.1.2 Etablierung der Gravidität

Findet in einem Ovulationszyklus keine Befruchtung statt, kommt es mittels Prostaglandin-F ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) zur Luteolyse und damit zur Initiation eines neuen Zyklus. Dies geschieht bei Wiederkäuern an Tag 14-16 post ovulationem (p.ov.), die Implantation aber erst an Tag 16-18 (Spencer et al., 2004). Somit ist ein fetales Signal notwendig, um die Luteolyse zu verhindern: Mononukleäre Trophoblastenzellen sezernieren Interferon  $\tau$ , auch ovines Trophoblastin genannt, das die luteolytische Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  verhindert (Bazer et al., 2009). Dies geschieht beim Schaf ab Tag 12 p.ov. und ist bis Tag 23 p.ov. nachweisbar. Auch für Rinder und Ziegen wurden vergleichbare Trophoblastenproteine nachgewiesen (Raheem, 2015; Miyazaki et al., 2002). Der Gelbkörper wird daraufhin zum *Corpus luteum graviditatis* umgeformt und produziert weiterhin trächtigkeitserhaltendes Progesteron (Meinecke, 2015).

Ein funktionierendes *Corpus luteum graviditatis* ist bei Rind und Ziege während der gesamten Trächtigkeit erforderlich. Schafe hingegen benötigen es nur bis Tag 55 der Gravidität, danach kann der Uterus mit seiner Progesteronproduktion die Trächtigkeit von selbst aufrechterhalten. Das vom *Corpus luteum graviditatis* ausgeschüttete Progesteron senkt die Reizbarkeit des Uterus während der gesamten Trächtigkeit und verhindert so eine vorzeitige Expulsion des Fetus (Meinecke, 2015).

### 5.1.3 Plazentation

Die Implantation vollzieht sich über mehrere Schritte von Vorkontaktstadium über die Apposition bis zur Adhäsion. Im Stadium der Adhäsion ist eine Trennung der fetalen und maternalen Anteile der Plazenta ohne Gewebeverlust nicht mehr möglich (Schnorr u. Kressin, 2011).

Wiederkäuer verfügen über eine epitheliochoriale Plazenta, das bedeutet, dass alle ursprünglich gegebenen Gewebsschichten noch vorhanden sind (maternales Gefäßendothel, Uterusepithel, Trophoblastenepithel und fetales Gefäßendothel, einschließlich Basalmembranen). Bei anderen Tierarten kommt es hingegen zu Einschmelzungen von Membranen; bei der invasivsten Form, der hämochorialen Plazenta der Nager und Primaten, liegen die Chorionzotten direkt am mütterlichen Blutstrom (Schnorr u. Kressin, 2011).

Die Plazentome der Wiederkäuerplazenta bestehen aus den fetalen Kotyledonen und den maternalen Karunkeln. Ihre Oberfläche wird durch die Bildung sogenannter Villi, also eine Auffaltung der Schleimhaut, vergrößert; hier findet der Stoffaustausch zwischen Muttertier und Fetus statt. Durch eine ansatzweise Auflösung des maternalen Kryptenepithels kommt es im Laufe der Trächtigkeit zur Bildung einer syndesmochorialen Plazenta, fetale Trophoblastenzellen migrieren ins maternale Endometrium und bilden dort bi- und trinukleäre Syncytien (Entrican u. Wheelhouse, 2006).

#### *5.1.3.1 Plazentafunktionen*

Die Plazenta dient der Thermoregulation des Embryos, dem Stofftransport und der Produktion wichtiger Hormone wie z.B. Progesteron, Prolaktin und Östrogenen (De Sousa et al., 2008). Sie schützt die Frucht vor Giften und führt ihr alle notwendigen Stoffe zu. Dies geschieht vor allem über Diffusion, aber auch über aktive Transportsysteme. Für Lipide und große Proteine ist die Plazenta hingegen undurchlässig (Meinecke, 2015). In welchem Maße verschiedene Stoffe die Plazenta passieren können, ergibt sich auch aus der Invasivität, also dem Maße der Gewebeseinschmelzung während der Plazentation. So ist die Wiederkäuerplazenta vergleichsweise wenig durchlässig. Die Kenntnis der Tierartspezifika erlaubt hier eine Einschätzung zum diaplazentaren Transport von z.B. Immunglobulinen, aber auch Arzneimitteln (Schnorr u. Kressin, 2011).

Eine besondere Form des diaplazentaren Transports erfolgt über die binukleären Zellen: Es handelt sich um unvollständig geteilte, fetale Trophoblastenzellen, die während der Trächtigkeit zur maternalen Seite der Plazenta migrieren und mit dem

Uterusepithel zu Syncytien verschmelzen. Sie transportieren und/oder produzieren Laktogene, Östrogene, Progesteron und Prostaglandin (Beckers et al., 1998). Außerdem sind sie wichtig für die Produktion von Pregnancy-associated glycoproteins (PAG), auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

## **5.2 Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine**

Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine oder auch PAG sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die sich strukturell den Aspartat-Proteasen zuordnen lassen. Sie zeigen Ähnlichkeiten mit Pepsinogen und Cathepsin D und E, sind allerdings größtenteils enzymatisch inaktiv (Xie, 1994). Nur für einige wenige wurde bisher eine proteolytische Aktivität nachgewiesen (Telugu u. Green, 2008).

Als weitere Bezeichnung firmiert außerdem PSPB (pregnancy-specific protein B) (Wallace et al., 1997), wobei es sich um ein dem bovinen PAG sehr ähnliches Protein handelt. Manche Autoren nutzen die Bezeichnung auch synonym (Wallace et al., 2015).

PAG werden von den binukleären Trophoblastenzellen produziert und erreichen den Blutkreislauf des Muttertiers sowie die Milch. Bekannt sind diese Proteine bereits für eine Reihe von Spezies, darunter Wild- und Hauswiederkäuer, Schweine, Hunde und Kameliden (Bella et al., 2007).

### **5.2.1 Historische, phylogenetische und biochemische Einordnung**

Butler et al. (1982) beschrieben als erste die Extraktion und den Nachweis von zwei Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen (ca. 65-70kDa und 47-53kDa Molekülgewicht) aus bovinem Plazentagewebe. Nachfolgend gelang dies ZOLI et al. (1991, 1992) und MIALON et al. (1993) jeweils unabhängig voneinander.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die PAG nach ihren Eigenschaften zu klassifizieren. Hierzu zählen die Tierspezies, das Molekülgewicht, eine etwaige Enzymaktivität sowie die Reihenfolge ihrer Entdeckung. Im Laufe der Entwicklung

hat sich die Nomenklatur als nicht einfach durchzuhalten erwiesen (Wallace et al., 2015).

Es können grundsätzlich zwei Gruppen unterschieden werden: Die phylogenetisch alten PAG, auch als PAG-1 bezeichnet, und die entwicklungsgeschichtlich jüngeren PAG (Hughes et al., 2003). Die phylogenetisch älteren PAG sollen in allen Trophoblastenzellen produziert werden, die jüngeren nur in den binukleären. Hierfür fanden sich zwar Belege, jedoch scheint es von dieser Regel Ausnahmen zu geben (Green, 2000), dies konnte besonders mit neueren Methoden wie der in situ-Hybridisation gezeigt werden (Wooding et al, 2005).

### **5.2.2 Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine bei Wiederkäuern**

Am besten erforscht sind PAG bisher für viele Spezies von Wiederkäuern. Für Rinder sind bisher 22 verschiedene PAG-Gene bekannt, für Ziegen 12 (Garbayo et al, 2008) und für Schafe ebenfalls mindestens 12 (Xie, 1997). Die jeweiligen Proteine unterscheiden sich in ihrer Glykosylierung und ihrem Molekulargewicht und werden zudem nicht alle zum gleichen Zeitpunkt ausgeschüttet: Im Laufe der Trächtigkeit zeigen die zugehörigen Gene verschiedene Expressionsmuster (Xie, 1997).

Auch die Verläufe der PAG-Konzentration insgesamt variieren zwischen den Spezies: Während Rinder ab circa drei Wochen post inseminationem messbare Werte zeigen, die bis zur Geburt stetig ansteigen (Mialon et al., 1993), fällt die PAG-Konzentration bei Schafen nach dem ersten Anstieg leicht ab, ehe sie zur Geburt erneut ansteigt (Ledezma-Torres et al., 2006). Bei Ziegen wird das Maximum etwa in Woche zehn der Trächtigkeit erreicht, wonach die Konzentration bis zur Geburt langsam sinkt (Gonzalez et al., 2000). In der Arbeit von Shahin et al. (2013) wurde der höchste Wert in Woche 16 erreicht. Allerdings ist dieses Muster abhängig vom verwendeten Capture-Antikörper: In derselben Arbeit wurde unter Verwendung boviner PAG-Antikörper das Maximum erst an Tag 105 erreicht und bis zur Geburt in etwa gehalten.

Aufgrund der langen Halbwertszeit und der hohen Werte zur Geburt sind PAG bei Kühen noch bis zu 100 Tage post partum nachweisbar (Zoli et al., 1992). Dieser Zeitpunkt überschneidet sich häufig mit der nächsten Trächtigkeit, was wiederum für die Trächtigkeitsdiagnose mittels PAG-Messung relevant ist. Bei Ziegen und Schafen fällt der Wert meist nach etwa vier Wochen post partum unter die Nachweisgrenze (Ledezma-Torres et al., 2006). SHAHIN et al (2013) fanden zudem heraus, dass der Abfall unter den Cut-off Wert bei ovinen und bovinen PAG-Antikörpern länger dauert, während bei Analyse mit caprinen Antikörpern an Tag 30 der Basalwert wieder erreicht war.

Zum Nachweis in Kälbern und Lämmern gibt es bisher noch wenige Erkenntnisse. Völlig undurchlässig für PAG scheint die Plazenta jedoch nicht zu sein, denn schon Neonaten zeigen niedrige, aber messbare Spiegel von PAG im Blut (Haugejorden et al., 2006; Roberts et al., 2017).

### **5.2.3 Nachweis von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen**

Zum Nachweis Trächtigkeits-assoziiierter Glykoproteine gibt es verschiedene Methoden.

Erste Nachweise geschahen via Radioimmunoassay (RIA) (Sasser et al., 1986; Ruder et al., 1988). Hierfür wird eine Standardmischung von Antikörpern und radioaktiv markiertem Antigen mit der zu messenden Probe versetzt. Über eine konzentrationsabhängige Bindung wird das markierte Antigen mehr oder weniger stark verdrängt und ungebundenes Antigen in einem Waschschrift ausgewaschen. Eine hohe Radioaktivität deutet hier auf eine geringere Konzentration von PAG in der Probe hin.

Da für den RIA radioaktives Material und die entsprechenden Laborkapazitäten notwendig sind, wird er mehr und mehr vom Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verdrängt. Diesen gibt es in verschiedenen Formen: Beim Sandwich-ELISA wird das zu bindende Antigen zwischen einen Coating-Antikörper und einen Detektionsantikörper gebunden. Beim kompetitiven ELISA konkurriert das zu

bindende Antigen mit einem markierten Antigen, das ebenfalls mit dem Coating-Antikörper reagiert. Ein nicht kompetitiver ELISA nutzt stattdessen einen enzymgekoppelten Detektionsantikörper. Über die Zugabe eines spezifischen Substrates wird eine Farbreaktion provoziert, die im Photometer gemessen werden kann. Diese fällt bei geringen Antigenkonzentrationen in der Probe beim kompetitiven ELISA entsprechend hoch aus, beim nichtkompetitiven niedrig.

Die Verwendung verschiedener Antisera ergibt auch unterschiedliche Verläufe der PAG-Konzentration; dies ist der phasenweise unterschiedlichen Ausschüttung der einzelnen PAG und der Kreuzreaktivität des jeweiligen Antikörpers geschuldet (Xie, 1997). Mit ovinen Antikörpern analysierte Ziegenproben (Batalha et al., 2001), wie auch mit caprinen Antikörpern analysierte Schafproben (Ledezma-Torres et al., 2006) ergeben so ähnliche Muster, dass die Systeme für beide Tierarten anwendbar sind. Deziert andere Verlaufskurven während der Trächtigkeit entstehen bei der Analyse von Ziegenplasma mit bovinen Antikörpern (Shahin et al., 2013). Trotzdem eignet sich diese Methode zur Trächtigkeitsbestimmung, wenn ein geeigneter Cut-off-Wert verwendet wird.

Auch Nachweise aus Milch sind mittlerweile möglich (Gonzalez et al., 2001). Die Nutzung als Trächtigkeitsdiagnose mittels Milch-ELISA ist für Rinder und Ziegen bereits kommerziell verfügbar ((Leblanc, 2013) IDEXX Laboratories Inc., Ludwigsburg, Deutschland).

Für den Nachweis von PAG aus Gewebeproben (Plazenta) eignet sich außerdem das SDS-Page-Verfahren (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis). Hierfür werden Plazentaprobe aufbereitet und die vorhandenen Proteine extrahiert (Bella et al., 2007). Diese werden durch Anlegen einer Spannung in einem Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Wenn noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden sollen, können die Proteine mittels verschiedener Verfahren auf eine Membran übertragen werden (Immunblotting).

#### **5.2.4 Mögliche Funktionen von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen**

Die Rolle der PAG im Stoffwechsel der Trächtigkeit ist noch nicht ausreichend verstanden. Es gab bisher viele verschiedene Ansätze, von denen aber nur wenige belegt sind und die sich noch nicht zu einem Ganzen fügen.

Dosogne et al. (1999) fanden bei Milchkühen im peripartalen Zeitraum eine reduzierte oxidative-burst-Aktivität von polymorphkernigen Leukocyten, die mit dem vorangegangenen PAG-Peak zusammenfiel. Hoeben et al. (1999) stellten in vitro eine hemmende Wirkung von PAG auf Knochenmarks-Vorläuferzellen fest – allerdings nur in hohen PAG-Konzentrationen, deren Vorkommen in vivo angezweifelt wird. Die erhöhten PAG-Level könnten auch auf einen erhöhten Blutstrom zum Ende der Trächtigkeit zurückzuführen sein (Dosogne et al., 1999).

Wooding et al. (2005) formulieren in ihrer Arbeit einige potentielle Wirkungen von PAG: Da sich die phylogenetisch älteren PAG vor allem in den Karunkeln finden, wäre eine Adhäsionsfunktion möglich. Weiter könnten pH-Wert-Veränderungen unter der Geburt den PAG ihre proteolytische Aktivität wiedergeben, die dann zur vollständigen Ablösung der Plazenta beitragen. Weitere Funktionen könnten die Verhinderung von Angriffen durch das mütterliche Immunsystem oder eine Aktivierung von noch unbekanntem Wachstumsfaktoren sein. Darauf deutet zumindest die große Substratspezifität der PAG hin.

Del Vecchio et al. (1996) fanden in ihren Untersuchungen zudem luteotrope Wirkungen von PAG. Dieses ist auch an anderer Stelle erwähnt und könnte bedeuten, dass PAG für die Erhaltung des Corpus luteum während der Trächtigkeit relevant sind.

#### **5.2.5 Einflüsse auf die Konzentration von Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen**

Als mögliche Einflüsse auf die PAG-Konzentration während der Trächtigkeit werden Parität, Geschlecht der Nachkommen, Rasse, Geburtsgewicht bzw. Größenwachstum der Feten sowie genetische Aspekte diskutiert. Vandaele et al.

(2005) fanden einen signifikanten Einfluss von Schafrasse und Ein- oder Mehrlingsträchtigkeiten sowie Geburtsgewicht der Lämmer auf die PAG-Konzentration der Muttertiere, während das Geschlecht der Neonaten keinen signifikanten Effekt hatte. Ledezma-Torres et al. (2006) fanden ebenfalls erhöhte PAG-Konzentrationen in den Muttertieren, wenn diese Mehrlinge zur Welt brachten. Allerdings sahen sie keinen signifikanten Unterschied zwischen den verwendeten Schafrassen, auch Geburtsgewicht und Geschlecht der Lämmer bewirkten keine signifikanten Veränderungen. De Sousa et al. (1999) untersuchten zwei ursprüngliche brasilianische Ziegenrassen auf Unterschiede in der PAG-Konzentration während der Trächtigkeit. Die Rasse hatte hier keinen signifikanten Einfluss, Mehrlingsgeburten hingegen schon (De Sousa et al., 1999).

Ein embryonaler Fruchttod oder Abort verursachen einen Abfall der PAG-Konzentration (Zarrouk et al., 1999; Humblot, 2001), weswegen sich PAG gut für die Überwachung der Plazentafunktion eignen.

Außerdem ist die verwendete Labormethode relevant für die ermittelten PAG-Werte. Je nachdem, welche Detektionsantikörper verwendet werden und wie die Proben vor der Analyse gehandhabt wurden, variieren auch die gemessenen PAG-Konzentrationen. So fanden SHAHIN et al. (2013) signifikant andere PAG-Verläufe über die Trächtigkeit von Ziegen, wenn bovine statt caprinen oder ovinen Antikörpern verwendet wurden.

### **5.3 Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Angriffen durch Krankheitserreger und andere schädliche Agenzien. Es setzt sich zusammen aus dem angeborenen und dem erworbenen, adaptiven Immunsystem. In beiden Zweigen gibt es wiederum einen zellulären, sowie einen sogenannten humoralen, also löslichen Teil. All diese Elemente lassen sich aber kaum getrennt betrachten, weil erst das perfekte Zusammenspiel eine gut funktionierende Immunantwort ergibt.

Dem komplexen Zusammenspiel sämtlicher Bestandteile des Immunsystems inklusive aller humoralen Anteile kann an dieser Stelle nicht Rechnung getragen werden. Nachfolgend erfolgt aber eine Erläuterung der einzelnen Komponenten und ihrer maßgeblichen Funktionen.

### **5.3.1 Angeborenes Immunsystem**

Säugetiere sind bereits bei ihrer Geburt mit einer hoch funktionalen und schnell reagierenden angeborenen Immunantwort ausgestattet. Sie ist aber weniger spezifisch als die erworbene Immunantwort, bei der eine auf das jeweilige Antigen genau abgestimmte Reaktion erfolgen kann. Zum angeborenen Immunsystem gehören auf zellulärer Ebene Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten. Das Komplementsystem, die Interferone und antibakterielle Peptide bilden den humoralen Anteil (Göbel u. Kaspers, 2015).

Die Zellen des Immunsystems bilden auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren aus, die sie aktivieren können: Pattern-recognition-receptors (PRR) sind Rezeptoren, die bestimmte Antigene viraler und bakterieller Herkunft (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) erkennen, binden und passende Signalwege zur Beseitigung aktivieren. Neben PRRs, zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören (Akira et al, 2006), besitzen sie außerdem Komplementrezeptoren. Durch Komplementfaktoren gebundenes Antigen wird von diesen Zellen als solches erkannt und phagozytiert (Merle et al., 2015). Die Immunzellen reagieren also unterschiedlich auf die jeweilige Aktivierung: Phagozytose von Antigenen, Ausschüttung von Cytokinen zur Aktivierung anderer Zellen, Ausschüttung von Sauerstoffradikalen zur Abtötung von Infektionserregern, etc.

Die zellvermittelte Immunantwort wird von einer Reihe von Cytokinen gesteuert, deren Ausschüttung einem fein austarierten Gleichgewicht folgt: Entzündungsmediatoren locken über Chemotaxis Immunzellen an und aktivieren sie zu Phagozytose oder Radikalbildung, sodass eingedrungene Mikroorganismen abgetötet und Zelldetritus entfernt wird. Danach dämmen sie die Reaktion aber auch wieder ein und fördern die Geweberestitution (Sheldon et al., 2014). Hierbei

unterstützt das Komplementsystem sowohl das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem. Es handelt sich dabei um Plasmaproteine, die als Proenzyme vorliegen und deren Spaltung zu aktiven Formen bei einer Infektion lawinenartig abläuft. Sie dienen ebenfalls der Chemotaxis, können als Porenbildner fungieren oder opsonisieren Antigene, kennzeichnen sie also für Phagocyten als „fremd“ (Merle et al., 2015).

Makrophagen phagocytieren auch körpereigene, apoptotische Zellen; in diesem Fall wird keine Cytokin-vermittelte Entzündungsreaktion ausgelöst, da es sich nicht um ein schädigendes Agens handelt (Sheldon et al., 2014). Dendritische Zellen sind in verschiedenen Geweben verortet. Bei Antigenkontakt schütten sie Cytokine aus und migrieren dann in benachbarte Lymphknoten, wo sie Lymphocyten aktivieren (Göbel u. Kaspers, 2015). Dies ist eine der vielen Möglichkeiten, wie angeborene und erworbene Immunität ineinandergreifen, weswegen eine strikte Trennung nicht sinnvoll ist. Eine andere ist die Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen und Makrophagen: Nach der Phagocytose werden Antigenbestandteile, gebunden an Major Histocompatibility Complex(MHC)-Klasse-II Moleküle, auf der Zelloberfläche präsentiert und machen so eine Erkennung durch Lymphocyten möglich (Rainard u. Riollet, 2006).

Segmentkernige Granulocyten, auch neutrophile Granulocyten genannt, bilden bei Antigenkontakt eine große Menge Enzyme aus, die der Sauerstoffradikal- und damit Wasserstoffperoxidbildung dienen, was wiederum das Antigen unschädlich macht. Diese Reaktion wird auch „respiratory burst“ genannt. Daneben besitzen neutrophile Granulocyten in ihrer Granula Lysozyme (Enzyme, die bei Verschmelzen mit einem Phagosom aktiv werden und das Antigen zerstören) und antimikrobielle Peptide (die z.B. in Bakterienwänden Poren bilden können) (Tizard, 2012, Kap. 4). Basophile Granulocyten hingegen schütten vor allem lösliche Faktoren aus.

Eine spezielle Zellpopulation sind die „Natürlichen Killer-Zellen“ (NKZ): Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche keine Antigen-Rezeptoren, sondern solche, die körpereigene Strukturen auf Zellen erkennen. Fehlen diese, töten NKZ die betroffene Zelle mithilfe cytolytischer Proteine ab (Sordillo et al., 1997). Dies betrifft

insbesondere Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen. Letztere machen sich nicht selten dadurch bemerkbar, dass die MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche fehlen.

NKZ werden zudem durch Interferone aus virusinfizierten Zellen oder durch Interleukin-12 von Makrophagen aktiviert. Sie benötigen keine vorherige Sensibilisierung und können sich auch durch autokrin wirkende Cytokine bei Kontakt mit der Zielzelle selbst anregen (Tizard, 2012, Kap. 13).

### **5.3.2 Erworbenes Immunsystem**

Erworbene Immunfunktionen basieren auf der Konfrontation mit schädigenden Agenzien und der folgenden Anpassung von Lymphocyten und Antikörpern an die jeweiligen Herausforderungen. Der erworbenen Immunantwort zu eigen ist ein Gedächtnismechanismus: Ein einmal stattgefundenener Kontakt mit einem schädigenden Agens hinterlässt nachhaltige Spuren im Immunsystem. Bei einem erneuten Aufeinandertreffen kann das jeweilige Antigen schneller und effizienter bekämpft werden. Die Voraussetzungen für eine adaptive Immunantwort entwickeln sich im Mutterleib; post partum vergehen aber noch einige Wochen, bis dieser Teil der Immunantwort voll funktionsfähig ist (Tizard, 2012, Kap. 21). Außerdem ist der Kontakt mit verschiedenen Antigenen notwendig, um es zur vollen Effektivität ausreifen zu lassen.

Grundsätzlich lassen sich B- und T-Lymphocyten unterscheiden: Während die B-Zellen Immunglobuline, also lösliche Produkte, produzieren, wirken T-Zellen über zellvermittelte Mechanismen. Erstere entstammen dem Knochenmark und dem Darm-assoziierten Lymphgewebe (GALT), während die Vorläuferzellen der T-Zellen in den Thymus wandern und dort ausreifen. An ihrem jeweiligen Entstehungsort reifen die Immunzellen nicht nur, sie werden auch einer Selektion unterzogen, um autoaggressive oder nicht funktionale Zellen auszusortieren. Lymphocyten rezirkulieren nach ihrer Reifung einige Tage in Blut und peripheren Lymphorganen. Werden sie nicht durch ein Antigen aktiviert, sterben sie ab (Göbel u. Kaspers, 2015). Treffen aber im Lymphknoten ein Antigen und ein passender Lymphocyt aufeinander, wird das Antigen gebunden. Es kommt zur klonalen Expansion von

antigenspezifischen B-Zellen sowie zur Ausschüttung spezifischer Immunglobuline (Ig). Bei der Vermehrung der Lymphocyten bilden sich neben den Antikörperproduzierenden Plasmazellen auch Gedächtniszellen, die sehr viel länger im Organismus zirkulieren. Wird der Körper mit dem gleichen Antigen wieder konfrontiert, ist die Reaktion deutlich schneller und stärker, als beim ersten Mal, weswegen man diesen Mechanismus als „immunologisches Gedächtnis“ bezeichnet. Auf diesem Prinzip basieren auch Schutzimpfungen (Göbel u. Kaspers, 2015; Sordillo et al., 1997).

Lymphocyten besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren, die Antigen, aber auch Komplementfaktoren, Immunglobuline oder Cytokine binden können. Außerdem gibt es Aktivator-Systeme (Signalübertragungsmoleküle), die nach Bindung an ein Zielmolekül den Lymphocyten aktivieren und verschiedene Reaktionen, wie etwa die Antikörperbildung, auslösen können (Tizard, 2012, Kap. 15). Die auf B-Lymphocyten exprimierten Antigen-Rezeptoren sind – anders als die TLR des angeborenen Immunsystems – hoch variabel. Sie binden also nicht ein bestimmtes, immer wiederkehrendes Antigen, sondern ihr Erfolg liegt in ihrer Vielfältigkeit (Tizard, 2012, Kap.15). Es handelt sich bei ihnen um ein einzelnes IgM-Molekül (siehe unten).

T-Zellen können ebenfalls in mehrere Gruppen unterteilt werden: T-Helfer-Zellen und cytotoxische T-Zellen sowie regulatorische T-Lymphocyten. Sie haben auf ihrer Oberfläche so genannte T-Zell-Rezeptoren, die aus nur zwei Proteinen bestehen. Wie die B-Zell-Rezeptoren auch besitzen sie eine variable Region. Durch die sogenannte „somatische Rekombination“ werden aus kleinen Gensegmenten Gene für die Rezeptoren zusammengesetzt, woraus eine große Vielfalt an Rezeptoren und damit eine große Bandbreite an möglichen Antigenen entsteht, die gebunden werden können (Göbel u. Kaspers, 2015).

Unterschieden werden T-Lymphocyten durch vorhandene Co-Rezeptoren, die als CD4 (cluster of differentiation, T-Helfer-Zellen) oder CD8 (cytotoxische T-Zellen) bezeichnet werden. Regulatorische T-Zellen bilden teilweise CD4, teilweise CD8-Moleküle auf ihrer Oberfläche aus.

T-Helfer-Zellen produzieren Cytokine, die die Immunantwort stimulieren, wie z.B. Interferon(IFN)- $\gamma$ , Interleukin(IL)-4, 10 und 13. T-Zellen benötigen, im Vergleich zu B-Zellen, die Antigen direkt erkennen können, eine antigenpräsentierende Zelle. Dies können dendritische Zellen, Makrophagen oder auch B-Zellen sein. Sie präsentieren verschiedene Antigene nach der Phagozytose auf ihrer Oberfläche mithilfe von MHC-Molekülen. Erst in Kombination mit MHC-Proteinen können T-Zellen aktiviert werden (Tizard, 2012, Kap. 18; Sordillo et al., 1997).

Cytotoxische T-Zellen benötigen mehrere Stimuli, um ihre Wirkung zu entfalten. Sie erkennen via MHC-I-Molekül präsentiertes Antigen auf aktivierten dendritischen Zellen, benötigen von diesen Zellen sezerniertes IL-12 und von T-Helfer-Zellen abgegebenes IL-2 und IFN- $\gamma$ . In Folge verlassen sie das lymphatische Organ und induzieren bei jeder Zelle, auf der sie das zuvor präsentierte Antigen vorfinden, die Apoptose (Tizard, 2012, Kap. 18).

#### 5.3.2.1 Immunglobuline

Immunglobuline, auch als Antikörper bezeichnet, sind von Plasmazellen produzierte Glykoproteine, die eine charakteristische Struktur haben: Sie bestehen aus je zwei leichten und schweren Ketten, die zusammen die Form des Buchstaben „Y“ formen. Jede dieser Ketten besteht aus einer variablen und einer konstanten Region (siehe Abb. 1).

Die konstante Region lässt eine Einordnung der Immunglobuline in Klassen zu: Man unterscheidet IgA, E, G, M und D, wobei IgD nicht bei allen Tierarten vertreten ist. Durch die Mutation eines der beiden Gene für die konstante Region kommt es zur Unterklassenbildung (z.B. IgG 1-3 bei Schaf), die sich auch getrennt analysieren lassen (Heimer et al., 1969; Micusan u. Borduas, 1977; Campbell, 1977).

Das zusammengesetzte Immunglobulin-Molekül lässt sich wiederum mittels Papain in drei globale Teile spalten: Ein stabiles Fragment (Fragment crystalline, Fc), das nicht an der Antigenbindung beteiligt ist, aber dafür mit Immunzellen interagieren kann und die beiden Fab-Fragmente, die der spezifischen Antigenbindung (Fragment antigen-binding) dienen.

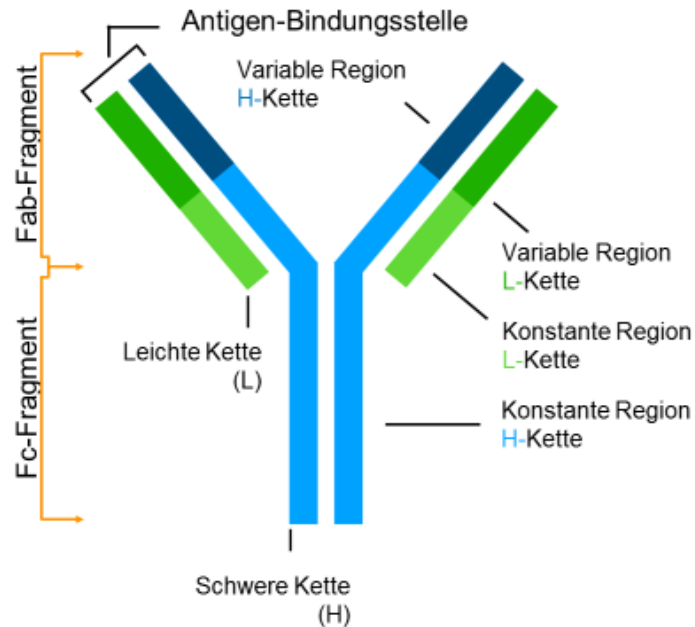


Abbildung 1 IgG-Molekül, schematische Darstellung (eigene Grafik)

Grundsätzlich neutralisieren Immunglobuline Toxine, verhindern die Virusbindung an Zellen, aktivieren das Komplementsystem und opsonisieren Antigene für die Phagozytose (Göbel u. Kaspers, 2015; Tizard, 2012, Kap. 16).

### *IgG*

Von Plasmazellen in Lymphknoten, Milz und Knochenmark produziert macht IgG den größten Teil aller Immunglobuline im Serum aus (Pan et al., 1968) und ist zudem das kleinste Molekül, wodurch es leichter in Gewebe eindringen kann. Es dient vorrangig der Agglutination von Bakterien, der Opsonisierung und der Komplementaktivierung. Im Zuge einer Immunantwort folgt es als „Sekundärantwort“ auf die IgM-Bildung (Isotypenswitch, s.u.) (Micusan u. Borduas, 1977).

### *IgM*

Nach IgG ist IgM in zweithöchster Konzentration im Serum enthalten. Als B-Zell-Rezeptor auf Lymphocyten ist es ein Monomer, löslich tritt es hingegen als Pentamer auf. Bei einer Immunantwort ist es stets der erste gebildete Antikörper. IgM aktiviert besonders stark die Komplementreaktion.

### *IgA*

IgA ist der wichtigste Antikörper auf Schleimhautoberflächen und liegt meist als Dimer vor. Außerdem wird sekretorisches IgA von Epithelzellen – gebunden an einen Proteinrest seines Rezeptors – sezerniert, was es vor Verdau schützt. Man bezeichnet es dann auch als sekretorisches IgA (Pahud u. Mach, 1970). IgA verhindert die Bindung von Pathogenen an die Mucosa. Eine Besonderheit ist, dass es auch in Zellen aktiv sein kann: Bereits eingedrungene Antigene werden gebunden und wieder in das Lumen sezerniert.

### *IgE*

IgE ist nur in sehr geringen Serumkonzentrationen vorhanden; stattdessen bindet es fest an Fc-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulocyten. Bei Antigenkontakt aktiviert es diese Zellen dann zur Degranulation. IgE ist besonders an Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I und der Abwehr von Parasiten beteiligt.

### *IgD*

IgD ist vor allem bei Primaten und Nagern bekannt und dort meist als B-Zell-Rezeptor ausgebildet. Aber auch Schweine, Rinder und Schafe weisen Gene für IgD-Globuline auf (Zhao et al., 2002). Strukturell scheinen IgD deutlich variabler zu sein als andere Immunglobuline. Ihre Funktion ist noch weitgehend unklar.

Eine beispielhafte Übersicht über die biochemischen Eigenschaften sowie wichtigsten Funktionen der (bovinen) Immunglobuline findet sich z.B. in der Arbeit von Lack (2006).

### *Isotypenswitch*

Im Zuge einer Immunantwort kommt es zum Isotypenswitch: Auf in der Primärantwort ausgeschüttetes IgM folgen in der Sekundärantwort gebildetes IgG und andere Immunglobulinklassen. Die Antigenpezifität bleibt dabei erhalten, es verändert sich lediglich die konstante Region des Antikörpers durch eine veränderte Expression der Gene. Hierfür werden zwei Signale benötigt: Der B-Lymphocyt wird durch eine Interaktion mit T-Helfer-Zellen aktiviert, verschiedene Cytokine wie IL-4, TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) und IFN- $\gamma$  steuern dann, welche Gene forciert abgelesen werden und damit, welche Antikörperklasse gebildet wird (Tizard, 2012, Kap. 16; Chaudhuri u. Alt, 2004).

### **5.3.3 Nachweismöglichkeiten von Immunglobulinen**

Immunglobuline können mit verschiedenen Verfahren nachgewiesen werden. Häufig angewendet wird die Gelelektrophorese. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Proteine über ihre Fließgeschwindigkeit in einem stromdurchflossenen Gel und die Präzipitation durch Antiseren (Alberghina et al., 2010). Auch mit der ELISA-Methode lassen sich Immunglobuline qualitativ und quantitativ nachweisen.

### *Referenzwerte*

In nachfolgender Tabelle sind einige Referenzwerte aus der Literatur aufgezeigt. Allerdings sind die absoluten Referenzwerte relativ wenig aussagekräftig. Sie hängen von der verwendeten Nachweismethode ab und werden vom jeweiligen Labor entsprechend angepasst.

*Tabelle 1 Referenzwerte für Immunglobuline bei Schaf und Ziege nach verschiedenen Autoren*

Tierart	IgG	IgM	IgA	Quelle
Schaf	17-20 mg/ml	1,5-2,5 mg/ml	0,1-0,5 mg/ml	(Tizard, 2012, Kap. 16)
	18-32 mg/ml			(Campbell et al., 1977)
Ziege	20 mg/ml (IgG1 + IgG 2)			(Micusan u. Borduas, 1977)

#### **5.3.4 Peripartale Immunität**

In der peripartalen Zeit finden im Körper des Muttertiers viele Prozesse statt, welche auch das mütterliche Immunsystem tangieren. Diese sind hormoneller Art, aber auch die einsetzende Laktation und externe Faktoren wie eine sich post partum verändernde Fütterung gehören dazu.

Die peripartale Phase ist durch eine erhöhte Infektanfälligkeit gekennzeichnet. Diese entsteht unter anderem durch eine niedrigere bakterizide Kapazität von neutrophilen Granulocyten (Kehrli Jr et al., 1989) und eine geringere Reaktion von Lymphocyten auf mitogene Stimuli (Detilleux et al., 1995). Van Kampen et al. (1997) fanden eine anteilige Abnahme der T-Zellen und damit auch der antiviralen IFN- $\gamma$ -Produktion, während die B-Zell-Konzentration erst nach der Geburt absank.

Nagahata et al. (1992) identifizierten niedrigere Konzentrationen von Immunglobulinen im peripartalen Zeitraum, obwohl die Anzahl der Lymphocyten nicht reduziert war. Nonnecke et al. (2003) vermuten einen immunsuppressiven Effekt durch die erhöhten Cortisolwerte am Ende der Trächtigkeit von Milchkühen. Auch Veränderungen der Konzentration von Progesteron, Estradiol und schließlich auch PAG könnten einen Anteil an der erhöhten Infektanfälligkeit haben (Waller, 2002).

Die IgG1-Konzentration im mütterlichen Serum von Kühen sinkt bis zur Geburt sukzessive ab, was vermutlich durch den aktiven Transport in die Milchdrüse und damit in die Kolostralmilch erklärt werden kann (Nonnecke et al., 2003). In derselben Arbeit wurde außerdem peripartal eine reduzierte Leukocytenaktivität festgestellt.

Micusan und Borduas (1977) untersuchten die IgG-Konzentration von Ziegen in der Trächtigkeit. Es kam zu einem Anstieg beginnend mit Woche 8 ante partum, allerdings sank die IgG-Konzentration ab Woche 4 ante partum rapide, um dann post partum wieder anzusteigen (Micusan u. Borduas, 1977).

### **5.3.5 Neonatale Immunität und Kolostrum**

In utero entwickeln sich nach und nach die lymphatischen Organe des Fetus, wobei dies mit der Bildung des Thymus beginnt. Mit zunehmender Reife sind verschiedene Immunfunktionen bereits aktiv, was sich z.B. an intrauterinen Infektionen mit nachfolgender Antikörperbildung ablesen lässt. Bei Geburt eines reifen Neonaten ist das Immunsystem vollständig entwickelt. Allerdings benötigt die adaptive Immunantwort einige Wochen, um zu voller Effektivität zu erwachen (B-Zell-Reifung, Entwicklung der B-Zell-Rezeptor-Diversität, etc.). Erste Reaktionen auf Infektionen direkt nach der Geburt sind entsprechend langsam und mit der Bildung von nur geringen Mengen von Immunglobulinen verbunden (Tizard, 2012, Kap. 21).

Aufgrund der wenig durchlässigen Plazenta sind bei Wiederkäuern bei Geburt nahezu keine Immunglobuline im Blut nachweisbar. Dieser Umstand wurde u.a. von Argüello et al. (2004) bei Ziegen und von Pierce (1955) bei Rindern untersucht. Die Neonaten sind auf die Versorgung mit mütterlichen Antikörpern über das Kolostrum angewiesen. In den ersten 24-48 (je nach Literatur auch 36) Stunden post partum ist der juvenile Darm durchlässig für verschiedene Proteine und die Proteasenaktivität im Gastrointestinaltrakt ist noch niedrig, sodass wichtige Wachstumsfaktoren, Immunzellen und Antikörper (aus dem Kolostrum) unbeschadet in den Blutkreislauf übertreten können. Chen et al. (1999) untersuchten den Einfluss verschiedener Substanzen mit unterschiedlichen Gehalten an Immunglobulinen auf deren Konzentration sowie die Gesamteiweißgehalte im Blut von neugeborenen Ziegen.

Für den Transport von Immunglobulinen durch das Darmepithel wird auf diesem ein Rezeptor ausgeprägt, an den die Antikörper binden können. Dieser wird FcRn-Rezeptor genannt (neonataler Fc-Rezeptor) (Raghavan u. Bjorkman, 1996). In ihrer Arbeit zum Einfluss von Immunglobulinkonzentrationen in Kolostrum auf den Immunstatus von Ziegenlämmern stellten RODRIGUEZ et al. (2009) die Hypothese auf, apoptotische Darmepithelzellen könnten die Resorption von Immunglobulinen begünstigen.

Nimmt das neugeborene Kalb oder Lamm kein Kolostrum auf, verzögert sich die „gut closure“, es vergrößert sich das Zeitfenster, in dem die Darmwand durchlässig ist. Wird hingegen viel Kolostrum aufgenommen, fördert das den Schluss des Epithels bei z.B. Schaflämmern und Ferkeln (Lecce u. Morgan, 1962). Eine ausreichende Aufnahme von Kolostrum steigert die Überlebenswahrscheinlichkeit von Schaf- und Ziegenlämmern deutlich (O'Brien u. Sherman, 1993; Vihan, 1988). Findet sie jedoch nicht statt, wird stattdessen das angeborene Immunsystem des Neonaten früher aktiv: Sie bilden bereits nach ca. 1 Woche eigene Antikörper, während nach ausreichender Aufnahme von Kolostrum die Immunglobulinsynthese erst mit ca. 5 Wochen post partum beginnt (Tizard, 2012).

Die Zusammensetzung von Kolostrum ist eine andere als die von Milch, dies lässt sich bereits grobsinnlich feststellen: Kolostrum ist dickflüssiger als Milch und häufig gelblich gefärbt. Die Kolostragenese beginnt bereits einige Wochen ante partum: Charakteristisch ist eine Aufkonzentration von Immunglobulinen in der Milchdrüse. Besonders stark werden IgG und IgA akkumuliert, etwas weniger IgM und IgE (Moreno-Indias et al., 2012; Tizard, 2012). Weiter enthält Kolostrum viele Cytokine und Hormone, deren Funktion noch nicht restlos geklärt ist. Trypsin-Inhibitoren schützen Bestandteile des Kolostrum vor vorzeitigem Verdau, sodass sie den Dünndarm erreichen können (Yamada et al., 2002). Maternale Lymphocyten werden ebenfalls mittels Kolostrums übertragen und teilweise sogar resorbiert.

Rodriguez et al. (2009) stellten eine Korrelation zwischen IgM- und IgA-Konzentration im Kolostrum und der jeweiligen Konzentration im Serum der saugenden Lämmer fest. Für IgG ist dieser Zusammenhang schon länger bekannt,

allerdings gibt es auch Arbeiten, in denen dieser Umstand nicht bestätigt werden konnte. Auch reife Milch enthält noch IgG und IgA, wobei besonders das IgA noch lange protektiv im Darmlumen des Jungtieres wirkt.

Über Fc-Rezeptoren – vermutlich die gleichen wie in der juvenilen Darmwand – wird IgG während der Kolostragenese aktiv in die Milchdrüse eingeschleust (Baumrucker et al., 2010; Ghetie u. Ward, 2000). Für IgA und IgM werden sowohl selektive Transportmechanismen als auch die lokale Produktion diskutiert (Horn, 2013; McDowell u. Lascelles, 1970).

#### **5.4 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit**

Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine spielen in der Tiermedizin bisher hauptsächlich eine Rolle in der Trächtigkeitsdiagnostik. Auch eine differenzierte Messung der verschiedenen Immunglobulinklassen findet bislang meist aus experimentellen Gründen statt.

Die Konzentrationen der Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteine und Immunglobuline G und M im postpartalen Zeitraum bei Schafen und Ziegen wurden ermittelt, sowohl bei Muttertieren als auch bei deren Lämmern. Als potentieller Einfluss auf die PAG, IgG und IgM Konzentration wurden Einlings-/Mehrlingsträchtigkeiten und das Geschlecht der Lämmer betrachtet. Außerdem wurden einige Tiere vor der Aufnahme von Kolostrum beprobt, um die Konzentrationsveränderungen durch Kolostrumaufnahme im Blut der Lämmer beobachten zu können.

Für die Untersuchung wurden zwei Ziegen- und Schafrassen verwendet, die je einmal der Nutzungsrichtung „Fleisch“ und „Milch“ zuzuordnen sind. Durch diese Konstellation konnten rassebedingte Einflüsse auf die drei Parameter erfasst werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung etwaiger Interaktionen zwischen den drei Parametern. Der viel diskutierte immunsuppressive Einfluss von PAG sowie eine etwaige Beteiligung am Isotypenswitch würde durch die parallele Messung von IgG und IgM sichtbar.

Für die Messung der Immunglobuline G und M bei der Ziege sowie das IgG beim Schaf wurde ein praktikables ELISA-System neu entwickelt.

## **6 Material und Methoden**

### **6.1 Versuchstiere**

Für die Durchführung der Versuche wurden Fleischschafe und -ziegen des Departments für Nutztierwissenschaften der Universität Göttingen sowie Milchschafe und -ziegen des Käsehofs Landolfshausen verwendet. An der Universität Göttingen standen hierfür Schwarzköpfige Fleischschafe und Burenziegen zur Verfügung. Der Käsehof Landolfshausen gewährte freundlicherweise die Durchführung der Arbeiten an Ostfriesischen Milchschaafen und Bunten Deutschen Edelziegen. Es handelte sich sowohl um nulli- wie auch pluripare Tiere. Die Tiere wurden in Gruppen in Stroh-Ausläufen gehalten und erhielten Heu und Wasser sowie Minerallecksteine ad libitum. Die Fleischschafe und -ziegen erhielten täglich ca. 1 kg pelletiertes Kraftfutter, die Milchschafe und -ziegen zusätzlich Karottenschnitzel und stundenweisen Weidegang.

Bei den Fleischschafen und -ziegen durften die Lämmer während des gesamten Versuchszeitraums bei ihren Müttern trinken. Mutter und Lamm wurden während der ersten Woche post partum in einer Einzelbox untergebracht. Die Milchschafe und -ziegen wurden nach fünf Tagen von den Müttern abgesetzt, in Kleingruppen untergebracht und ad libitum mit frischer Kuhmilch gefüttert.

### **6.2 Probenentnahme**

Die Probenentnahme fand in der Ablammzeit zwischen Januar 2014 und Mai 2014 statt. Es fanden 15 Fleischschafe mit ihren 22 Lämmern, 11 Milchschafe mit 19 Lämmern, 12 Fleischziegen mit 22 Lämmern und 11 Milchziegen mit 22 Lämmern Eingang in die Studie.

Die Blutproben wurden ab dem Tag der Geburt nach dem folgenden Plan entnommen:

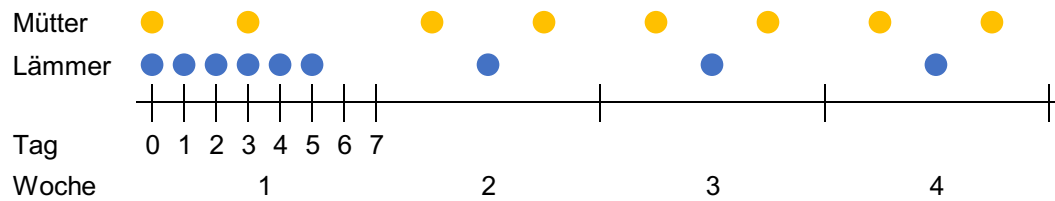


Abbildung 2 Probenentnahmeplan

Den Lämmern wurde an den ersten sechs Lebenstagen je eine Blutprobe entnommen, darauffolgend noch einmal 1x pro Woche für insgesamt drei Wochen. Den Muttertieren wurde beginnend mit dem Tag der Niederkunft für insgesamt vier Wochen zweimal pro Woche Blut entnommen.

Beprobt wurden nur Tiere, die ein gutes Allgemeinbefinden und keine klinischen Anzeichen einer Krankheit aufwiesen. Besonders in der Gruppe der Milchziegen kam es unter den Lämmern zu Fällen von lebensschwachen Lämmern und „floppy kid syndrome“. Für diese Tiere wurde die Probenentnahme entsprechend ausgesetzt.

### 6.2.1 Entnahmetechnik und Probenverarbeitung

Die Blutproben wurden durch Punktion der *Vena jugularis externa* (Terumo syringe, BD Microlance, 0,7 x 0,3 mm bzw. 0,7 x 0,25 mm) gewonnen und in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) zur Verhinderung der Gerinnung überführt.

Den Muttertieren wurden jeweils etwa 5ml Blut entnommen, bei den Lämmern war es, soweit möglich, 1ml.

Das Probenmaterial wurde bei 4°C aufbewahrt, bei 2000xg für 10 Minuten abzentrifugiert und das überstehende Plasma bei -20°C eingefroren. Der verbleibende Blutkuchen wurde verworfen.

Da es für Schaf und Ziege keine Referenzseren mit bekannten Gehalten an IgG und IgM gab, musste auf ein Äquivalent-System zurückgegriffen werden. Hierfür wurden als Standardplasma für den ELISA zwei speziesspezifische Poolplasmen von jeweils 10 Tieren gewonnen. 20 gesunden, adulten Schaf- bzw. Ziegenmüttern wurde Blut

entnommen und wie oben beschrieben verarbeitet. Am Schluss wurden die Plasmen von jeweils 10 Tieren gepoolt und portioniert eingefroren. Der Gehalt dieser Poolplasmen wurde dann als Äquivalent von 100 Units verwendet (Unitberechnung siehe unten).

## 6.3 Laboruntersuchungen

### 6.3.1 Methodische Vorarbeiten

Für die Analyse von Immunglobulinen bei Schafen und Ziegen existieren verschiedene Möglichkeiten (s. Einleitung). An dieser Stelle ist die Etablierung eines ELISA zum Nachweis aus Serum oder Plasma beschrieben.

Im Laufe der Vorversuche wurden sowohl die optimalen Antikörperkonzentrationen für Beschichtungs- und Detektionsantikörper als auch die Verdünnungsstufen für Standards und Probenmaterial ermittelt.

### 6.3.2 Inter-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurde an fünf verschiedenen Tagen jeweils eine Mikrotiterplatte mit demselben Protokoll bearbeitet. Zusätzlich zu zwei Pool-Plasmen wurden vier zufällig ausgewählte Einzelplasmen aus dem Probenmaterial in je vier Verdünnungsschritten in einer Doppelbestimmung aufgetragen. Für die Berechnung der Äquivalente wurden die Messdaten in ein vorbereitetes Formelblatt (nach Gellermann, 2006) übertragen.

Für das als Referenz genutzte Poolplasma wurde eine Kalibrierkurve erstellt, die aus den Logarithmen der Verdünnung sowie den Logarithmen der optischen Dichten errechnet wird. (Da es sich um Doppelbestimmungen handelt, wird jeweils mit dem logarithmierten Mittelwert gearbeitet.) Das Poolplasma repräsentiert 100 Units, an denen sich die Werte aller auf der Platte verwendeten Proben orientieren.

Berechnung der Äquivalenzwerte:

$$\text{Units} = 100 \cdot \frac{10^{\text{Log[Verd]}}}{10^{(\text{Log}(OD) - \text{In})/s}}$$

Verd.: Verdünnungsstufe des jeweiligen Plasmas

OD: Mittelwert der optischen Dichte aus Differenzdaten

In: Intercept, Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse

s: Steigung der Kurve

(Gellermann, 2006)

### **6.3.3 Intra-Assay-Varianz**

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Varianz wurden auf einer Platte je ein Pool- und ein Einzelplasma mehrfach in vier Verdünnungsschritten aufgetragen. Aus den gemessenen optischen Dichten wurden mit obenstehender Formel Äquivalente berechnet. Aus diesen wurden Mittelwerte, Varianzen und Variationskoeffizienten für jedes Plasma bestimmt.

Anhand von Inter- und Intra-Assay-Varianz war es möglich, das bestmögliche Poolplasma zur Qualitätskontrolle auf jeder Platte zu bestimmen. Zudem wurde ein Einzelplasma mit geringer Variation ausgewählt, das ebenfalls auf jeder Platte mitgeführt wurde. Nur, wenn die errechneten Units dieser beiden Standards im Rahmen der errechneten Varianzen lagen, wurde die Platte als valide eingestuft und ausgewertet. War dies nicht der Fall, wurde sie erneut pipettiert.

Für jede Antikörperkombination wurden die Blankwerte ermittelt. Hierfür wurde, anstatt von Probenmaterial, einfacher Testpuffer in die beschichteten Wells pipettiert. Die so ermittelten Blanks fungierten als zusätzliche Qualitätskontrolle.

## **6.4 ELISA-Protokolle**

### **6.4.1 Immunglobulin G (Ziege)**

Für die Bestimmung des IgG aus den Plasmaproben wird die Mikrotiterplatte mit Coating-Antikörper beschichtet (donkey anti-goat IgG, 4µg/ml, 100µl/Well in Coating-Puffer) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag werden nach einem

Waschschritt die Proben in logarithmischer Verdünnung (in Testpuffer, 100µl/Well) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt folgt der mit Horseradish-Peroxidase konjugierte Detektionsantikörper (donkey-anti-goat IgG HRP, 1:50.000 in Testpuffer, 100µl/Well) und 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler.

Nach einem letzten Waschschritt wird das Substrat aufgetragen (TMB, Substratpuffer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). Nach etwa 20 Minuten (abhängig von der Farbreaktion) Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wird die Reaktion mit Schwefelsäure (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt.

Die optische Dichte wird im Photometer (BioTek ELx800) bei 450 Nanometern gemessen, 630 Nanometer dienen als Referenzwellenlänge, und über die Software (Gen5 Microplate Reader, Vers. 5/2005) ausgegeben.

#### **6.4.2 Immunglobulin M (Ziege)**

Die Analyse des Immunglobulins M (IgM) bei der Ziege folgt obigem Protokoll. Als Coating-Antikörper wird rabbit-anti-goat IgM verwendet, für die Detektion rabbit anti-goat IgM HRP in der Verdünnung 1:60.000.

#### **6.4.3 Immunglobulin G (Schaf)**

Die Analyse des IgG beim Schaf folgt demselben Protokoll. Für die Beschichtung wird donkey anti-sheep IgG, für die Detektion donkey anti-sheep IgG HRP in der Verdünnung 1:20.000 verwendet.

#### **6.4.4 Immunglobulin M (Schaf)**

Für die Analyse des IgM beim Schaf wurden rabbit anti-sheep IgM für das Coating und rabbit anti-sheep IgM HRP Antikörper, verdünnt auf 1:60.000, verwendet.

Der ELISA für diesen Isotyp lieferte mit den verwendeten Antikörpern sehr hohe Blankwerte. Diese entstehen meist durch unspezifische Reaktionen des Antikörpers

mit der Mikrotiterplatte. Daher wurden verschiedene Blocking-Versuche unternommen, um die unspezifischen Reaktionen zu vermindern.

Neben Fischgelatine (2% in PBS) und Bovinem Serum-Albumin (4% in PBS) kam auch Kaninchenserum (2% in Coating-Puffer) zum Einsatz. Diese Substanzen werden von dem verwendeten Antikörper nicht gebunden, hindern ihn aber an der unspezifischen Bindung an die Mikrotiterplatte. Keine dieser Blockingreagentien verminderte die unspezifischen Bindungen des Antikörpers entscheidend. Das Bovine Serum-Albumin (BSA) verstärkte sie sogar (s. Abb. 3). Daher wurde der Test ohne Blockingagens weitergeführt.

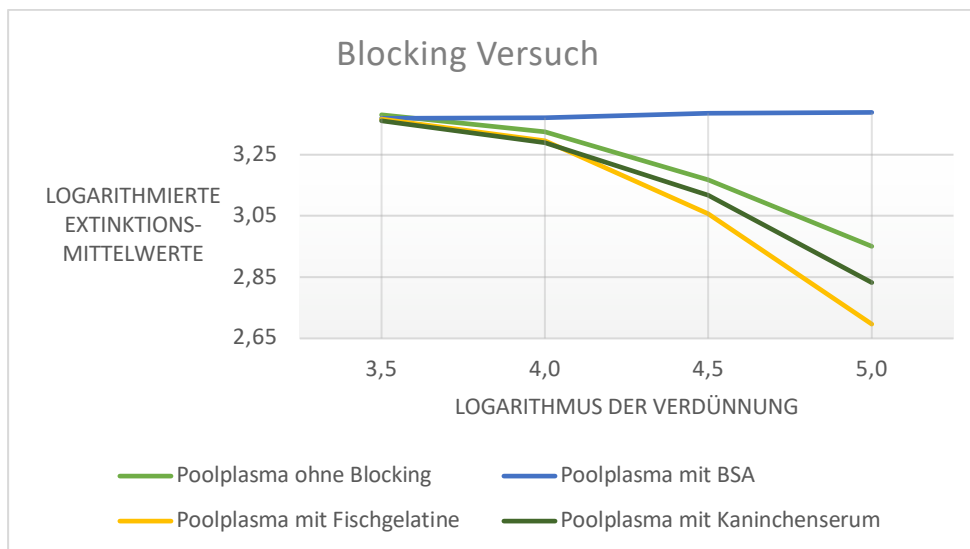


Abbildung 3 Blocking-Versuch IgM-ELISA

Im Laufe der Probenanalyse erwies sich dieser Test als sehr unzuverlässig. In der Inter-Assay-Varianz ermittelte Werte für die Standardplasmen wurden im Folgenden nur selten erreicht. Sie variierten um bis zu 50 Units. Um das Problem zu lösen, wurden die Proben und Standardplasmen vor der Messung abzentrifugiert. Außerdem wurden die Standardplasmen in Testpuffer vorverdünnt, eingefroren und nur nach Bedarf portionsweise aufgetaut. Doch auch durch diese Maßnahmen konnte das Problem nicht gelöst werden. Daher wurde auf die weitere

Probenanalyse mit diesem Test verzichtet, da keine validen Daten gewonnen werden konnten.

#### 6.4.5 Verdünnungsreihe

Sowohl die Standardplasmen als auch die Proben wurden als Doppelbestimmung von jeweils vier Verdünnungsschritten aufgetragen. Hierfür wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe gewählt (s. Tab. 2). Am Tag der Analyse wurden die frisch aufgetauten Proben mithilfe einer Präzisionspipette in Testpuffer verdünnt und mithilfe des Vortexers gründlich durchmischt.

*Tabelle 2 Verdünnungsstufen der Plasmen, IgG und IgM-ELISA*

IgM	IgG
1 : 3.000	1 : 300.000
1 : 10.000	1 : 1.000.000
1 : 30.000	1 : 3.000.000
1 : 100.000	1 : 10.000.000

In den gewählten Bereichen war die Titration am besten zu erkennen. In geringerer Verdünnung zeigte die Titrationskurve lediglich ein Plateau ohne auswertbare Ergebnisse, bei einer stärkeren Verdünnung ließen sich die Werte nicht von den Blankwerten unterscheiden.

#### 6.5 ELISA zum Nachweis Trächtigkeits-assoziiertes Glykoproteins

Für die Untersuchung der Plasmaproben auf Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine wurde der 2010 von Friedrich und Holtz für Rinder etablierte und 2013 von Shahin et al. für Ziegen modifizierte kompetitive ELISA genutzt.

Hierfür werden Mikrotiterplatten mit sheep anti-rabbit-Antikörpern beschichtet und bis zur Verwendung eingefroren. Für die Durchführung des Tests werden die Platten aufgetaut, mit je 100µl/Well des Capture-Antikörpers beschichtet (caPAG<sub>55+62kDa</sub>,

#706, 1:150.000) und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die gesamte Platte mit Testpuffer beschichtet (50µl/Well) und die Proben sowie eine Standardreihe werden aufgetragen (je 50µl/Well). Als Standard und Positivkontrolle dient aufgereinigtes boPAG<sub>67kDa</sub>, als Nullkontrolle PAG-freies Bullenserum.

Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur folgen am dritten Tag die letzten Schritte. Als Tracer trägt man biotinyliertes boPAG<sub>67kDa</sub> auf (50µl/Well, 1:1200). Es folgen 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler. Nach einem Waschschrift folgt die Streptavidin-Peroxidase-Lösung (100µl/Well), 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler. Nach einem weiteren Waschschrift werden 150µl/Well der TMB-Substratlösung aufgetragen und je nach Färbungsgrad für 20-45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25M) abgestoppt und die Platte zur Ermittlung der Ergebnisse mittels des Photometers (Tecan Sunrise®) und der Software (Magellan 4.0) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

Sowohl die Proben als auch die Standardreihe und Kontrollen werden jeweils doppelt auf die Platte aufgetragen. Für die Standardkurve werden dann auf der x-Achse der Logarithmus der Konzentration und auf der y-Achse die Extinktion aufgetragen. Bestenfalls entsteht eine sigmoide Kurve (s. Abb. 4). Die Berechnung der PAG-Konzentrationen erfolgt dann mittels einer logitlog-Transformation. Der Messbereich dieses ELISA liegt zwischen 0,4ng/ml und 15ng/ml.

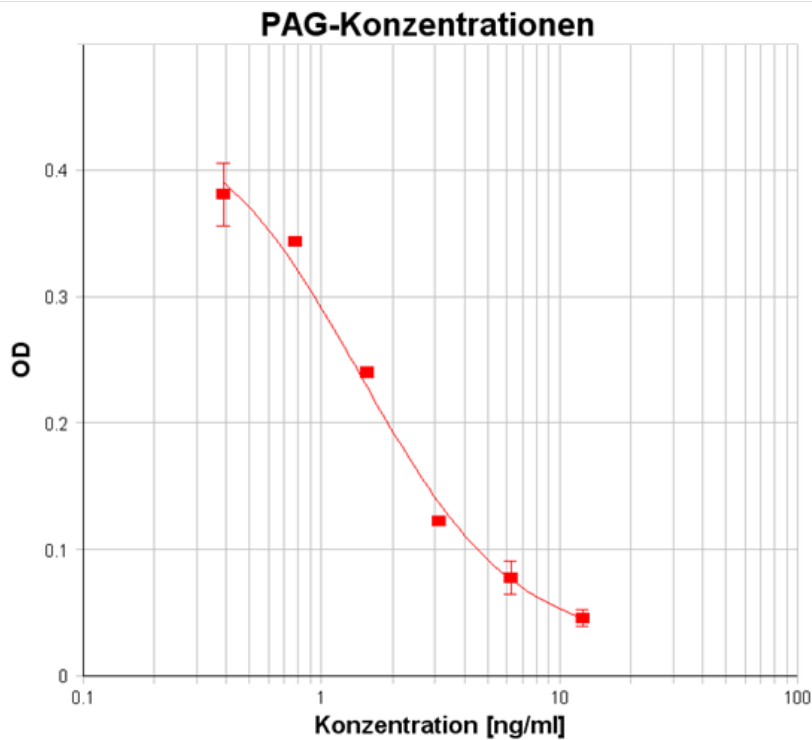


Abbildung 4 Standardwerte Messkurve für PAG-ELISA

## 6.6 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SAS (SAS Institute Inc., Cray, NC) genutzt. Neben der beschreibenden Statistik (Mittelwerte, Medianwerte, Perzentile, Standardabweichung) mit der MEANS-Prozedur wurde die Prozedur ANOVA zur Varianzanalyse durchgeführt. Die Daten waren aber nicht normalverteilt, weswegen im Anschluss der Wilcoxon-Test (NPAR1WAY Procedure) präferiert wurde, um die Rasseunterschiede der PAG-, IgG- und IgM-Konzentrationen zu ermitteln. Mögliche Korrelationen der drei Variablen wurden mittels Pearson's-Korrelations-Koeffizienten (CORR Procedure) erfasst.

## **7 Zur Veröffentlichung vorbereitete Manuskripte**

### **7.1 Concentrations of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and immunoglobulins G and M in plasma of post-partum dairy and meat goats and their offspring**

#### **7.1.1 Abstract**

The concentrations of Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and immunoglobulins G and M were measured by an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the plasma of postpartum Boer goats and Improved Fawn goats and their offspring. Aims of the study were to find possible interrelationships between PAG and immunoglobulins in the does and the goat kids and to evaluate factors influencing the concentrations of these parameters, such as breed, litter size and sex of the kids. Thus, the potential role of PAG in the immune response of does and kids and metabolic differences between breeds and their impact on PAG-clearance should be elucidated.

12 Boer goats and their 22 offspring and 11 Improved Fawn goats and their 22 offspring were included in the study. From the day of parturition until four weeks postpartum, does were sampled twice weekly (day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 25). Goat kids were sampled after parturition and for five consecutive days, from week two on once a week (day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 13, 21, 28).

Average PAG-concentration in the does dropped within the four-week sampling period from 16.3ng/ml and 16.1ng/ml on the day of parturition to 1.8ng/ml and 1.1ng/ml on day 25 post-partum for meat and dairy goats respectively. IgG increased during the trial from 62.2 and 69.1 units to 76.7 and 80.8 units for meat and dairy goats respectively and IgM on the other hand decreased slightly from 73.3 and 88.6 units to 59.9 and 76.4 units.

In the goat kids, PAG-concentrations rose until day 1 after parturition and then decreased rapidly within 6 days. Average levels were 2.9 and 2.3ng/ml on the day of parturition in meat and dairy goat kids respectively and fell to levels under the cut off (0.4 ng/ml) on day 5 after parturition. Likewise, IgG increased until day 1 after

parturition to levels of 142.9 and 146.7 units in meat and dairy goats respectively and then decreased to 49.1 and 39.8 units at the end of time of measurement. At first, IgM increased, too, but this increase was more pronounced in the dairy goat kids who reached peak values of 182 units on day 1 post partum. Afterwards, the IgM-levels decreased to 30.5 and 34.4 units in meat and dairy goat kids, respectively, at the end of the trial.

There were significant differences for dairy and meat goats for the concentrations of PAG on days 7-21 in the does and days 1-4 in the kids. IgG-concentrations did not differ significantly between the two breeds whereas IgM showed significantly different values from day 3 to day 21 in the does, except for day 14; and from day 1-19 in the kids, with the dairy goats each having higher levels. Litter size and sex did not have a significant influence on IgG and IgM values.

### **7.1.2 Introduction**

Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) form a group of presumably inactive aspartate proteases, related to active members including renin, pepsinogen, Cathepsin D and E. They are produced by binucleate cells during pregnancy in species-specific patterns which are well described in ruminants (Beckers et al., 1999). Monogastric species that produce PAG are pigs (Szafranska, 1995) and horses (Green et al., 1999). PAG circulate in the maternal blood and can be used to monitor the physiologic function of the placenta, and thus determine pregnancy and embryonic wellbeing. Beside blood, they are also measurable in milk samples (Gonzalez et al., 2001). This is advantageous in terms of the sampling procedure.

Not only the economic interest of the agricultural sector made PAG of interest in research but the sheer physiological role which is still not understood. In the past twenty years a vast amount of work has been published on this subject.

In cows, PAGs show a steady increase until a peak directly before parturition is reached (Zoli et al., 1992). The decrease to basal levels takes about 100 days and often interferes with the next pregnancy. Sheep show a different pattern, with an

increase until week 9 after fertilization, which is followed by a decrease and another increase again until parturition. The development of this last increase is breed-dependent (Ranilla et al., 1994). In goats, the peak is reached at about 10 weeks of pregnancy and the values then slowly decrease until parturition (Gonzalez et al., 2000). In both small ruminant species, the decrease to basal levels takes about 4 weeks after parturition (Ranilla et al., 1997). Roberts et al. (2017) found this period to be rather 8-9 weeks.

The detection of PAG is widely used for a precise pregnancy detection in an early stage of pregnancy. Different methods for estimating PAG concentrations have been established. The widely used radioimmunoassay (RIA) with the need of radioactive materials as a disadvantage is steadily being replaced by the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Using homologous or heterologous antibodies, the different PAG can be measured in serum or plasma samples. Depending on the antibody used the analysis shows slightly different patterns of PAG (Shahin et al., 2013).

Rarely investigated are PAG-concentrations in newborn calves, goat kids and lambs. Haugejorden et al. (2006) found measurable levels of PAG directly after parturition which increase after colostrum uptake and then decrease within days to basal levels, indicating that PAG are transmitted to the fetus in utero and to the neonatal via milk. It remains questionable whether PAG play a role in the neonates' organism.

Immunoglobulins form a major part of the adaptive immune system. They are produced by B-cells and consist of multiple glycoproteins. These are connected into two light and two heavy chains, forming the shape of the letter Y. Soluble in the blood stream or linked to the B-cell's surface (B-cell-receptor), they work as antigen-binding-molecules. With different emphasis in each group, they mark antigens for opsonization and neutralize them by complex formation or complement activation.

Sorted according to their heavy-chain's specificity, there are five isotypes of them: Immunoglobulin A, D, E, G and M. Immunoglobulin A mostly acts on body surfaces, e.g. in saliva. IgD is not found in all mammals and mostly restricted to the B-cell's surface. Immunoglobulin M (IgM) is produced primarily after first antigen-contact and

can be found predominantly in the bloodstream. Immunoglobulins type G (IgG) form the biggest number of antibodies in the blood and reach high levels in colostrum. Depending on the animal species there are subclasses of immunoglobulins, such as IgG1 and IgG2 in goats and cattle.

In the first 24-48 hours after parturition, maternal antibodies pass through the newborns' intestinal barrier via special receptors and protect the neonate until its immune system is developed properly (Sawyer et al., 1977). Thus, colostrum uptake is vital to newborn mammals, especially to those with a low permeable placenta, like ruminants, to protect them against viruses, bacteria and other antigens. As PAG seem to pass the intestinal barrier of neonates in a way like immunoglobulins do, the two parameters were assessed together to find potential connections and interactions.

The aim of this study was to 1) assess concentrations of PAG and immunoglobulins after parturition in dairy and meat goats and their offspring, 2) study interdependences of PAG and immunoglobulin concentrations in neonates and 3) to evaluate the effects of breed, litter size and sex on both parameter's concentrations in order to better understand the potential role of PAG in the immune system.

### **7.1.3 Material and Methods**

#### *Animals*

The present study was conducted on adult female meat and dairy goats including their offspring.

As meat goats, 12 Boer does and their 22 offspring (9 male, 13 female) were studied. 2 gave birth to single kids, 8 delivered twins, and one each triplets and quadruplets. These were located at the Department of Animal Science, University of Göttingen, Germany. As dairy goats, 11 German Improved Fawn does and their 22 offspring (11 male, 11 female) were used. 4 of the does kidded a single lamb, 7 delivered twins and 1 gave birth to triplets. These were raised on a commercial organic farm in Germany. Both groups included nulli- and pluriparous animals and does were group-

housed in pens with straw bedding. Hay and water were available ad libitum. Additionally, the meat goats received 700g of concentrate and the dairy goats 1 kg of concentrate mixed with carrots daily.

At birth, the number, sex and weight of the kids was recorded. Throughout the trial, kids were checked regularly for signs of deficient suckling (weight gain), fever or weakness. The kids of the meat goats were allowed to suckle their dams, while the kids of the dairy goats were separated from their mothers on day 5 post partum. After separation, the kids were raised in groups of 5 to 10 and fed with fresh cow milk ad libitum, the does were milked twice a day.

#### *Blood sampling*

Parturition was monitored and the blood samples were taken within 12 hours afterwards. Blood samples of the does were taken by venipuncture (5 ml Terumo syringe, BD Microlance, 0.7 x 0.3 mm) of the vena jugularis and collected into 5 ml EDTA-tubes (Sarstedt, Germany). The samples were stored at 4°C until centrifugation at 3000 rpm for 10min. The obtained plasma was frozen at -20°C until analysis.

The kids were bled by venipuncture (2 ml Terumo syringe, BD Microlance, 0.7 x 0.25 mm) of the vena jugularis and the blood was filled into 2 ml EDTA-tubes (Sarstedt, Germany). Samples were stored at 4°C until centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Again, the plasma was frozen at -20°C until analysis.

Blood sampling was continued in does twice a week for 4 weeks post partum (day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 25) and in kids' blood was sampled on their birthday and daily until 5 days post partum, thereafter weekly for 3 consecutive weeks (day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 13, 21, 28). In each group, two kids were bled before colostrum uptake. Thus, basal PAG and IgG/IgM levels could be determined, which weren't influenced by colostrum ingredients.

#### *PAG analysis*

Plasma samples were analyzed for PAG with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described by Shahin et al. (2013). The microtiter plates used were

covered with a sheep-anti-rabbit antibody for capturing. Anti-caPAG antibody AS#706 was used for specific binding (caPAG<sub>55+62kDa</sub>) and purified bovine PAG (boPAG<sub>67kDa</sub>) as standard and biotin-labelled tracer.

Briefly, the microtiter plates were coated with the sheep-anti-rabbit antibody and stored at -20°C until use. Prior to analysis, the plates were warmed to room temperature and coated with anti-ca-PAG-dilution (1:150.000) incubating at 4°C overnight. Standards (ranging from 0.4 to 12.5ng/mL) for the calibration graph and samples were added to the plates and incubated overnight again at room temperature. After adding 50µl of tracer to every well (biotinylated boPAG<sub>67kDa</sub>, diluted 1:1000 in assay buffer) and an incubation time of 90 minutes the plates were washed (Columbus plus™, Tecan, Germany) two times with phosphate-buffered saline (PBS) and 100µl streptavidin-peroxidase (50µg/ml) was added. After another 30 minutes of incubation, 150µl TMB (12.5 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine / mL Dimethylsulfoxid) was added. The color reaction was stopped by adding 50 µL of sulphuric acid (1 mol/L). Optical density was then measured with a photometer (450nm, Sunrise™, Tecan, Germany). PAG-concentrations were calculated with the Magellan™ software (Tecan, Germany).

#### *Immunoglobulin analysis*

IgM and IgG in plasma were analyzed with a newly developed ELISA system. Microtiter plates (Microtiter™, Thermo Fisher Scientific, USA) were coated with 100µl per well of coating antibody (concentration: 4µg/well) and incubated at 4°C overnight. After washing the plate the next day, 100µl per well of diluted sample were added and incubated for one hour. HRP-conjugated detection antibody was added (100µl/well) after another washing step and incubated for 45min. After the last washing step, the color reaction with TMB was started, incubated in the dark and stopped with sulfuric acid. The optical density was measured (Elx800™, BioTek, USA) with 450nm and 630nm as reference wavelength.

For the analysis of IgG, we used a donkey-anti-goat IgG coating antibody, samples in four different logarithmic dilutions ranging from 1:300.000 to 1:10.000.000 and donkey-anti-goat IgG HRP detection antibody in a dilution of 1:50.000.

IgM was analyzed using rabbit anti-goat IgM coating antibodies. The sample dilution ranged from 1:3.000 to 1:100.000. Detection antibody rabbit-anti-goat IgM HRP was used in the concentration of 1:60.000. All antibodies were purchased at AbD Serotec (BioRad Laboratories GmbH, Germany).

The data of IgG- and IgM-measurement were converted into units. This was done by using a formula taking into account the degree of dilution, intercept and inclination of the curve and the average optical density, following calculations made by Gellermann (2006).

*Calculation of unit-values:*

$$\text{Units} = 100 \cdot \frac{10^{\text{Log[Verd]}}}{10^{(\text{Log(OD)} - \text{In})/s}}$$

dil: degree of dilution, OD: average optical density, In: Intercept, incl: curve inclination

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was done with SAS (SAS institute Inc., Cray, NC). Means, medians (50<sup>th</sup> percentile, P50) and standard deviations were calculated with the procedure MEANS. Analysis of breed differences in PAG- and IgG/IgM-concentrations on different testing days was done with Wilcoxon's-test (NPAR1WAY Procedure). Wilcoxon's test was preferred to ANOVA due to the lack of normal distribution of the data. Correlations between PAG, IgG and IgM were estimated with Pearson's correlation coefficient (CORR Procedure).

## **7.1.4 Results**

### *7.1.4.1 Pregnancy-associated glycoproteins*

PAG-values in the does started directly after birth with averages of 16.3ng/ml and 16.1ng/ml and medians of 13.2ng/ml and 16.3ng/ml for meat and dairy goats respectively. Levels of PAG then dropped during the measuring series to 1.8ng/ml

and 1.1ng/ml (p50: 1.8ng/ml and 0.7ng/ml) at the end of the fourth week post partum (Fig. 5).

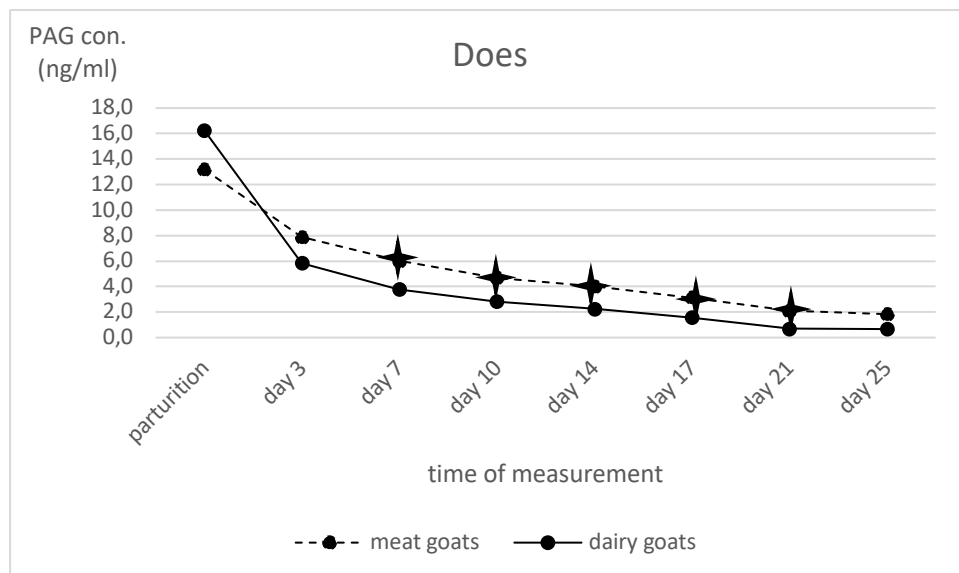


Figure 5 Median PAG concentration of Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn Does (N=11, full line), asterisks mark significant ( $p < 0,05$ ) differences within each sampling time

Significant differences ( $p < 0,05$ ) were found from the third to the seventh time of measurement (Figure 5). Levels in dairy goats dropped faster than those in meat goats although they started with higher levels directly after birth.

In the kids, the average concentrations of PAG were 2.9 and 2.3ng/ml (p50: 2.7ng/ml and 2.3 ng/ml) immediately after parturition for meat and dairy goats, respectively (Fig. 6). They decreased to unmeasurable concentrations on day 4 post partum in the dairy goat kids and after day 6 post partum in the meat goat kids. So again, the dairy goats showed a more rapid decrease of PAG in their plasma than the meat goats. Significant differences between both breeds were found on days 1 to 4.

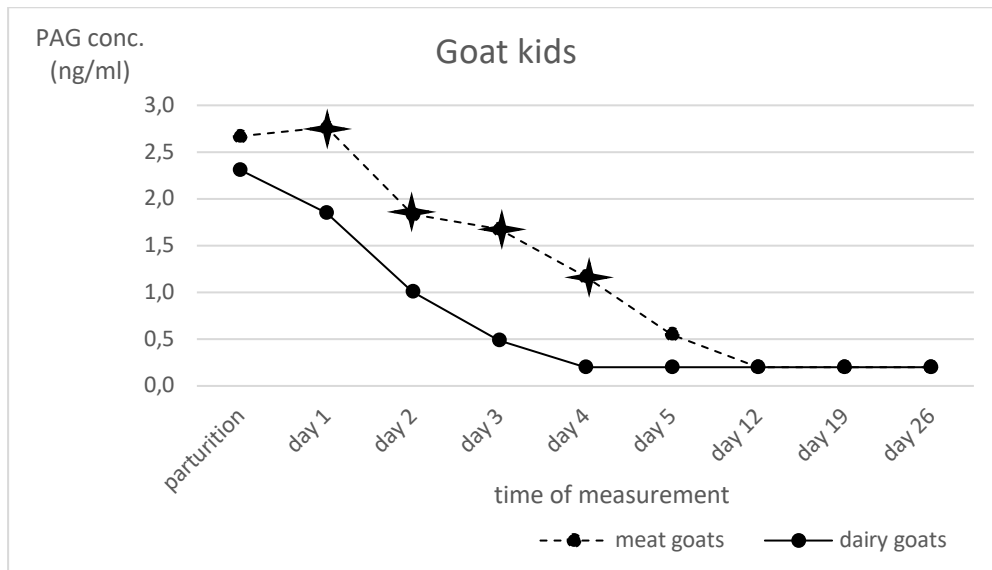


Figure 6 Median PAG-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisks mark significant differences within each sampling time

The kids that were sampled before colostrum uptake showed mostly unmeasurable or very low levels of PAG in their plasma (Tab. 3). Their plasma-PAG-concentration increased rapidly after suckling their dams. The sex of the kids did not have a significant influence on PAG-concentration. Litter size didn't influence PAG-concentrations significantly, neither in the dams nor in the kids, as calculated with Welch-two-sample-t-test.

Kids who died throughout the measurement period or were excluded because they developed symptoms of illness (e.g. floppy kid syndrome) didn't show significantly different levels of PAG in their plasma compared with healthy kids when checked with Wilcoxon-test. (Using the Welch-two-sample-t-test, there was at the day of birth a significant higher PAG-level in healthy goat kids to be seen.)

#### 7.1.4.2 Immunoglobulin G and M

##### *ELISA evaluation:*

The inter assay variance was estimated by doing trials on five different days with the same set-up. After this, a pool plasma and one single animals' plasma which had the smallest standard deviation over the trial plates were chosen and used as standards for the whole experiment. For IgG, the pool plasma had a standard deviation of 10 units, the single doe's plasma of 11.5 units. For IgM, it was 13 and 23 units respectively.

Secondly, the intra assay variance was checked. For this, the pool and the single plasma were pipetted on a plate several times in the four dilution steps that were used for all samples later. For IgG-measurement, the standard deviations were 7 and 7.5 units for pool and single plasma respectively. For IgM, 60 units for the pool plasma and 22 units for the single animals' plasma were worked out.

##### *IgG:*

The concentrations of IgG in plasma of the dams showed a smooth increase. Averages were 62.2 and 69.1 units at parturition time and 76.7 and 80.8 units at the end of the trial, for meat and dairy goats respectively. There were no significant differences between the levels in meat goats and dairy goats when checked with Wilcoxon's test (Fig. 7).

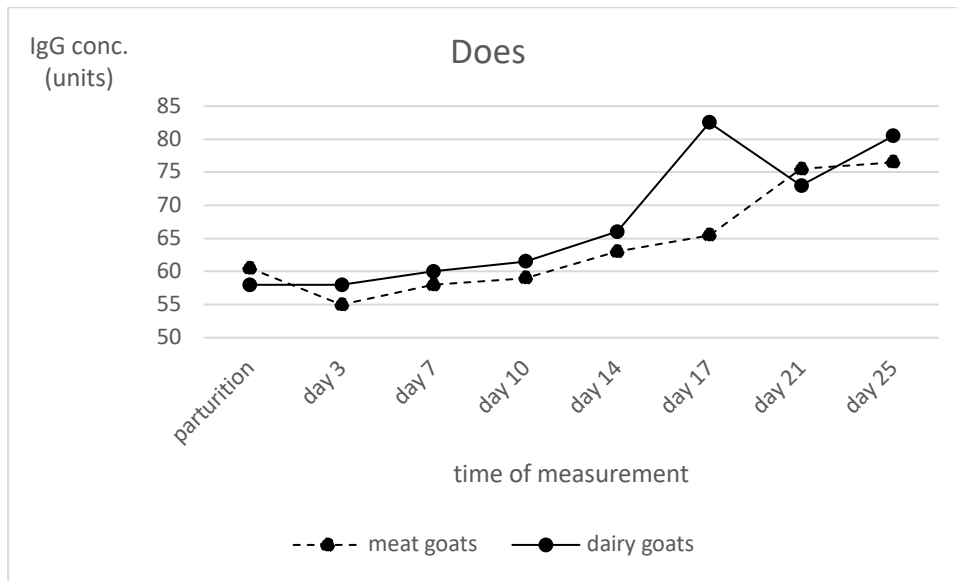


Figure 7 Median IgG-concentrations in Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn does (N=11, full line)

In the kids, average IgG-levels were 91.2 and 100.7 units (p50: 93.5 and 76.5 units) respectively for dairy and meat goats.

In meat goat kids, IgG increased until day two to a level of 142.9 and then decreased until the end of the time of measurement, to a level of 49.1 units. The dairy goat kids not only started with lower levels but reached an average concentration of 146.7 units, before the levels dropped to 39.8 units at the end of the trial.

The difference between breeds was only significant ( $p < 0.05$ ) on day 26 post partum, when checked with Wilcoxon's test as mentioned above (Fig. 8).

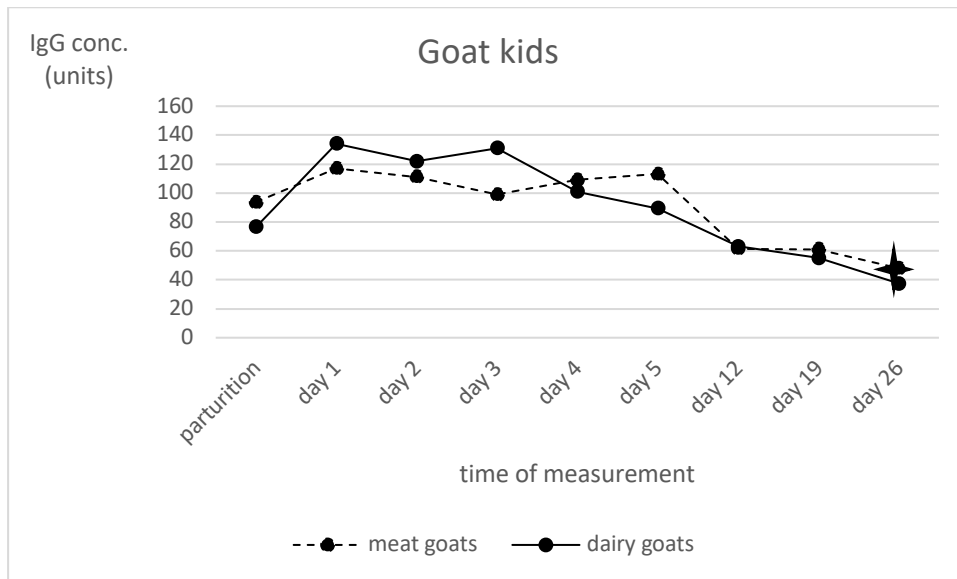


Figure 8 Median IgG-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisk marks significant difference ( $p < 0.05$ ) on day 26

The kids who hadn't suckled their dams before sampling showed a clear significant difference in IgG-concentrations compared to those who had uptaken colostrum already (Tab. 3).

Table 3 Average PAG, IgG and IgM concentrations in unsuckled goat kids on the day of parturition compared to kids having uptaken colostrum

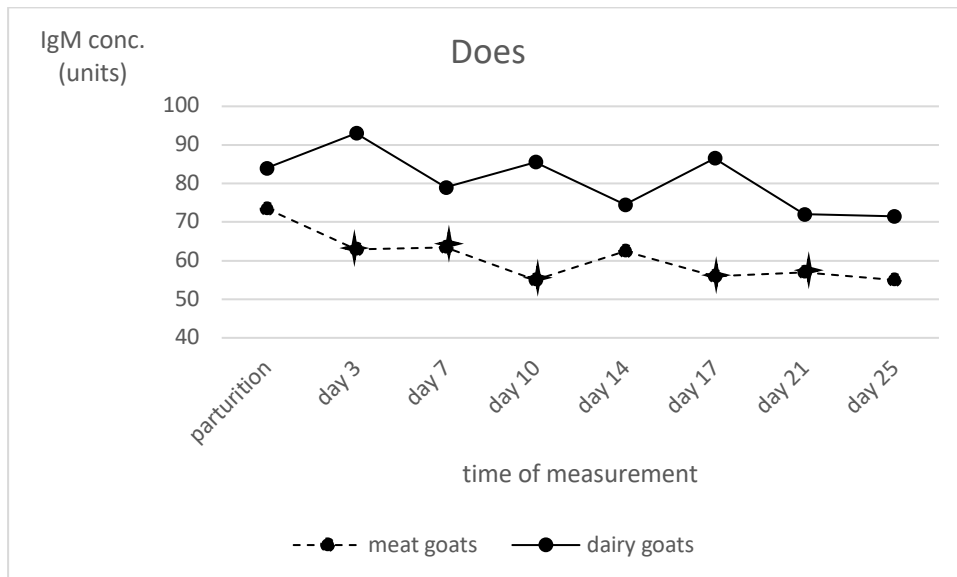
Animals	PAG	IgG	IgM
unsuckled	0.43 ng/ml	7 units	10 units
suckled	1.53 ng/ml	104.5 units	86.6 units

Sex of the kids, litter size and breed did influence IgG concentrations in kids ( $P > 0.05$ ), although this effect was not significant. 6 kids died throughout the trial; one more was excluded because of severe weakness. Those kids didn't show significantly different patterns of IgG compared to the healthy kids who completed the trial.

*IgM:*

Average IgM values slightly decreased from 73.3 and 88.6 units at the day of parturition to 59.9 and 76.4 units at the end of the trial for meat and dairy goats respectively.

As used for statistical analysis, median levels of IgM in dairy goats stayed higher than those in the meat breed throughout the trial and ranged between 84 and 71.5, showing a small decrease. Levels in meat goats range from 73.5 to 55 at the end of measurements. The does showed significant differences between meat and dairy goats at nearly all times of measurement (day 3, 7, 10, 17 and 21) concerning IgM levels (Fig. 9).



*Figure 9 Median IgM-concentrations in Boer does (N=12, dotted line) and Improved Fawn does (N=11, full line), asterisks mark significant ( $p < 0.05$ ) differences within each sampling time*

Average IgM levels increased from 47.4 and 109.2 units at parturition day to 76.6 and 145.2 units on day 2 for meat and dairy goat kids respectively. They then decreased to levels of 30.6 and 34.4 at the end of the measurement period. Median (p50) values

were 40 and 70.5 units on parturition day, a peak of 70 and 159 units for meat and dairy goats respectively and 26 and 34.5 units at the end of trial.

Differently than with IgG, IgM showed significant differences between the two breeds except for the first and the last time of measurement. The levels in dairy goat kids were much higher and then decreased rapidly (Fig. 10).

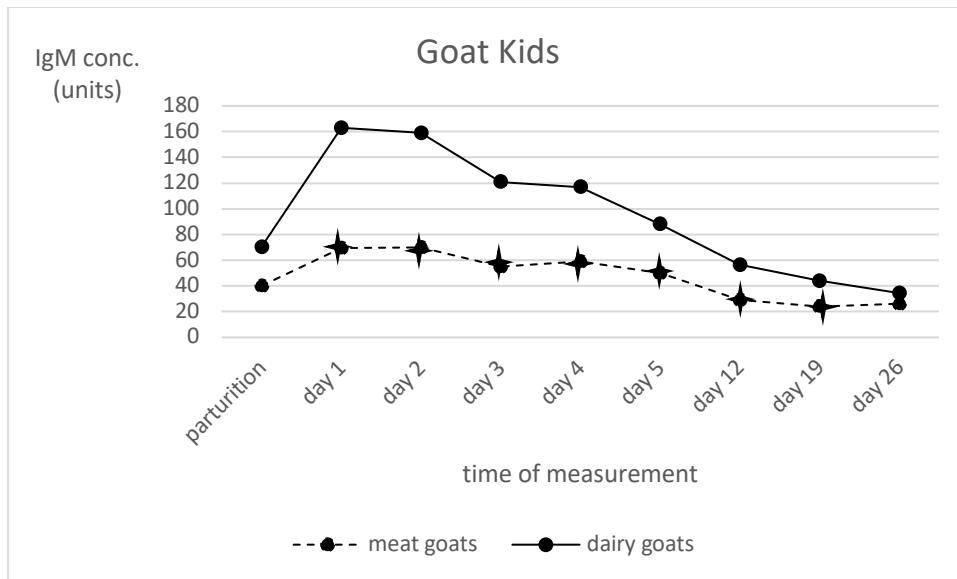


Figure 10 Median IgM-concentrations in Boer goat kids (N=22, dotted line) and Improved Fawn kids (N=22, full line), asterisks mark significant differences ( $p < 0,05$ )

Like IgG, the levels of IgM were significantly lower in kids who hadn't suckled their dams before sampling (Tab. 3). Litter size and sex did not have a significant effect on IgM-levels, neither in the dams nor in the kids.

#### 7.1.4.3 Correlations between pregnancy-associated glycoproteins, Immunoglobulin G and M:

##### IgG and PAG:

In the does there were at some time of measurements – mostly positive - correlations but with high p-values of  $p > 0.1$ . Strong positive correlations ( $r > 0.5$ ,  $p < 0.05$ ) of IgG and PAG were found in the goat kids. This was quite dominant for the meat goat

kids, for it could be seen at measuring times 1-5. In the dairy goat kids this was the case at point 1, 3 and 7, while the rest of the values did not show a clear tendency.

#### *IgG and IgM:*

Likewise, correlations between IgG and IgM were found at only some sampling times. The Boer goat kids showed positive correlations at day 0, 19 and 26, while the rest of the values stayed in mild positive space. The improved fawn kids on the other hands presented strong positive correlations at days 1-4. Too, the rest of the samples were positively correlated to each other.

Again, the does didn't show any clear tendency. Most of the R-values were weak and switched between positive and negative correlations.

#### *IgM and PAG:*

IgM and PAG did not show stable correlations. The meat goat does had only at one time of measurement a positive correlation, the dairy goats at two points a negative one. In the kids, there were two times each with a positive correlation and a corresponding p-value of  $<0.05$ .

### **7.1.5 Discussion**

Regarding the question of breed differences in PAG-concentrations the dairy breed shows a more rapid decrease in PAG after starting at higher levels. This latter effect was not always statistically significant. Although it was not the fact for all times of measurement it still shows a clear tendency.

In the work of De Sousa et al. (1999), no breed differences were found concerning PAG-concentrations, but this study was conducted on native goats of Brazil which did not undergo specialized breeding for milk or meat yield. Roberts et al. (2017) did not find significant differences concerning breed either, their study was conducted on sheep. In contrast, Ranilla et al. (1994) found breed differences in PAG-concentrations in sheep.

The advantage of our work was the inclusion of two very different breeds of goats in one trial so we could prevent influences by different assay- and antibody-use which otherwise aggravate the comparability of studies.

Lopez-Gatius et al. (2007) showed declining PAG-levels in combination with increasing milk yield in dairy cows during pregnancy. This was explained with the higher metabolic rates and thus clearance of PAG from the blood and with the possibility of clearance of PAG via milk. These latter findings and explanation are useful for our cause as well: The more rapid decline of PAG in dairy goats could be due to their higher metabolism rate and thus degradation of PAG at a high level. Too, there is a higher loss of PAG via milk. This is supported by the findings about breed differences in goats of Silanikove et al. (1986). Sangsritavong et al. (2002) found higher liver blood flow levels associated with high dry matter intake in lactating dairy cows. Thus, lactation not only involves higher dry matter needs but could cause higher excretion rates of PAG as well through catabolism and excretion via milk. And as the Improved Fawn goats produce noticeable higher amounts of milk (850-1200kg) than the Boer goats (500kg (Casey u. Van Niekerk, 1988)), this would explain differences in PAG-decline post partum. Another support to the thesis of metabolic differences between goat breeds is given by De Souza Castagnino et al. (2015), who found higher fat retention and higher concentration of non-esteric fatty acids in Oberhasli goats compared to Saanen goats, who are known to have a very high milk yield (up to 1200kg).

The fact, that goat kids can be born with measurable levels of PAG and the uptake of PAG via colostrum is consistent with the findings of Haugejorden et al.(2006).

Supposing that nature is not installing metabolic processes which aren't needed, the PAG are very likely to play a role in the neonates' organism. The dairy goat's more rapid decline of PAG-concentration post partum shows up in the kids as well which puts into question whether there is a general difference in metabolic rates between the two breeds independent from feed intake and milk yield. Interestingly, healthy goat kids started with significant higher PAG levels at birth than those later affected by illness. This is another hint to the still unclear role of PAG in the neonates' immune system.

Only in the past few years the concept of the dense ruminant's placenta dissolved. Our results show that goat kids are not born agammaglobulinemic, but already have small, but measurable amounts of IgG and IgM in their blood flow. These must be transferred through the placenta ante partum.

As we did not receive absolute but relative amounts of IgG and IgM, the comparability to other studies is limited. Still, the rapid increase of IgG-concentration in the neonates' plasma and the following small decline is consistent with the findings of Chen et al. (1999) and Rodriguez et al.(2009). Slight differences can always be due to examination methods and handling of samples. The post-partum rise of the does' IgG blood concentration has been shown in an early work by Micusan and Borduas (1977) and can be explained by less IgG-transport into the mammary gland post partum (ante partum, IgG is massively accumulated in the colostrum secretion).

For the IgM-values there was a clearly significant difference between the dairy and the meat breed which is different to the IgG immunoglobulins. As this was the fact for does and kids, the latter are likely to have obtained them by higher concentrations in colostrum. The rise of concentration until day 1 after parturition differs from the tendency found by Rodriguez et al. (2009), but their work provides another interesting information: colostrum containing higher amounts of IgG supported IgM-absorption in the goat kids. So perhaps, the colostrum of the Improved Fawn goats in our trail contained very large amounts of IgG in addition to high IgM-levels.

The description of concentrations of IgG and M and PAG in the post-partum period of goats was just one aim of our study. Analyzing other factors, we couldn't find significant influence of sex and litter size on the concentration of the three variables. Concerning this subject, results of other studies differ from only small effects to significant influence of litter size (Chentouf et al., 2008; Gonzalez et al., 2000; Shahin et al., 2013). But these studies were done in the pre-partial period where the influence of placental secretion is crucial.

Our last point was elucidating the potential connection between PAG and the immunoglobulins G and M. But the calculated correlations don't give cause to find this a striking link in the does. The meat goat kids showed a strong correlation of

PAG and IgG in the first five days, in the dairy goat kids this effect was not as strong, but visible. One possible explanation is PAG passing the „open“ intestinal barrier like IgG and M do. For the passing of IgG, at least, there is proof of a special receptor on the bovine neonates intestinal epithelium, called FcRn (Lack, 2006). We would suggest the possibility of an equivalent receptor for the uptake of other proteins such as PAG. Too, an unspecific uptake via neonatal gut epithelial cells is possible. Another possible effect could be a stimulation of PAG-uptake via high IgG-concentrations in colostrum, equivalent to the one found for IgM by Rodriguez et al. (2009).

The fact, that PAG are present in the newborn at birth and even increase with colostrum uptake strongly hint to a role in the neonates' organism. The often-mentioned fact that some PAG could still be active proteases underline this presumption.

Effects on lymphocyte activity seem to be possible (Hoeben et al., 1999) and don't have to be restricted on the doe's organism. Although: Discussed (Dosogne et al., 1999) immunosuppressive function does not make sense as much for a vulnerable neonate as for the pregnant doe to prevent embryo rejection. This is supported by Serrano et al. (2009), who provide a possible explanation for PAG's immunosuppressive function: In their study, crossbred calves provoke higher levels of PAG, which could be due to higher effort of the mother's organism to not reject the embryo due to greater genetic difference.

Although correlations weren't that compelling still there seems to be a connection between PAG and immunoglobulin concentrations in newborn goat kids. Especially the postpartal rise of PAG in the neonates' plasma hints to an important role of PAG in the newborn. To ensure these assumptions studies with greater numbers of animals should be conducted.

*IgG and IgM ELISA:*

The newly set up ELISA for the measurement of IgG and IgM in goats worked out. Still there is potential for improvement, especially in the IgM measuring. The intra assay variance of this test was quite poor, though over all microtiter plates, the measuring showed reasonable results. The next steps would be to identify disruptive factors and to eliminate them to a certain extent.

Advantages of our system is the fact that it can be set up in any ELISA laboratory and is a less expensive alternative compared to ready-to-use kits for the analysis of IgG and M in the caprine. Secondly, we estimate it to be more precise than electrophoresis splitting of gamma globulins. Adaptations for other matrices (like milk) should be possible.

## **7.2 Post-partum pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and immunoglobulin G and M plasma concentration in sheep and their offspring: comparison of two different breeds**

### **7.2.1 Abstract**

In this work, the plasma levels of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) were measured in postpartum Black-headed mutton sheep and East Friesian dairy sheep and their offspring using an existing ELSA protocol. To estimate IgG and IgM concentrations, a new ELSA protocol was developed. The 12 dairy sheep, their 19 lambs and the 14 Black-headed mutton sheep and their 22 lambs were housed on two different farms and sampled directly after birth until four weeks post partum.

PAG values in the ewes started with mean 33.7ng/ml and 24.8ng/ml for meat and dairy sheep, respectively, and then dropped to a mean of 1.9ng/ml and 1.4ng/ml for meat and dairy breeds respectively in week four post partum. At days 7-17, the dairy sheep showed significantly lower levels of PAG than the meat breed. In the lambs, mean PAG-levels of 4.1 ng/ml were measured at birth, which slightly increased on day 1 post partum and then dropped to unmeasurable values after day 5. A significant difference as in the ewes was only found on day 5 post partum, with this time the meat breed lambs having the lower level of PAG.

The measurement of immunoglobulin M was aborted due to methodological problems. Immunoglobulin G levels were generated as equivalent units compared to a pooled plasma. In the ewes, IgG values differed between 52 and 74 units and there was only at the last point of measurement a significant difference in the IgG-plasma-concentration of the dairy and the meat breed. IgG-concentration in lambs rose on day 1 after parturition and then decreased over the four weeks to a mean of 40.2 and 34.3 units for meat and dairy breed respectively. There was no significant difference between the two breeds.

In the Friesian ewes, there were strong correlations ( $r \geq 0,7$ ) on days 7, 17 and 25 between IgG and PAG, which could not be seen in the meat breed. In the meat breed lambs, there were positive correlations ( $r \geq 0,5$ ) between IgG and PAG from day 0 to day 5, which could not be seen in the dairy lambs.

This work shows a detailed description of trajectory curves for PAG and IgG in postpartum ewes and lambs. The developed IgG-ELISA is a useful tool for researchers and laboratories. Breeding focus on milk or meat shows impact on both parameters, which should be discussed further. As well, the possibility of PAG's influence on the immune system is debated in this work.

### **7.2.2 Introduction**

Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) are a group of proteins which belong to the aspartate proteases. They are secreted by the binucleate cells which form in the trophoctoderm during pregnancy and reach the blood circulation of the mother (Sasser et al., 1986). PAG can be detected in blood as well as in milk (Gonzalez et al., 2001), but the patterns of concentration during pregnancy and post partum vary between species.

PAG-levels in goats reach their peak at around 10 weeks of pregnancy and then slowly decrease until parturition (Gonzalez et al., 2000). In ewes, PAG can be securely found from week 3 after fertilization on, thereafter they increase until week 9, show a slow decrease and then increase again until parturition (Ledezma-Torres

et al., 2006). The dimension of this last increase is largely depending on the breed (Ranilla et al., 1994). In goats and ewes, the PAG concentrations return to basal levels until about week 4 after parturition, whereas in cattle it takes about 100 days (Zoli et al., 1992). Detection cut-off values vary between different measuring techniques due to a vast glycosilation pattern of different PAGs and the cross-reactivity of PAG-antibodies in ELISA and RIA-systems.

PAG are transmitted to the fetus in utero and to the neonatal via milk (Haugejorden et al., 2006). Born with a measurable concentration of PAG, the lambs show an increase of PAG-concentration in the blood after being fed with colostrum. After a peak is reached around day 2 post partum the concentration decreases in the following days until reaching the basal level. As shown by Haugejorden et al., PAG-levels in lambs are highly variable while goat kids have more consistent levels within their group.

After their discovery, PAG were named and assorted into groups depending on their molecular weight, the species they were found in and the time of pregnancy in which they are secreted. With the aim to detect pregnancies at a relatively early stage, several methods for the detection of PAG have been developed. The most common test has been the radioimmunoassay, which can be conducted with either heterologous or homologous antibodies (Batalha et al., 2001). This is possible because ruminants' PAGs are evolutionary closely related (Green, 2000, Garbayo et al., 2000). Different antibodies show slightly different patterns of PAGs (Shahin et al., 2013; Perenyi et al., 2002).

An alternative identification tool to the radioimmunoassay, the ELISA, is more convenient because no radioactive material is needed. Therefore, ELISA-systems are widely used for pregnancy detection, especially in cows. Beside the detection of pregnancies, PAGs are furthermore useful as a direct marker of embryonic well-being.

There are five known isotypes of immunoglobulins in mammals, which are soluble proteins belonging to the acquired immunity. They are produced by antigenically stimulated B-Lymphocytes. IgA works basically on body surfaces, e.g. oral mucosa

(Pahud u. Mach, 1970), IgD stays mostly restricted to B-Cell's surface and is not found in all mammals (Zhao et al., 2002) and IgE is an important factor in allergic reactions and defense against parasites. During an immune response, IgM is the first immunoglobulin to be produced after antigen contact. In secondary responses, they are followed by IgG, this sequence is called "isotype switch". They neutralize antigens and mark them for elimination, e.g. through opsonization and agglutination.

Possessing a synepitheliochorial and thus quite impermeable placenta, neonates of ruminants are born nearly agammaglobulinemic (Horn, 2013). They are dependent on colostrum uptake for receiving all vital substances which pass through the intestinal barrier before gut closure. IgG is the most important fraction of antibodies in colostrum from a quantitative point of view (Chniter et al., 2016). Abundant colostrum uptake protects the newborn until its own immune system is developed properly (Sawyer et al., 1977).

In the present study, the post parturient decrease of PAG in the plasma of ewes are compared for a dairy and a meat breed. Thereby, PAG-concentrations in the plasma of the lambs were taken to evaluate the transfer of PAG in utero and post partum via colostrum to the lambs' metabolism and show the development until four weeks postpartum. IgG in ewes and lambs were measured to find potential interrelationships which would underline the speculation about an immunologic function of PAG (Wooding et al., 2005). For this purpose, we developed a new IgG-ELISA for sheep' plasma. The creation of an IgM-ELISA had to be aborted due to methodological problems.

### 7.2.3 Material and Methods

#### *Animals:*

12 East Friesian dairy sheep and their 19 offspring (12 female, 7 male), raised on a commercial organic farm, were compared to 14 Black-headed mutton sheep and their 22 offspring (10 female, 12 male), located at the Department of Animal Science, University of Göttingen, Germany. Both groups contained nulli- and pluriparous ewes. They were group housed in pens with straw bedding and received water and hay ad libitum. Additionally, both groups were fed about 1kg of concentrate per day.

Directly after parturition, litter size, sex and weight of the lambs were recorded.

During the study, the meat breed lambs were allowed to suckle their dams. The dairy sheep lambs were separated 5 days after parturition into lamb-pens in groups of 5-10 and fed with fresh cow milk ad libitum. The dairy sheep were then milked twice a day.

All throughout the trial, the lambs were checked for signs of deficient suckling, weakness or fever and if so, on that days not sampled to not strain them any further.

#### *Blood sampling*

Immediately after parturition, the blood samples of the ewes were taken by venipuncture (5 ml Terumo syringe, BD Microlance, 0.7 x 0.3 mm) of the Vena Jugularis and collected into 5 ml EDTA-tubes (Sarstedt, Germany). The lambs were bled by venipuncture (2 ml Terumo syringe, BD Microlance, 0.7 x 0.25 mm) of the V. jugularis and the blood was filled into 2 ml EDTA-tubes (Sarstedt, Germany). The samples were stored at 4°C until centrifugation at 3000 rpm for 10min. The obtained plasma was frozen at -20°C until analysis.

The sampling was continued in ewes twice a week for 4 weeks post partum (day 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 25). Blood samples of the lambs were taken immediately after birth and daily until 5 days post partum, then weekly for 3 consecutive weeks (day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 13, 21, 28).

There were 6 dairy lambs and 4 meat breed lambs sampled before colostrum uptake.

### *PAG analysis*

Plasma samples were analyzed for PAG with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described by Shahin et al. (2013) for goats. The microtiter plates used were covered with a sheep-anti-rabbit antibody for capturing. Anti-caPAG antibody AS#706 was used for specific binding (caPAG<sub>55+62kDa</sub>) and purified bovine PAG (boPAG<sub>67kDa</sub>) as standard and biotin-labelled tracer.

Briefly, the microtiter plates were coated with the sheep-anti-rabbit antibody and stored at -20° until use. Prior to analysis, the plates were warmed to room temperature and coated with heterologous anti-ca-PAG-dilution (1:150.000) incubating at 4°C overnight. Standards (ranging from 0,4 to 12,5ng/mL) for the calibration graph and samples were added to the plates and incubated overnight again at room temperature. After adding 50µl of tracer to every well (biotinylated boPAG<sub>67kDa</sub>, diluted 1:1000 in assay buffer) and an incubation time of 90 minutes the plates were washed (Columbus plus, Tecan, Germany) two times with phosphate-buffered saline (PBS) and 100µl streptavidin-peroxidase (50µg/ml) was added. After another 30 minutes of incubation, 150µl TMB (12.5 mg 3,3,5,5-Tetramethylbenzidine / mL Dimethylsulfoxid) was added. The color reaction was stopped by adding 50 µL of sulphuric acid (1 mol/L). Optical density was then measured with a photometer (450nm, Tecan Sunrise®, Germany). PAG-concentrations were calculated with the Magellan software (Tecan, Germany).

### *IgG and IgM analysis*

Immunoglobulin G and M in plasma were measured with a newly developed ELISA system. The microtiter plates, coated with 4µg/well of coating antibody, were incubated at 4°C overnight. The next day, the plates were washed and samples added in four steps of a logarithmic dilution, using 100µl per well. 100µl/well of detection antibody were added after a washing step and incubated for 45min. Tetramethylbenzidine was pipetted in the wells after the last washing step and incubated in the dark. Color reaction then was stopped with sulfuric acid.

For IgG-detection we used donkey anti-sheep IgG coating antibody, donkey anti-sheep IgG HRP (1:20.000) as detection antibody and sample dilutions ranging from 1:300.000 to 1:10.000.000.

Immunoglobulin M measurement followed the same scheme, using rabbit anti-sheep IgM antibodies. The samples were diluted in the range of 1:3.000 to 1:100.000. Detection antibody was used in the concentration of 1:60.000. All antibodies were purchased at AbD Serotec (BioRad Laboratories GmbH, Germany).

Obtained data from the IgG- and IgM-measurement were converted into units. We used a formula taking into account the degree of dilution, intercept and inclination of the curve and the average optical density, following the calculations of Gellermann (2006).

*Calculation of unit-values:*

$$\text{Units} = 100 \cdot \frac{10^{\text{Log}[Verd]}}{10^{(\text{Log}(OD) - \text{In})/s}}$$

dil: degree of dilution, OD: average optical density, In: Intercept, incl: curve inclination

*ELISA validation:*

To determine intra- and inter-assay variance of the new ELISA set-up, two test series were used: On five consecutive days, the same microtiter plate was prepared to receive reliable inter-assay variance data. This was done with different pool plasmas of each 10 healthy sheep and some single animal's samples. Intra-assay variance then was determined by pipetting the chosen pool and single plasma several times on the same plate.

The pool and the single plasma with the lowest standard deviation were used as standards for the whole experiment.

*Data analysis:*

SAS (SAS institute Inc., Cray, NC) was used for statistical analysis. Means, medians (50<sup>th</sup> percentile, p50) and standard deviations were calculated by MEANS-Procedure. Breed differences in PAG-concentrations on different sampling days were tested with Wilcoxon's-test (NPAR1WAY Procedure). Correlations between PAG, IgG and IgM were estimated with Pearson correlation coefficient (CORE Procedure).

**7.2.4 Results***7.2.4.1 Pregnancy-associated glycoproteins*

In the ewes, pregnancy-associated glycoproteins dropped sharply after parturition from very high levels (mean 33.7ng/ml and 24.8ng/ml for meat and dairy sheep respectively) to low, but still measurable values of PAG (mean 1.9ng/ml and 1.4ng/ml for meat and dairy breeds respectively) at the end of the experiment in week 4 post partum.

For the estimation of significant ( $p < 0.05$ ) differences between the two breeds, the Wilcoxon-test was applied, for the data wasn't distributed normally. At days 7-17 the dairy sheep showed significantly lower levels of PAG than the Black headed mutton sheep (Fig. 11).

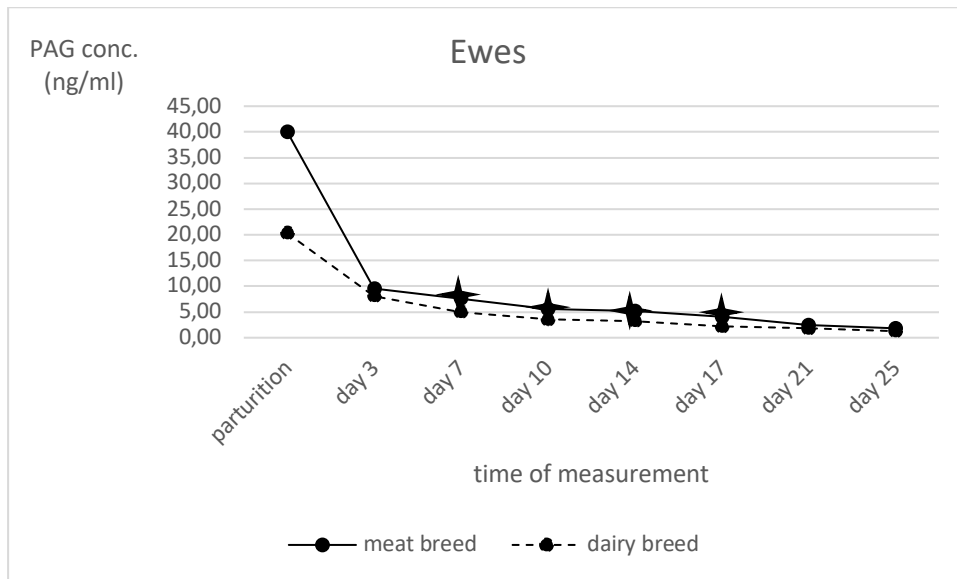


Figure 11 Median PAG concentration of Friesian sheep ewes (N=12, dotted line) and Black-headed mutton sheep ewes (N=14, full line), asterisks mark significant ( $p < 0.05$ ) differences within each sampling time

The lambs started with mean PAG-levels of 4.1 ng/ml which then slightly increased on day 1 post partum. Afterwards they dropped to unmeasurable values after day 5. Still, some of the lambs kept detectable amounts of PAG until the end of the experiment.

Using median values for the Wilcoxon-test, graphs show a slight difference to this with increasing levels on PAG until day 2 post partum in meat breed sheep, whereas in the dairy sheep, the values decreased already on that day. A significant difference as in the ewes was only found on day 5 post partum, with this time the meat breed lambs having the lower level of PAG (Fig. 12).

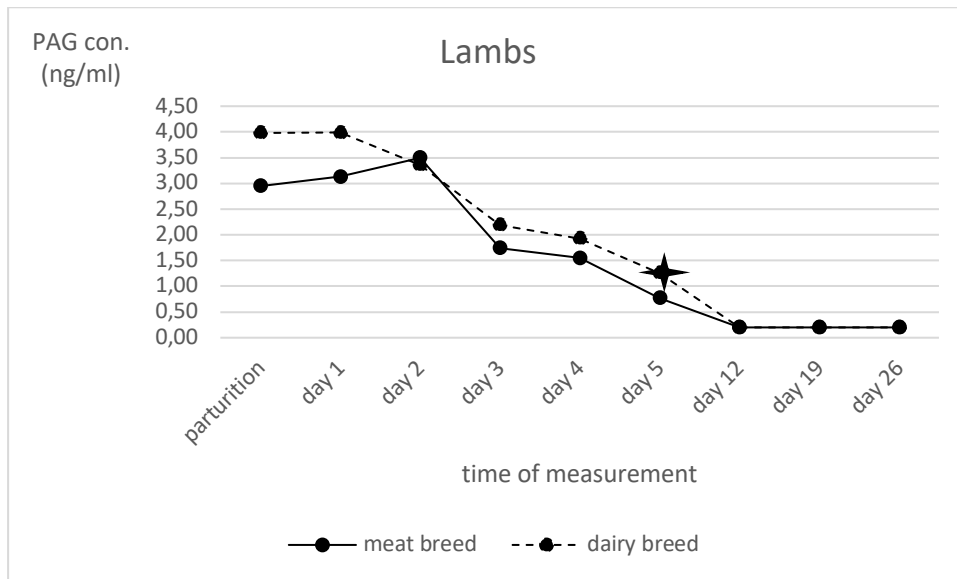


Figure 12 Median PAG-concentrations in Friesian lambs (N=19, dotted line) and Black-headed mutton lambs (N=22, full line), asterisk marks significant ( $p < 0.05$ ) difference

Lambs who were excluded from the experiment because of signs of illness or weakness did not show significantly different levels of PAG prior to exclusion. The sex of the lamb and litter size didn't have a significant influence on PAG-values. Those individuals, who were sampled before colostrum uptake showed significantly lower PAG-levels (see Tab. 4).

#### 7.2.4.2 Immunoglobulin G and M

##### *IgG*

The standard deviation for inter-assay variance was 10 units and 23 units for the pool and the single animal's sample respectively. The standard deviation for intra-assay variance was 24 units for the pool and 10 for the single plasma.

##### *IgM*

The ELISA for the measurement of IgM did not produce reasonable results. The blank value stayed very high even though different blocking agents (Bovine serum albumin, rabbit's serum, fish gelatin) were used. Standard deviations determined in preliminary experiments for inter and intra assay variance could not be verified in the rest of the experiment. So, the measurement of IgM with this ELISA set-up was aborted.

*Immunoglobulin values in ewes and lambs:*

The ewes started with a median of 65 and 54 units of IgG for dairy and meat breed respectively. Maximum levels at parturition were 109 and 103 units for the respective breed. The dairy sheep showed a small decrease to the 3rd day after parturition and then an increase to a median of 74 units in week 4. The Black-headed mutton sheep had a slight increase until week 2 and then decreased back to a quite steady state around 55 units. Only at the last point of measurement the two breeds showed significant differences in the IgG-plasma-concentration (Fig. 13).

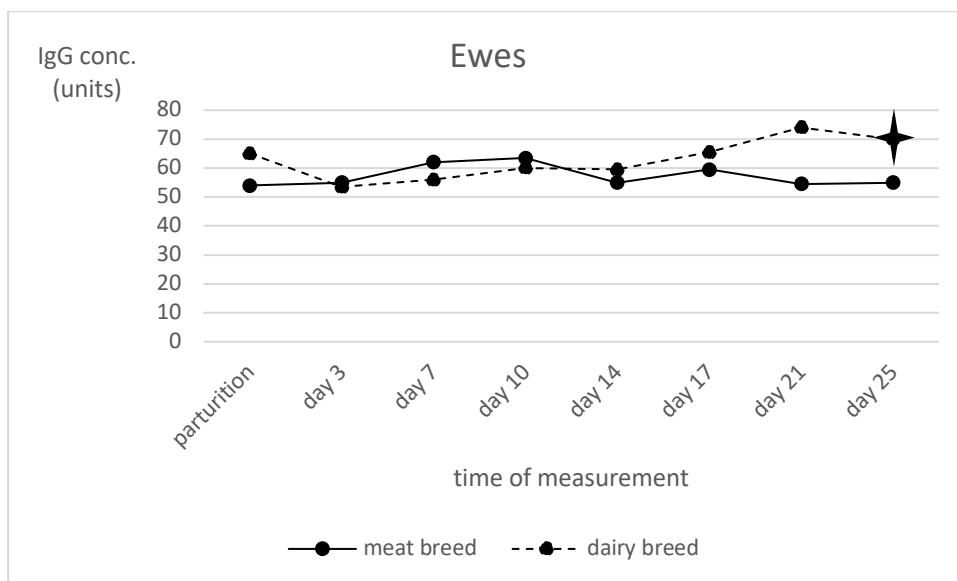


Figure 13 Median IgG-concentrations in Friesian sheep ewes (N=12, dotted line) and Black-headed mutton sheep ewes (N=14, full line), asterisk marks significant ( $p < 0.05$ ) difference on day 25

The lambs in both breeds showed a rise of IgG-concentration on day 1 after parturition and then a slow decrease over the four weeks to a median of 37.5 and 34 units for meat and dairy breed respectively. There was no significant difference between the two breeds (Fig. 14).

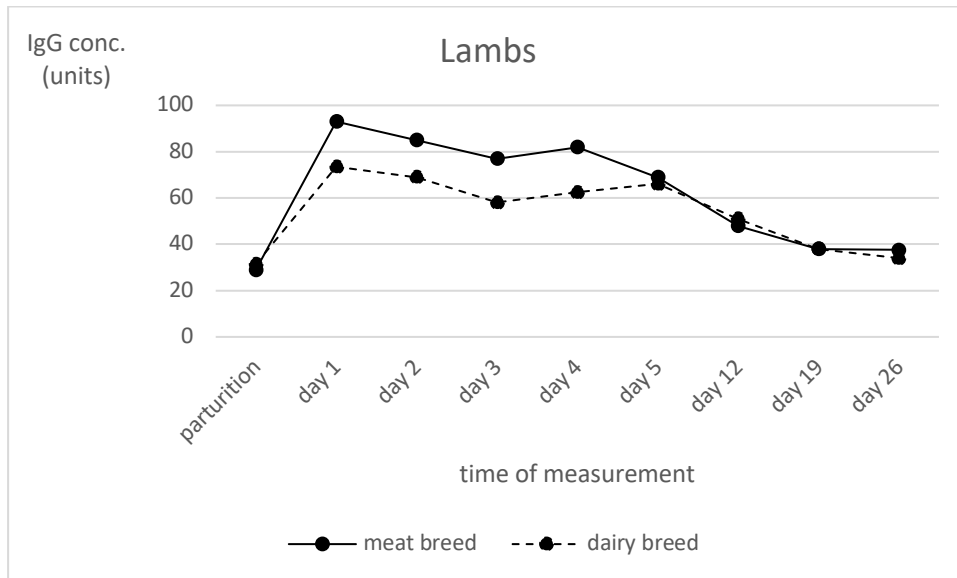


Figure 14 Median IgG-concentrations in Friesian sheep lambs (N=19, dotted line) and Black-headed mutton sheep lambs (N=22, full line)

Sex of the lambs did not influence the IgG-concentration significantly, but litter size did on day 0-3 post partum and on day 12. Those lambs, who were sampled before colostrum uptake showed significantly lower levels of IgG (Tab. 4). In contrast, lambs with signals of illness as mentioned above did not show significantly different plasma IgG-values.

Table 4 Average PAG and IgG concentrations in lambs on the day of parturition with and without colostrum uptake prior to sampling

Animals	PAG (ng/ml)	IgG (Units)
unsuckled	3.2	6
suckled	4.2	56.3

#### 7.2.4.3 Correlations between IgG and pregnancy-associated glycoproteins

In Black-headed mutton sheep ewes no strong correlations between the two variables could be found, R-values ranged mostly around 0. In contrast, in the Friesian ewes, there were strong positive correlations ( $r \geq 0.7$ ) on days 7, 17 and 25 between IgG and PAG, but only on three occasions having a p-value  $< 0.05$ .

In the meat breed lambs, there were positive correlations ( $r \geq 0.5$ ) between IgG and PAG from day 0 to day 5 ( $p < 0.05$ ). This could not be seen as strong in Friesian sheep lambs. Their R-values started with 0.5 on day 0, too, but then decreased.

#### 7.2.5 Discussion

Special about this work is the estimation of PAG and IgG directly after parturition with follow up for four weeks in ewes as well as in lambs comparing two different breeds with distinct field of use and corresponding breeding focus. In addition, we developed an ELISA for the measurement of IgG in sheep.

As we suggested, PAG levels in the ewes differed significantly between the two tested breeds of sheep. This was the case in the middle of the time of measurement: At birth, the ewes started with very high, plateau-like values and at the end of the four-week-period, reached the unmeasurable space. But in between, the differences in metabolic processes may become visible: Iason et al. (1994) showed in their work a significant difference of maintenance metabolic rate in sheep between three different breeds. Likely, the Friesian sheep as a dairy breed, have a genetically fixed increased metabolic rate compared to the meat breed of the Black-headed mutton sheep. As well, milk production and requisite abundant dry matter intake may enhance liver blood flow and metabolic processes to an extent, that PAG is removed faster from the circulation. This is supported by the findings of Parr et al. (1993), where progesterone was cleared significantly faster after higher food intake. Sangsritavon et al. (2002) found a more rapid decrease in blood steroid concentrations in lactating dairy cows than in non-lactating and an increase in steroid metabolism associated with forage intake.

Surprisingly, the significant differences between breeds did not show in lambs. This could support the thesis of lactation and amount of milk produced being crucial for the decrease of PAG-blood-concentrations. The fact that lambs seem to absorb PAG from the colostrum (increasing levels on day 1) is as interesting as that they are born with measurable levels of PAG. This is consistent with the findings of Haugejorden et al. (2006) and underlines the still quite new concept of a less dense ruminant's placenta.

Speaking of the possible influencing factors like litter size and sex, we could not detect a significant influence on PAG values in contrast to e.g. Vandaele et al. (2005) who, too, found breed differences, but the influence of litter size as well. This is always reasonably explained by a bigger amount of placental tissue with twin bearing ewes, producing more PAG. (Thus, it is not that surprising we did not see it post partum, when placenta wasn't involved in PAG-metabolism anymore.) Ledezma-Torres et al. (2006) did not find an influence of breed on PAG-concentrations and reasoned, the use of a heterologous antibody would balance the results and make them less vulnerable to various factors.

Finding measurable levels of IgG in the lambs contradicts the hypothesis of ruminants being born agammaglobulinemic: Immunoglobulin G has to pass the placenta in small amounts ante partum. The post partial rise of IgG was expectable for it is absorbed out of colostrum what we know for a long time now and which is proven by a lot of different studies. Breeds didn't have a significant influence on IgG-values, neither in lambs nor in the ewes, which is consistent with the work of Klobasa and Wehrhahn (1989).

Interestingly, especially the lambs showed strong positive correlations between IgG and PAG at the first days of the trial. This could support the thesis, that PAG play a role in the neonates' immune system. But, most suggestions see an immunosuppressive role (Wooding et al., 2005). This would not make sense for a vulnerable newborn and does not correspond to the positive correlations with IgG-plasma concentrations we found. More likely, PAG could enhance IgG-uptake through the intestinal barrier – or vice versa. As well, ewes who had higher IgG-

concentrations in their colostrum could have accumulated more PAG in it. Another possible explanation is some lambs absorbing all necessary ingredients of colostrum very well in contrast to those having deficits in uptake or absorption.

We didn't succeed in setting up the ELISA for measurement of IgM in sheep. All attempts to block out the high blank values failed: Fish gelatin and rabbit serum showed only small effects compared to assays without blocking agents. Bovine serum albumin (BSA) even made it worse and blocked out any specific reaction. Assay of sheep IgG in contrast still showed a relatively high variability but presented reasonable results. Some work has to be carried on further to improve IgG-ELISA for sheep and to resolve the problems preventing the IgM-Assay from running. Still, the newly set-up IgG-ELISA is an affordable and handy alternative to ready-to-use-kits for IgG-estimation in sheep, which are quite expensive, and it should be possible to carry it out in any experienced ELISA-laboratory.

## 8 Diskussion

### 8.1 Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine

#### 8.1.1 Nutzen der Bestimmung der Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteine

Zur Bestimmung von PAG aus Blut und Milch verschiedener Spezies gibt es zahlreiche Untersuchungen.

Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine können allem voran als Trächtigkeitsindikator genutzt werden. Aufgrund der wirtschaftlichen Relevanz einer frühzeitigen Trächtigkeitsdiagnose in Nutztierbeständen lag hier häufig auch der Schwerpunkt der Forschung: Zu welchem Zeitpunkt lässt sich bei der jeweiligen Tierart eine Trächtigkeit sicher feststellen oder ausschließen? Und sind PAG als Indikator ggf. anderen Trächtigkeitsparametern überlegen?

Gegenüber der Progesteronmessung sind Konzentrationen von PAG ab einem bestimmten Cut-off-Wert der direkte Nachweis einer funktionierenden Plazenta. Hohe Progesteronwerte können hingegen etwa auch auf einen persistierenden Gelbkörper hinweisen. Bei kleinen Wiederkäuern ist außerdem eine rektale Palpation zur Identifikation einer Gravidität nicht praktikabel. Hier sind ein Bluttest oder der Nachweis aus Milch eine gute Alternative.

Arbeiten, die verschiedene Methoden zur Trächtigkeitsbestimmung vergleichen, zeigen die gute Verlässlichkeit des PAG-Nachweises für die Detektion tragender Tiere (El Amiri et al., 2015; Ricci et al., 2015; Gonzalez et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der Nutzung von PAG ist die Darstellung der Plazentafunktion. So zeigten z.B. Zarrouk et al. (1999), dass bei Infektion von Ziegen mit den Aborterregern *Toxoplasma gondii* und *Listeria monocytogenes* bereits am Tag nach der Infektion alternierende PAG-Werte auftreten. Dies geschieht, noch bevor das Muttertier abortiert oder andere Symptome sichtbar werden. Auch bei Milchkühen lässt sich so die Rate an embryonalen Fruchttoden genauer eingrenzen (López-Gatius et al., 2007) und damit von mangelnder Konzeption unterscheiden. An der Arbeit von Lopez-Gatius ist außerdem interessant, dass es einen Einfluss des ausgewählten Bullen auf die Zahl der Fruchttode zu geben scheint.

Weniger Erkenntnisse gibt es bisher über das Verhalten der Trächtigkeits-assoziierten Glykoproteine in der postpartalen Zeit und im Neonaten. Dabei ist dies gerade bei den zahlreichen diskutierten möglichen Wirkungen von PAG interessant.

### **8.1.2 Messmethoden für Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine**

Zur Messung des PAG stehen wie eingangs erwähnt, verschiedene Methoden zur Verfügung. Der gewählte ELISA war bereits für Rinder und Ziegen etabliert und wurde in dieser Arbeit auch für die Schafe verwendet, nachdem sich der für caprines PAG spezifische Antikörper als auch für Schafe funktional herausgestellt hat (Barbato et al., 2009).

### **8.1.3 Messzeitraum und Einordnung der Ergebnisse**

Da die meisten Arbeiten zur Erforschung der PAG sich auf die Diagnose der Trächtigkeit oder möglicher Probleme während der Gravidität fokussieren, liegt der jeweilige Messzeitraum in der Regel zu Beginn der Trächtigkeit oder verfolgt diese in Gänze bis zur Geburt. Dennoch gibt es bereits Arbeiten, in denen PAG-Werte bei Schafen und Ziegen post partum erhoben wurden:

Mierke et al. (2014) nutzten dafür ebenfalls Burenziegen, die sie ab fünf Tagen vor Ablammung bis 7-11 Wochen post partum beprobten, abhängig vom Absinken der PAG-Konzentration. Am Tag der Geburt wurde ein Mittelwert von  $13,89 \pm 0,51$  ng/ml ermittelt. Die PAG-Konzentration sank dann auf  $9,44 \pm 0,83$  ng/ml in der ersten Woche und auf  $3,84 \pm 0,48$  ng/ml an Tag 19. Im Mittel nach 33,8 Tagen sanken die PAG-Level unter 2 ng/ml. Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Korrelation zwischen Ein-/Mehrlingsträchtigkeiten und PAG-Konzentration konnte hier nicht gefunden werden.

Ledezma-Torres et al. (2006) ermittelten bei Schafen die PAG-Konzentrationen über die gesamte Trächtigkeit hinweg bis 4 Wochen post partum. Dafür verwendeten sie einen Antikörper gegen caprines PAG, ähnlich dem in der vorliegenden Untersuchung verwendeten, allerdings in einem Radio-Immuno-Assay-System. Außerdem verglichen sie in ihrer Arbeit Schwarzköpfige Fleischschafe, Rhönschafe

und Fleischschaf x Dorper-Kreuzungen miteinander. In dieser Untersuchung sanken die PAG-Konzentrationen der meisten Muttertiere post partum innerhalb von vier Wochen auf die Basalwerte vor der Trächtigkeit, nur etwa zehn Prozent zeigten Werte zwischen 4,2 und 9,0ng/ml. Von Woche 12 der Trächtigkeit bis zur Geburt fanden sich durchgehend signifikante Unterschiede zwischen Ein- und Mehrlinge gebärenden Auen. Post partum war dies nur noch am ersten Messzeitpunkt der Fall. Das Geschlecht der Lämmer und auch die Rasse der Tiere hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss.

Bei De Sousa et al. (1999) finden sich post partum ähnliche Verläufe der PAG-Konzentration im Muttertier wie in der vorliegenden Arbeit, einen signifikanten Einfluss der Ziegenrasse auf die PAG-Konzentrationen konnten die Autoren während der Trächtigkeit nicht ausmachen. Allerdings handelt es sich bei den dort verwendeten Ziegenrassen um ursprüngliche brasilianische Züchtungen, die für keine spezielle Nutzung gezielt gezüchtet wurden.

In einer frühen Arbeit von Ranilla et al. (1994) fanden sich bereits Einflüsse der Schafrasse auf die ovPAG-Konzentration. Wie in beinahe allen Studien traten auch hier signifikante Unterschiede zwischen Ein- und Mehrlingsträchtigkeiten auf. Dabei werden erhöhte PAG-Konzentrationen im Blut der Muttertiere in der Regel mit einer größeren plazentaren Aktivität (größere Plazenta, mehr Kotyledonen) zur Versorgung der Mehrlinge erklärt (El Amiri et al., 2014).

Die sicher umfangreichste Arbeit zur Messung von PAG in der postpartalen Phase stammt von Haugejorden et al. (2006). Vor allem wurden hier auch die Jungtiere in die Messungen mit einbezogen, was einen Vergleich mit dem vorliegenden Experiment möglich macht. Ähnlich unseren Ergebnissen stellten auch Haugejorden et al. fest, dass die neugeborenen Lämmer und Kälber bereits messbare Werte von PAG im Blut aufweisen – vor der Aufnahme von Kolostrum. Diese müssen also bereits in utero den Stoffwechsel des Fetus erreichen. Außerdem steigen auch in der genannten Arbeit die PAG-Werte der Neonaten nach Kolostrumaufnahme sprunghaft an, passieren also offenbar die Darmwand der Lämmer und Kälber in den ersten Lebenstagen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Schaf- bzw. Ziegenrasse auf die PAG-Konzentrationen in den Muttertieren in der postpartalen Phase. Dies war nicht zu allen Zeitpunkten der Fall: Zu Beginn der Messung direkt nach der Ablammung wiesen alle Muttertiere sehr hohe PAG-Werte auf, nicht selten mussten die Proben verdünnt und erneut gemessen werden, da die enthaltenen PAG-Mengen den Referenzbereich des ELISA überstiegen. Zum Ende des Messzeitraumes wurde dann ein Plateau auf sehr niedrigem Level erreicht, mit aber zum Teil immer noch messbaren Konzentrationen. Im mittleren Zeitraum der Messungen aber zeigten sich signifikante Rasseunterschiede. Bei beiden Tierarten bauten die Milchrassen die PAG schneller ab als die Fleischerassen. Bei den Ziegen war dies noch deutlicher sichtbar, da die Milchziegen höhere Werte direkt post partum aufwiesen.

Diese Unterschiede lassen sich über rassebedingte Unterschiede im Stoffwechsel erklären: Bei den Milchrassen ist, analog zur Situation bei Rindern, eine erhöhte Stoffwechselrate zu erwarten. Durch einen verstärkten Blutfluss zur Versorgung des Euters und zur Produktion größerer Mengen Milch könnte es zur vermehrten Verstoffwechslung der PAG im Organismus kommen. Außerdem ist durch die erhöhte Milchmenge eine stärkere Exkretion möglich. Da die Lämmer PAG aus der Milch aufnehmen, scheint es in nennenswerten Mengen (zumindest im Kolostrum) enthalten zu sein. Ein weiterer Einflussfaktor könnte die Fütterung sein: Da Milchziegen und -schafe post partum in der Regel intensiver gefüttert werden, steigt auch die Leberdurchflussrate, die als stellvertretender Parameter für die Stoffwechselrate verwendet wird. Eine höhere Futteraufnahme könnte also gleichfalls die Verstoffwechslung von PAG fördern. Parr et al. (1993) stellten bei Schafen eine erhöhte Progesteronclearance nach erhöhter Futteraufnahme fest. Sangsritavong et al. (2002) fanden schneller sinkende Konzentrationen von Steroiden im Blut im Vergleich von laktierenden mit nicht laktierenden Kühen und bei solchen mit höherer Futteraufnahme. Lopez-Gatius et al. (2007) konnten stärker sinkende PAG-Konzentrationen assoziiert mit steigender Milchmenge bei Milchkühen schon während der Trächtigkeit belegen. Und bei Iason et al. (1994) wurden signifikante

Unterschiede im Erhaltungsbedarf verschiedener Schafrassen festgestellt, die zudem nicht mit der Futteraufnahme korrelierten.

In der vorliegenden Untersuchung war der Einfluss von Ein- bzw. Mehrlingsträchtigkeiten und des Lämmergechlechts auf die PAG-Konzentration nicht signifikant, im Unterschied zu manchen bereits oben erwähnten anderen Arbeiten, aber konform mit Ledezma-Torres et al. Vermutlich liegt dies am Messzeitraum post partum, in dem die Plazentafunktion keine Rolle mehr spielt als Einflussfaktor auf die PAG-Konzentration.

#### *8.1.3.1 Konzentration von trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen in Neonaten*

Bei den Lämmern zeigte sie eine mit der Arbeit von Haugejorden et al. konsistente, messbare Konzentration von PAG direkt post partum. Auch vor der Kolostrumaufnahme beprobte Lämmer zeigen nachweisbare Mengen von PAG, die wiederum signifikant ansteigen, nachdem sie gesäugt wurden. Bei den Lämmern der Fleischziegen erreichen die PAG-Konzentrationen ihre höchsten Werte am Tag 1 nach der Geburt, bei den Fleischschafämmern sogar erst an Tag 2 post partum. Bei den Ziegenlämmern zeigt sich auch ein signifikanter Rasseunterschied ähnlich dem bei den Müttern. Nur bei den Schafämmern ist dieser Effekt nicht signifikant gewesen, außer an einem Messzeitpunkt. Dies deutet zumindest darauf hin, dass es grundsätzliche Unterschiede zwischen den Rassen geben könnte, die nicht an Fütterung oder Haltung gekoppelt sind. Die Leistung von Milchziegen wurde in den letzten Jahren züchterisch stark gesteigert, evtl. fällt der Effekt darum dort sichtbarer aus als bei den Schafen.

## **8.2 Immunglobuline G und M**

### **8.2.1 Etablierung der Messmethode**

Um die Bestimmung der Immunglobuline G und M mittels Gelelektrophorese im kommerziellen Labor und teure Test-Kits zu umgehen, wurde ein ELISA entwickelt. Dieser lässt sich nun im herkömmlichen ELISA-Labor pipettieren.

Eine besondere Herausforderung bei der Etablierung waren die hohen Blank-Werte durch unspezifische Bindung der Detektionsantikörper, insbesondere bei der IgM-Bestimmung aus Schaf-Plasma. Unspezifische Bindungen finden z.B. an der Plattenoberfläche, an Fremdproteine oder an den Coating-Antikörpern statt. Diesen wurde mit verschiedenen Blocking-Agenzien beizukommen versucht. Mit Fischgelatine und Kaninchenserum konnten nur leichte Verbesserungen erzielt werden. Letzteres war in der Literatur als Möglichkeit beschrieben, da es sich bei dem Detektionsantikörper um einen Kaninchenantikörper handelte (der laut mündlicher Aussage auch häufiger zu unspezifischen und Kreuzreaktionen neige als Antikörper anderer Herkunft). Der Versuch, die Blank-Werte durch die Verwendung von Bovinem Serum-Albumin zu senken, verursachte offenbar eine komplette Bindung der Antikörper und war damit ungeeignet. Warum ausgerechnet der Schaf-IgM-Antikörper derart hohe Blank-Werte zeigte, ist nach wie vor unklar.

Insgesamt sind die ELISA-Setups mit Sicherheit noch zu verbessern in Hinsicht auf Inter- und Intra-Assay-Varianz. Mögliche Fehlerquellen liegen neben dem handwerklichen Geschick der durchführenden Person in der Präzision und Reinheit der Geräte und verwendeten Materialien und insbesondere bei den Umgebungsbedingungen. So erschwerten im Zeitraum der Laborversuche trotz Klimatisierung des Raumes sehr hohe Außentemperaturen einen standardisierten Ablauf. Auch wurde z.B. der Plattenwasher für verschiedene Versuche verwendet – eine Verunreinigung ist selbst bei hygienischem Arbeiten letztendlich nicht zu 100% zu vermeiden.

Auf Probenseite könnten Matrixeffekte eine Verschlechterung der Ergebnisse verursacht haben. Neben der Bindung an nicht-Ziel-Proteine könnte es sich bei Plasma um ein nicht optimales Probenmaterial handeln; die Verwendung von Serum könnte bessere Ergebnisse liefern. Zudem waren die Plasmaproben durch den vorangegangenen PAG-ELISA bereits mindestens einmal aufgetaut und erneut eingefroren worden. Dies galt allerdings nicht für die zur Validierung verwendeten Pool-Plasmen. Das Abzentrifugieren zum Entfernen von z.B. größeren Zellresten und eine Verdünnung mit Testpuffer vor dem Einfrieren könnten zur Stabilisierung

beitragen. Ein Abzentrifugieren nach Auftauen wurde beim Probenmaterial probiert, hatte aber keinen sichtbaren Effekt auf die Testgenauigkeit.

### **8.2.2 Immunglobuline G und M im postpartalen Zeitraum**

Da die absoluten Gehalte an IgG und IgM in den Proben nicht bekannt waren, wurde mit Äquivalenzwerten/Units gearbeitet. Diese Methode hatte sich bereits in der Arbeit von Gellermann (2006) als funktional erwiesen.

Der starke Anstieg von IgG im Blut von Ziegenlämmern nach der Kolostrumaufnahme ist – wie auch der folgende leichte Abfall - vielfach beschrieben worden (Chen et al., 1999; Rodríguez et al., 2009) und auch für andere Tierarten bekannt. Dass die Lämmer bereits vor der Kolostrumaufnahme messbare Mengen von Immunglobulinen im Blutkreislauf aufwiesen, hat erst vor Kürzerem die These der agammaglobulinämisch geborenen Wiederkäuer ersetzt und wurde von unseren Daten untermauert. Der leichte Anstieg im Plasma der Mütter lässt sich mit der beendeten Kolostrogenese und damit dem sinkenden Transport von IgG in die Milchdrüse erklären. Dadurch steht es den Muttertieren wieder in größerer Menge zur eigenen Verfügung. Dies wurde auch schon von Micusan und Borduas (1997) beschrieben.

Signifikante Einflüsse der Rasse auf die IgG-Konzentration konnten weder bei Schafen noch Ziegen gefunden werden, analog zu Klobasa und Werhahn (1989). Allerdings war bei den Ziegen eine deutliche Unterscheidung zwischen Fleisch- und Milchrasse zu sehen in Bezug auf die IgM-Konzentration. Die Gruppe der Milchziegen wies sowohl bei den Muttertieren wie bei den Lämmern signifikant höhere IgM-Konzentrationen auf. Daraus kann zumindest geschlossen werden, dass die Lämmer sie durch höhere Kolostrumkonzentrationen von den Muttertieren erhalten. Der bis Tag 1 postpartum ansteigende Wert steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Rodríguez et al. (2009), die die höchsten IgM-Werte am Tag der Geburt ermittelten. Warum aber die Milchrasse höhere IgM-Konzentrationen erreicht als die Fleischrasse, ist noch unklar. Ob die Muttertiere anderen immunologischen Herausforderungen unterworfen waren (anderes Haltungssystem, Milchmenge,

Melkvorgang) oder die differierenden Werte tatsächlich auf genetische Unterschiede zurückzuführen sind, lässt sich so derzeit nicht feststellen.

### **8.3 Peripartale Immunität und Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine**

Infolge der Trächtigkeit finden im Immunsystem des weiblichen Tieres notwendige Veränderungen statt, damit der zum Teil aus Fremd-DNA bestehende Embryo nicht abgestoßen wird. Zum Ende der Gravidität hin gibt es erneut Verschiebungen:

Nagahata et al. (1992) fanden eine Reduktion der Antikörperbildung durch Lymphocyten im peripartalen Zeitraum. Dieser Effekt wurde auch von Nonnecke et al. (2003) bestätigt. Sie dokumentieren zudem einen reduzierten Anteil verschiedener T-Zell-Klassen und Monocyten an den Leukocyten in der peripartalen Phase, signifikant beeinflusst durch die Milchdrüse. Ein Absinken des IgG-Spiegels im Blut der Milchkühe in den Tagen direkt vor der Geburt lässt sich mit dem massiven Transport in das Kolostrum erklären; post partum stiegen die Werte wieder rapide an. Nonnecke et al. stützen sich in ihrer Arbeit auf den Einfluss der Laktation auf die Beeinträchtigung des mütterlichen Immunsystems. Van Kampen et al. (1997) unterstützten diese These in ihrer Arbeit bereits und schrieben Trächtigkeit und Laktation einen weitaus größeren Einfluss auf das Immunsystem im peripartalen Zeitraum zu als etwaigen Krankheiten oder Stress. Auch die Verschiebung in der Leukocyten-Zusammensetzung ist hier schon dokumentiert. Detillieux et al. (1995) fanden im Zeitraum 3 Wochen vor bis 2 Wochen nach der Geburt massive Einschränkungen der Funktion neutrophiler Granulocyten, sowie eine Reduktion der IgG1 und IgM-Konzentration. Interessanterweise hatten Milchkühe mit höherer Leistung geringere Einschränkungen der Neutrophilenaktivität.

Mit der Geburt gehen bei der Milchkuh und bei Schafen (Ranilla et al., 1994) die höchsten PAG-Werte einher, während es sich bei Ziegen bereits um sinkende Konzentrationen handelt (De Sousa et al., 1999). Verschiedene Autoren haben daher eine Verbindung zwischen den funktionellen Veränderungen im Immunsystem und

den hohen PAG-Konzentrationen hergestellt, siehe Einleitung. Die in unserer Arbeit untersuchte Korrelation zwischen PAG sowie IgG und IgM sollte einen weiteren Baustein in der Klärung dieser Fragestellung sein.

Dabei zeigt sich ein sehr heterogenes Bild: Bei allen Muttertieren (Schafen wie Ziegen) finden sich entweder keine deutlich positiven oder negativen Korrelationen ( $r \geq 0,5$ ;  $r \leq -0,5$ ). Wenn aber doch, sind diese in der Regel assoziiert mit p-Werten  $> 0,05$  und damit in ihrer Aussagekraft sehr eingeschränkt. So weisen nur die Milchschafrmuttern an 3 Messzeitpunkten eine positive Korrelation mit ausreichend geringem p-Wert auf. Hingegen finden sich bei den Fleischlämmern beider Spezies deutlich positive Korrelationen mit stabilen p-Werten. Die Milchlämmer der Ziegen weisen immerhin an 3 Messzeitpunkten eine solche auf.

Bei den Ziegen wurden zusätzlich die Korrelationen zwischen PAG und IgM sowie IgG und IgM bestimmt. Die erste Kombination zeitigte nur bei den Milchlämmern eine vergleichsweise konstante positive Korrelation von  $r \geq 0,5$  an 2 Messzeitpunkten ( $p < 0,05$ ). IgG und IgM waren für die Muttertiere zu keinem Zeitpunkt stark positiv oder negativ korreliert. Bei den Lämmern hingegen fanden sich für die Fleischlämmer an nur 2 von 9, für die Milchlämmer sogar an 5 von 9 Messzeitpunkten stark positive Korrelationen.

Die klar negative Korrelation von PAG und IgG, die in der Eingangshypothese erwartet wurde, lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht halten. Wenn, dann handelt es sich um deutlich positive Korrelationen. Warum bei den adulten Tieren die Milchrasse und bei den Lämmern die Fleischrasse eine entsprechende Tendenz aufweisen, bleibt unklar. Zumal sich ja keine signifikanten Unterschiede in der IgG-Konzentration über die Zeit nachweisen ließen. Dass PAG die zirkulierende Menge von Immunglobulin G bei adulten Schafen und Ziegen im peri/postpartalen Zeitraum reduzieren, ist aus unseren Daten nicht ersichtlich.

Für die positive Korrelation von PAG und IgG bei den Lämmern sehe ich mehrere mögliche Erklärungen: PAG könnten die offene Darmschranke zusammen mit Immunglobulinen und Wachstumsfaktoren in den ersten 24-48 Stunden post partum passieren, worauf auch die nach Kolostrumaufnahme steigenden PAG-Werte

hinweisen. Möglich ist, dass es einen dem FcRn-Rezeptor äquivalenten Rezeptor gibt, der PAG in den neonatalen Organismus einschleust. Alternativ könnte es zu einer unspezifischen Aufnahme durch Darmepithelzellen kommen. Ebenso ist es möglich, dass PAG den Transport von IgG und M durch das Darmepithel beschleunigen – oder umgekehrt. Möglicherweise haben Muttertiere mit höheren Konzentrationen von IgG und M im Kolostrum auch mehr PAG akkumuliert, sodass die Neonaten mehr davon aufnehmen. Diese Beziehung wurde im vorliegenden Versuch auf Einzeltierebene nicht untersucht.

Dass sich PAG bereits bei Geburt und in höherem Maße nach Kolostrumaufnahme im Organismus des Neonaten finden, lässt eine wie auch immer geartete Funktion ahnen: In der Regel wurden von der Evolution sinnlose Abläufe „wegrationalisiert“ – von einem zufälligen Auftreten der PAG ist also nicht auszugehen. Da manche, wenn auch wenige PAG, nach wie vor eine proteolytische Funktion aufweisen, könnte im Organismus des Neugeborenen auch eine Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder eine Modulation des Immunsystems erfolgen. Da die postpartale Aufnahme von Immunglobulinen deren Produktion im Neonaten verzögert (bzw. die mangelhafte Absorption eine Eigenproduktion stark fördert (Lecce u. Morgan, 1962; Tizard, 2012)), wäre eine immunsuppressive Funktion mit ähnlicher Wirkrichtung für PAG denkbar. Vielleicht sind sie an einer Immunmodulation im Zuge der Ausprägung der erworbenen Immunität beteiligt, wie dies für andere Proteasen wie Cathepsine bekannt ist (Conus u. Simon, 2010).

Bei den Ziegenlämmern zeigte sich zudem, dass Lämmer, die im Laufe des Versuchs Anzeichen ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Fieber und vor allem Schwäche zeigten, signifikant niedrigere PAG-Werte hatten, als jene, die über den Versuchszeitraum gesund blieben. Bei den Schafälammern konnte dies so nicht nachgewiesen werden. Für IgG wurde bei keiner der Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Individuen gefunden, was ob der bekannten protektiven Funktion dieses Moleküls erstaunt. Eine mögliche Erklärung an dieser Stelle ist die doch recht kleine Stichprobengröße, insbesondere der erkrankten Tiere, die eine statistische Einschätzung erschwert.

Die teilweise positive Korrelation von IgG und IgM bei den Ziegenlämmern betrachte ich als tatsächlich bloße Korrelation – keine Kausalität. Eine vollumfängliche Aufnahme von Kolostrum wird hier zur vergleichbar guten Aufnahme beider Immunglobulinklassen geführt haben. Rodriguez et al. (2009) konstatieren in ihrer Arbeit, dass eine hohe IgM-Konzentration im Kolostrum zur hohen Anreicherung im neonatalen Serum führt. Eine weitere Möglichkeit für korrelierende IgM und IgG-Werte wäre ein Co-Transport von IgG und IgM durch das Darmepithel.

## **8.4 Methodenkritik**

### **8.4.1 Verwendete Tiere**

Zu einer stärkeren Deutlichkeit der Ergebnisse käme man durch eine größere Gruppengröße der verwendeten Tiere. Insbesondere im Bereich der Muttertiere wäre das wünschenswert, da eine Stichprobengröße von 12 Tieren relativ klein ist.

Die genutzten Milchziegen und -schafe wurden auf einem Bioland-Betrieb gehalten. Entsprechend wird ihnen sicherlich nicht die maximal mögliche Milchleistung abverlangt. Mit hochleistenden Milchtieren auf einem konventionellen Betrieb könnten die rassebedingten Unterschiede beträchtlicher ausfallen.

### **8.4.2 Labormethoden**

Zur Optimierung des etablierten ELISA könnte neben den genannten Faktoren wie Raumklima auch beitragen, die Detektionsantikörper aus anderen Wirtstieren zu beziehen. Auch eine Automatisierung des ELISA würde zu einheitlicheren Ergebnissen führen, ist aber im Bereich Schaf/Ziege wirtschaftlich eher uninteressant und daher schwierig umzusetzen.

Eine einheitliche Behandlung der verwendeten Proben kann in praxi nicht immer gewährleistet werden, zeigte sich aber in einer Arbeit von Stahmann et al. (2013) als relevanter Faktor: So hat das Einfrieren von Probenmaterial einen Effekt auf die PAG-Konzentration und auch auf die von Immunglobulinen (Hansson, 1968), je nach verwendeter Methode oder zugesetzter Puffer und Gefrierschutzmittel.

## 8.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gezielte Zucht auch bei Schafen und Ziegen den gesamten Organismus betrifft: Neben der gewünschten Leistungssteigerung passen sich naturgemäß andere Stoffwechselprozesse den neuen Gegebenheiten an, beispielhaft seien hier die erhöhten Stoffwechselraten bei hohen Milchleistungen genannt. Zudem treten bestimmte Merkmale genetisch gekoppelt auf. Die Reproduktion ist bei Schafen und Ziegen, wie das von z.B. Milchkühen bereits bekannt ist, ebenfalls betroffen und präsentierte sich in der vorliegenden Arbeit durch signifikante Rasseunterschiede der PAG-Konzentrationen, bei den Ziegen auch der IgM-Gehalte im Plasma. Wenn die genaue Funktion der PAG in Zukunft noch näher geklärt wird, wird sich zeigen, ob die schnellere Verstoffwechslung der Moleküle in Milchrassen problematisch ist. Aus der vorliegenden Studie lässt sich dies indes nicht ableiten. Auch der vermutete Einfluss von PAG auf den Isotypenswitch der Immunglobuline zeigte sich in meiner Arbeit nicht.

Potentielle Zielorgane für PAG im Neonaten könnten die lymphatischen Organe wie Thymus und gewebe-assoziiertes lymphatisches Gewebe sein. PAG könnten hier an der Regulation von Abläufen wie z.B. der Reifung von Lymphocyten beteiligt sein. Mit entsprechenden bildgebenden Verfahren ließe sich zudem der Mechanismus der Passage durch die Darmwand darstellen.

## 9 Literaturverzeichnis

Akira, S., S. Uematsu u. O. Takeuchi (2006):  
Pathogen Recognition and Innate Immunity  
Cell, 124(4), 783–801

Alberghina, D., S. Casella, I. Vazzana, V. Ferrantelli, C. Giannetto u. G. Piccione (2010):  
Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis.  
Vet. Clinical Pathology, 39(3), 317–321.

Argüello, A., N. Castro, J. Capote, J.W. Tyler u. N. M. Holloway (2004):  
Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goat kids.  
Livestock Production Science, 90(2–3), 235–239.

Barbato, O., N. M. De Sousa, A. Debenedetti, C. Canali, L. Todini u. J.F. Beckers (2009):  
Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes.  
Theriogenology, 72, 993–1000

Batalha, E. S., J. Sulon, J. R. Figueiredo, J. F. Beckers, C. J. B. Espescht, R. Martins u. L. D. M. Silva (2001):  
Plasma profile of pregnancy associated glycoprotein (PAG) in pregnant alpine goats using two radioimmunoassay (RIA) systems.  
Small Ruminant Research, 42, 111–118.

Baumrucker, C. R., A. M. Burkett, A. L. Magliaro-Macrina u. C. D. Dechow (2010):  
Colostrum: Mass transfer of immunoglobulin G 1 into colostrum.  
Journal of Dairy Science, 93(7), 3031–3038

Bazer, F. W., G. Wu, T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt u. K. Bayless (2009):  
Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals.  
Molecular Human Reproduction, 16(3), 135–152

Beckers, J. F., P.V. Drion, J. M. Garbayo, Z. Perényi, A. Zarrouk, J. Sulon, B. Remy, O. Szenci (1999):  
Pregnancy associated glycoproteins in ruminants: inactive members of the aspartic proteinase family  
Acta Veterinaria Hungarica, 47, 461–469

Beckers, J. F., A. Zarrouk, E. S. Batalha, J. M. Garbayo, L. Mester u. O. Szenci (1998):

Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropins and pregnancy-associated glycoproteins: review.

Acta Veterinaria Hungarica, 46, 175–189

Bella, A., N. M. De Sousa, M. L. Dehimi, J. Watts u. J. F. Beckers (2007):  
Western analyses of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in placental  
extracts of various mammals.

Theriogenology, 68, 1055–1066.

Busch, W. (2009):

Krankheiten der Geschlechtsorgane

in: M. Ganter (Hrsg): Lehrbuch der Schafkrankheiten

4. Auflage

Parey in Medizinverlage Stuttgart

S. 52-66

Butler, J. E., W. C. Hamilton, R. G. Sasser, C. A. Ruder, G. M. Hass u. R. J. Williams  
(1982):

Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins.

Biol Reprod, 26(5), 925–933.

Campbell, S. G., M. J. Siegel u. B. J. Knowlton (1977):

Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb.

New Zealand Veterinary Journal, 25(12), 361–365

Casey, N. H., u. W. A. Van Niekerk (1988):

The boer goat. I. Origin, adaptability, performance testing, reproduction and milk  
production.

Small Ruminant Research, 1, 291–302

Chaudhuri, J., u. F. W. Alt (2004):

Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA  
repair.

Nature Reviews Immunology, 4(7), 541–552

Chen, J., C. Chang, H. Peh u. S. Chen (1999):

Serum protein levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area.

Small Ruminant Research, 32(2), 153–160

Chentouf, M., B. El Amiri, J. Sulon, J. F. Beckers, N. Kirschvink, B. Boulanouar u. J.  
L. Bister (2008):

Pregnancy-associated glycoprotein secretion in North Moroccan goats.

Reproduction in Domestic Animals, 43, 696–700

Chniter, M., I. Salhi, H. Harrabi, T. Khorchani, A.-L. Lainé, R. Nowak u. M. Hammadi  
(2016):

Physiological changes in the peri-partum period and colostral IgG transfer in prolific D'man sheep: effects of parity and litter size.

Tropical Animal Health and Production, 48(2), 387–394

Conus, S., u. H. U. Simon (2010):

Cathepsins and their involvement in immune responses.

Swiss Medical Weekly, 2010; 140 (w13042)

De Sousa, N. M., J. F. Beckers u. Z. Gajewski (2008):

Current trends in follow-up of trophoblastic function in ruminant species.

Journ. of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society, 59 Suppl 9, 65–74

De Sousa, N. M., J. M. Garbayo, J. R. Figueiredo, J. Sulon, P. B. D.Goncalves u. J. F. Beckers (1999):

Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil.

Small Ruminant Research, 32, 137–147

De Souza Castagnino, D., C. J. Härter, A. R. Rivera, L. D. de Lima, H. G. de Oliveira Silva, B. Biagioli, K. T. de Resende u. I. A. M. de Almeida Teixeira, I. A. M. (2015):

Changes in maternal body composition and metabolism of dairy goats during pregnancy.

Revista Brasileira de Zootecnia, 44(3), 92–102

Del Vecchio, R. P., W. D. Sutherland u. R. G. Sasser (1996):

Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E<sub>2</sub>, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha.

Journal of Reproduction and Fertility, 107, 131-136

Detilleux, J. C., M. E. Kehrli, J. R. Stabel, A. E. Freeman u. D. H. Kelley (1995):

Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 44(3–4), 251–267

Dosogne, H., C. Burvenich, A. Freeman, M. Kehrli Jr, J. Detilleux, J. Sulon, J. F. Beckers u. D. Hoeben (1999):

Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post-partum dairy cows.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 67(1), 47–54

El Amiri, B., N. M. De Sousa, A. Alvarez Oxiley, D. Hadarbach u. J. F. Beckers (2015):

Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep.

Research in Veterinary Science, 99, 30–36

El Amiri, B., P. Delahaut, Y. Colemans, N. M. De Sousa u. J. F. Beckers (2014): Investigation of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) by means of an enzyme immunoassay (ELISA) sandwich kit for pregnancy monitoring in sheep. *Options Méditerranéennes : Series A*, 108, 299–303

Entrican, G., u. N. M. Wheelhouse (2006): Immunity in the female sheep reproductive tract. *Veterinary Research*, 37(3), 295–309

Friedrich, M., u. W. Holtz (2010): Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 142–146

Garbayo, J. M., J. A. Green, M. Manikkam, J. F. Beckers, D. O. Kiesling, A. D. Ealy u. R. M. Roberts (2000): Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): Their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Molecular Reproduction and Development*, 57, 311–322

Garbayo, J. M., B. Serrano u. F. Lopez-Gatius (2008): Identification of novel pregnancy-associated glycoproteins (PAG) expressed by the peri-implantation conceptus of domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 103, 120–134

Gellermann, M. (2006): Immunisierung von Muttersauen mit definierten Hapten-Carrier-Komplexen zur Prüfung des Konzeptes der Idiotyp-Vakzinierung von Ferkeln nach Kolostrumaufnahme. *tierärztl. Hochschule, Diss.*

Ghetie, V., u. E. S. Ward (2000): Multiple Roles for the Major Histocompatibility Complex Class I– Related Receptor FcRn. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 739–766

Goebel, T., u. B. Kaspers (2015): *Abwehr*  
in: von Engelhardt, W. (Hrsg.) (2015): *Physiologie der Haustiere*  
Enke Verlag, Stuttgart  
S. 241-259

Gonzalez, F., F. Cabrera, M. Batista, N. Rodriguez, D. Alamo, J. Sulon, J. F. Beckers, A. Gracia (2004): A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogenology*, 62, 1108–1115

Gonzalez, F., J. Sulon, P. Calero, M. Batista, A. Gracia u. J. F. Beckers (2001):  
Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy  
diagnosis in dairy goats.

*Theriogenology*, 56, 671–676

Gonzalez, F., J. Sulon, J. Garbayo, M. Batista, F. Cabrera, P. Calero, A. Gracia u.  
J.F. Beckers (2000):

Secretory Profiles of Pregnancy-Associated Glycoproteins at Different Stages of  
Pregnancy in the Goat.

*Reproduction in Domestic Animals*, 35(2), 79–82

Green, J. A. (2000):

Pregnancy-Associated Bovine and Ovine Glycoproteins Exhibit Spatially and  
Temporally Distinct Expression Patterns During Pregnancy.

*Biology of Reproduction*, 62(6), 1624–1631

Green, J. A., S. Xie, B. Szafranska, X. Gan, A. G. Newman, K. McDowell u. R. M.  
Roberts (1999):

Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer  
of the equine placenta.

*Biology of Reproduction*, 60(5), 1069–1077

Hansson, U. B. (1968):

Inhibition and reversal of aggregation of immunoglobulin G by freezing.

*Acta Chemica Scandinavica*, (22), 490–496

Haugejorden, G., S. Waage, E. Dahl, K. Karlberg, J. F. Beckers u. E. Ropstad  
(2006):

Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and  
their offspring.

*Theriogenology*, 66, 1976–1984

Heimer, R., L. G. Clark u. P.H. Maurer (1969):

Immunoglobulins of sheep.

*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 131(1), 9–17

Hoeben, D., C. Burvenich, A.-M. Massart-Leën, M. Lenjou, G. Nijs, D. Van  
Bockstaele u. J. F. Beckers, J.-F. (1999):

In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-  
associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and  
calves.

*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68(2–4), 229–240

Horn, J. (2013):

Konzentration der Immunglobuline Ig1, Ig2 und IgM im peripartalen Zeitraum bei Hochleistungsmilchkühen unter Berücksichtigung der Energiebilanz sowie der Fütterung mit konjugierten Linolsäuren.  
tierärztl. Hochschule, Diss.

Hughes, A. L., J. A. Green, H. Piontkivska u. R. M. Roberts (2003):  
Aspartic Proteinase Phylogeny and the Origin of Pregnancy-Associated Glycoproteins.  
Molecular Biology and Evolution, 20, 1940–1945

Humblot, P. (2001):  
Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants.  
Theriogenology, 56, 1417–1433

Iason, G. R., D. A. Sim, E. Foreman u. P. Fenn (1994):  
Seasonal variation of voluntary food intake and metabolic rate in three contrasting breeds of sheep.  
Animal Science, 58(3), 381–387

Kehrli Jr, M., B.J. Nonnecke u. J. Roth (1989):  
Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.  
American Journal of Veterinary Research, 50 (2), 207-214

Klobasa, F., u. E. Werhahn (1989):  
Variations in the concentrations of the immunoglobulins IgG1, IgG2, IgM and IgA in sheep. 1. Changes in the blood serum and in the milk of sheep of different breeds and cross-breeds during lactation.  
Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 102(4), 123–129

Lack, P. (2006):  
Bestimmung von Immunglobulin G und M im Serum neugeborener Kälber während der ersten zehn Lebenstage unter besonderer Berücksichtigung des Fütterungsregimes.  
Gießen, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

Leblanc, S. J. (2013):  
Short communication: field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows.  
Journal of Dairy Science, 96(4), 2345–2348

Lecce, J. G., u. D. O. Morgan (1962):  
Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb.  
Journal of Nutrition, 78, 263–268.

- Ledezma-Torres, R. A., J. F. Beckers u. W. Holtz (2006):  
Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG55+59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy.  
*Theriogenology*, 66(4), 906–912
- Lopez-Gatius, F., J. M. Garbayo, P. Santolaria, J. Yániz, A. Ayad, N. M. De Sousa u. J.F. Beckers (2007):  
Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses.  
*Domestic Animal Endocrinology*, 32, 29–42
- López-Gatius, F., J. M. Garbayo, P. Santolaria, J. L. Yániz, S. Almería, A. Ayad, N. M. De Sousa u. J. F. Beckers (2007):  
Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in Neospora-infected dairy cows.  
*Theriogenology*, 67(3), 502–508
- McDowell, G. H., u. A. K. Lascelles (1970):  
Local antibody production in the mammary gland of the ewe.  
*Journal of Reproduction and Fertility*, 21(2), 373–374
- Meinecke, B. (2015):  
Reproduktion, Sexualzyklus, Gravidität  
in: von Engelhardt, W. (Hrsg.) (2015): *Physiologie der Haustiere*  
Enke Verlag, Stuttgart  
S. 551-574
- Merle, N. S., S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi u. L. T. Roumenina (2015):  
Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation.  
*Frontiers in Immunology*, 6(JUN), 1–30
- Merle, N. S., R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi u. L. T. Roumenina (2015):  
Complement system part II: Role in immunity.  
*Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–26
- Mialon, M. M., S. Camous, G. Renand, J. Martal u. F. Ménissier (1993):  
Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle.  
*Reproduction Nutrition Development*, 33(3), 269–282
- Micusan, V. V, u. A. G. Borduas (1977):  
Biological properties of goat immunoglobulins G.  
*Immunology*, 32(4), 373–381

- Mierke, M., M. Gauly u. W. Holtz (2014):  
Nachgeburtlicher PAG-Verlauf bei der Ziege unter Verwendung eines ELISAs mit verschiedenen Antiseren und mögliche Beziehungen mit dem Neugeborenen , der Nachgeburt und der Milchleistung.  
Göttingen, Univ., Masterarbeit
- Miyazaki, H., M. Imai, T. Hirayama, S. Saburi, M. Tanaka, M. Maruyama, C. Matsuo, H. Meguro, K. Nishibashi, F. Inoue, J. Dijane, A. Gertler, S. Tachi, K. Imakawa u. C. Tachi (2002):  
Establishment of feeder-independent cloned caprine trophoblast cell line which expresses placental lactogen and interferon tau.  
Placenta, 23(8–9), 613–630
- Moreno-Indias, I., D. Sánchez-Macías, N. Castro, A. Morales-delaNuez, L. E. Hernández-Castellano, J. Capote u. A. Argüello (2012):  
Chemical composition and immune status of dairy goat colostrum fractions during the first 10h after partum.  
Small Ruminant Research, 103(2–3), 220–224
- Nagahata, H., A. Ogawa, Y. Sanada, H. Noda u. S. Yamamoto (1992):  
Peripartum changes in antibody producing capability of lymphocytes from dairy cows.  
The Veterinary Quarterly, 14(1), 39–40
- Nonnecke, B. J., K. Kimura, J. P. Goff u. M. E. Kehrl (2003):  
Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows.  
Journal of Dairy Science, 86(7), 2359–2368
- O'Brien, J. P., u. D. M. Sherman (1993):  
Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning.  
Small Ruminant Research, 11(1), 71–77
- Pahud, J. J., u. J. P. Mach (1970):  
Identification of secretory IgA, free secretory piece and serum IgA in the ovine and caprine species.  
Immunochemistry, 7(8), 679–682
- Pan, I. C., A. M. Kaplan, R. L. Morter u. M. J. Freeman (1968):  
Spectrum of ovine immunoglobulins.  
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. (New York), 129(3), 867–870
- Parr, R. A., I. F. Davis, M. A. Miles u. T. J. Squires (1993):  
Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep.  
Research in Veterinary Science, 55, 311–316

- Perenyi, Z., O. Szenci, J. Sulon, P. Drion u. J. F. Beckers (2002):  
Comparison of the Ability of Three Radioimmunoassay to Detect Pregnancy-associated Glycoproteins in Bovine Plasma.  
*Reproduction in Domestic Animals*, 37(2), 100–104
- Pierce, A. E. (1955):  
Electrophoretic and Immunological Studies on Sera from Calves from Birth to Weaning,  
*Hyg.* 53(3), 247–260.
- Poulton, A. (1987):  
Role of melatonin in seasonal breeding in sheep.  
In Proceedings of the 38th Annual Meeting of the EAAP Commission on Sheep and Goat Production. Lisbon, Portugal.
- Raghavan, M., u. P. J. Bjorkman (1996):  
Fc Receptors and their interactions with immunoglobulins.  
*Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 181–220
- Raheem, K. A. (2017):  
An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species.  
*Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 1-6
- Rainard, P., u. C. Riollot (2006):  
Innate immunity of the bovine mammary gland.  
*Veterinary Research*, 37, 369–400
- Ranilla, M. J., J. Sulon, M. D. Carro, A. R. Mantecón u. J. F. Beckers (1994):  
Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep.  
*Theriogenology*, 42, 537–545
- Ranilla, M. J., J. Sulon, A. R. Mantecon, J. F. Beckers u. M. D. Carro (1997):  
Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaff ewes carrying single and twin lambs.  
*Small Ruminant Research*, 24(2), 125–131
- Ricci, A., P. D. Carvalho, M. C. Amundson, R. H. Fourdraine, L. Vincenti u. P. M. Fricke (2015):  
Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis.  
*Journal of Dairy Science*, 98(4), 2502–2514
- Roberts, J. N., K. J. May u. A. Veiga-Lopez (2017):  
Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep.

Theriogenology, 89, 271–279

Rodríguez, C., N. Castro, J. Capote, A. Morales-Delanuez, I. Moreno-Indias, D. Sánchez-Macías u. A. Argüello (2009):  
Effect of colostrum immunoglobulin concentration on immunity in Majorera goat kids.  
Journal of Dairy Science, 92(4), 1696–1701

Rosa, H. J. D., u. M. J. Bryant (2003):  
Seasonality of reproduction in sheep.  
Small Ruminant Research, 48(3), 155–171

Ruder, C. A., J. N. Stellflug, J. J. Dahmen u. R. G. Sasser (1988):  
Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B.  
Theriogenology, 29(4), 905–912

Sangsritavong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano u. M. C. Wiltbank (2002):  
High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle.  
Journal of Dairy Science, 85(11), 2831–2842

Sasser, R. G., C. A. Ruder, K. A. Ivani, J. E. Butler u. W. C. Hamilton (1986):  
Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation.  
Biology of Reproduction, 35, 936–942

Sawyer, M., C. H. Willadsen, B. I. Osburn u. T. C. McGuire (1977):  
Passive transfer of colostral immunoglobulins from ewe to lamb and its influence on neonatal lamb mortality.  
Journal of the American Veterinary Medical Association, 171(12), 1255–1259

Schnorr, B., & Kressin, M. (2011):  
Embryologie der Haustiere.  
Enke Verlag

Serrano, B., F. López-Gatius, P. Santolaria, S. Almería, I. García-Ispierto, G. Bech-Sabat, J. Sulon, N. M. De Sousa, J. F. Beckers u. J. Yániz (2009):  
Factors Affecting Plasma Pregnancy-associated Glycoprotein 1 Concentrations Throughout Gestation in High-producing Dairy Cows.  
Reproduction in Domestic Animals, 44(4), 600–605

Shahin, M., M. Friedrich, M. Gaulty, J. F. Beckers u. W. Holtz (2013):  
Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera.  
Small Ruminant Research, 113, 141–144

Sheldon, I. M., J. G. Cronin, G. D. Healey, C. Gabler, W. Heuwieser, D. Strey, J. J. Bromfield, A. Miyamoto, C. Fergani u. H. Dobson (2014):  
Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease.

Reproduction (Cambridge, England), 148(3), R41-51

Silanikove, N. (1986):

Interrelationships Between Feed Quality, Digestibility, Feed Consumption, and Energy Requirements in Desert (Bedouin) and Temperate (Saanen) Goats.  
Journal of Dairy Science, 69(8), 2157–2162

Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver u. D. DeRosa (1997):

Immunobiology of the mammary gland.

Journal of Dairy Science, 80(8), 1851–1865

Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer u. R. C. Burghardt (2004):

Implantation mechanisms: Insights from the sheep.

Reproduction, 128(6), 657-668

Stahmann, F., M. Gauly, W. Holtz u. U. König von Borstel (2013):

Short communication: A note on the correction for the effect of freezing on the outcome of pregnancy-associated glycoprotein measurement in blood and serum of cows.

Journal of Dairy Science, 96(10), 6520–6524

Szafranska, B. (1995):

Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm.

Biology of Reproduction, 53(1), 21–28

Telugu, B. P. V. L., u. J. A. Green (2008):

Characterization of the peptidase activity of recombinant porcine pregnancy-associated glycoprotein-2.

Journal of Biochemistry, 144(6), 725–732

Tizard, I. R. (2012).

Veterinary Immunology

9. Auflage, Elsevier

Kap. 4: Innate Immunity

Kap. 13: Lymphocytes

Kap. 15: B Cells and Their Response to Antigen

Kap. 16: Antibodies

Kap. 18: T Cell Function and the Destruction of Cell-Associated Invaders

Kap. 21: Immunity in the Fetus and Newborn

Van Kampen, C., u. B. A. Mallard (1997):

Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 59(1–2), 79–91

Vandaele, L., S. Verberckmoes, B. El Amiri, J. Sulon, L. Duchateau, A. Van Soom, J. F. Beckers, A. de Kruif (2005):

Use of a homologous radioimmunoassay (RIA) to evaluate the effect of maternal and foetal parameters on pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in sheep.

Theriogenology, 63(7), 1914–1924

Vihan, V. S. (1988):

Immunoglobulin levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats.

Small Ruminant Research, 1(2), 135–144

Wallace, J. M., R. P. Aitken, M. A. Cheyne u. P. Humblot (1997):

Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses.

Journal of Reproduction and Fertility, 109, 53–58

Wallace, R. M., K. G. Pohler, M. F. Smith u. J. A. Green (2015):

Placental PAGs: Gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy.

Reproduction, 149(3), R115–R126

Waller, K. P. (2002):

Mammary Gland Immunology Around Parturition.

Advances in Experimental Medicine and Biology, 480, 231-245

Wooding, F. B. P., R. M. Roberts u. J. A. Green (2005):

Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications.

Placenta, 26(10), 807–827

Xie, S., B.G. Low, R. J. Nagel, J.F. Beckers u. R. M. Roberts (1994):

A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm.

Biology of Reproduction, 51(6), 1145–1153

Xie, S., J. Green, B. Bao, J. F. Beckers, K. E. Valdez, L. Hakami, R. M. Roberts (1997):

Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue.

Biology of Reproduction, 57(6), 1384–1393

Yamada, M., K. Murakami, J. C. Wallingford u. Y. Yuki (2002):

Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry.

Electrophoresis, 23(7–8), 1153–1160

Zarrouk, A., I. V. Engeland, J. Sulon u. J. F. Beckers (1999):

Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Bartonella henselae* or *Bartonella monocytogenes*: a retrospective study.

Theriogenology, 52(6), 1095–1104

Zhao, Y., I. Kacs Kovics, Q. Pan, D. A. Liberles, J. Geli, S. K. Davis, H. Rabbani u. L. Hammarstrom (2002):

Artiodactyl IgD: The Missing Link.

The Journal of Immunology, (169), 4408–4416

Zoli, A. P., J. F. Beckers, P. Wouters-Ballman, J. Closset, P. Falmagne u. F. Ectors (1991):

Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein.

Biology of Reproduction, 45, 1–10

Zoli, A. P., L. A. Guilbault, P. Delahaut, W. B. Ortiz u. J. F. Beckers (1992):

Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis.

Biology of Reproduction, 46, 83–92

## 10 Anhang

### 10.1 Material und Reagenzien: ELISA zum Nachweis Trächtigkeits-assoziierter Glykoproteine

#### 10.1.1 Verdünnungsreihe Standard

0,0 mg/ml	Blank
0,39 mg/ml	
0,78 mg/ml	
1,56 mg/ml	
3,125 mg/ml	
6,25 mg/ml	
12,5 mg/ml	

#### 10.1.2 Reagenzien

Testpuffer (TP-1):

NaCl	0,12 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02 M
EDTA	0,01 M
Casein	0,1%
Phenolrot	0,002%
NaOH	0,005 M
Chlorhexidin 20%	
in Aqua dest.	
pH	7,3-7,4

Coating-Puffer:

0,05M	NaHCO <sub>3</sub> (SIGMA)
0,2g	Thimerosal (97%, SIGMA)
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	
0,15M	NaCl (SIGMA)

0,08M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (SIGMA)
0,03M	KCL (Merck, Darmstadt)
0,015M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)
pH-Wert	7,2

#### PAG-Stammlösung (SL-1)

1mg	gereinigtes PAG
1ml	PBS

#### Caseinlösung

50mM	NaOH
25g	Casein

#### Tracerlösung

7µl	TR-20
5993µl	TP-1

#### Streptavidin-Peroxidase-Lösung

40 µl	Streptavidin-Peroxidase
12ml	TP-1

#### Substratpuffer

0,05M	Citronensäure, wasserfrei (SIGMA)
0,11M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,05%	Harnstoffperoxid (SIGMA)
pH-Wert	4,05

#### TMB-Lösung

250mg	TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, SIGMA)
20ml	DMSO (Dimethylsulfoxid, SIGMA)

**Substratlösung**

17ml	Substratpuffer
340 µl	TMB-Lösung

**Schwefelsäure**

0,25M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 M
-------	---------------------------------------

**Waschpuffer**

10%	PBS
0,05%	Tween20

**10.1.3 Antikörper**

sheep anti-rabbit-IgG	Coating-Antikörper
anti-caPAG IgG #706	Detektionsantikörper, polyklonal, caprines PAG, 55 + 62 kDa

**Tracer**

biotinyliertes bPAG-1 (aufgereinigtes bPAG-1, Biotin (BcapNHS), in DMSO)

**10.1.4 Material**

Mikrotiterplatte: UNC MaxiSorb™, NALGENE Nunc, Langenselbold, Deutschland

Photometer: TECAN Sunrise™

## **10.2 Reagenzien & Material: ELISA zum Nachweis von Immunglobulin G und M**

**10.2.1 Antikörper***10.2.1.1 Beschichtungsantikörper*

donkey anti-goat IgG H/L	polyklonal, AbD Serotec 642001
rabbit anti-goat IgM	polyklonal, AbD Serotec AA145
donkey anti-sheep IgG H/L	polyklonal, AbD Serotec 0200-0651
rabbit anti-sheep IgM	polyklonal, AbD Serotec AHP950

### 10.2.1.2 *Detektionsantikörper*

donkey anti-goat IgG HRP	polyklonal, AbD Serotec 642005 angewendet: 1:50.000 in Testpuffer
rabbit anti-goat IgM HRP	polyklonal, AbD Serotec AA145P angewendet: 1:60.000 in Testpuffer
donkey anti-sheep IgG HRP	polyklonal, AbD Serotec STAR88P angewendet: 1:20.000 in Testpuffer
rabbit anti-sheep IgM HRP	polyklonal, AbD Serotec AHP950P angewendet: 1:60.000 in Testpuffer

### 10.2.2 Reagenzien

#### Coating-Puffer

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,015 M
NaHCO <sub>3</sub>	0,035 M
in Aqua dest.	
pH	9,6

#### Test- und Waschpuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0025 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0075 M
NaCl	0,145 M
Tween 20	0,1%
in Aqua dest.	
pH	7,2

#### Substratpuffer

Citrat	0,0333 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0667 M
in Aqua dest.	
pH	5,0

Tetramethybenzidin (TMB)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N

### 10.2.3 Material

Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific-Nunclon 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene
Plattenwasher	Thermo Scientific Wellwash Versa
Plattenrüttler	Heidolph Titramax 1000
Photometer	BioTek ELx800
Multipette	Eppendorf Multipette® plus
Präzisionspipetten	pipetman 20, 100, 200 + 1000µl

## 10.3 Rohdaten Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine

Werte aufgeführt in ng/ml

### 10.3.1 Schafmüttern

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 17	Tag 21	Tag 25
911005	Fleisch	16,3	5,54	6,05	5,29	2,41	2,34	1,35	0,91
211065	Fleisch	40	23,16	9,94	7,83	6,81	5,02	3,27	1,66
111072	Fleisch	18,67	7,62	6,27	2,88	4,12	2,37	2,64	0,64
611064	Fleisch	40	40	24,97	17,628	9,4	8,2	6,35	4,42
111085	Fleisch	40	7,87	6,16	5,31	2,78	3,98	2,12	2,41
711015	Fleisch	24,52	11,03	7,12	5,51	5,53	4,16	4,07	1,83
211039	Fleisch	40	20,84	15,33	15,47	10,94	6,16	4,29	2,6
111144	Fleisch	25,1	16,5	7,35	5,72	5,33	5,29	2,98	2,92
211080	Fleisch	40	7,86	6,74	3,45	4,51	2,13	1,28	0,84
11017	Fleisch		9,23	7,84	3,33	3,16	3,53	1,32	1,86
611117	Fleisch		7,91	6,54	3,98	5,06	3,06	1,63	1,96
811008	Fleisch	40	11,38	8,94	6,37	4,7	3,8	2,28	1,24
911130	Fleisch	40	9,86	9,42	7,05	6,31	4,44	5,02	1,82
111040	Fleisch	40	8,13	8,27	5,63	6,44	4,22	2,22	1,5
611112	Fleisch	20,72							
103	Milch	18,7	11,45	8,16	5,01	4,03	5,42	2,44	1,86
108	Milch	20,32	6,27	3,31	3,42	2,78	1,58	1,88	1,08
480	Milch	40	9,47	6,22	4,37	3,8	3,06	2,87	1,85
274	Milch	40	16,48	6,26	5,1	4,13	3,61	3,11	1,94
221	Milch	7,82	9,4	5,22	3,32	2,65	2,44	1,8	1,08
496	Milch	17,41	10,15	5,23	5,13	3,33	2,51	1,86	1,21
483	Milch	17,8	5,87	4,69	4,15	3,17	2,37	1,74	1,32
104	Milch	40	6,83	4,68	3,64	3,08	2,01	1,53	0,94
830	Milch	23,34	5,05	4,27	2,66		1,52	2,08	
224	Milch	7,74	4,41	2,95	2,22		0,96	0,82	
839	Milch	40	13,93	5,55	3,37		1,72	1,07	
225	Milch		6,16	4,27	2,78		1,2	1,01	

## 10.3.2 Schaflämmer

Tiernummer	Rasse	Geschlecht	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 19	Tag 26
411084	Fleisch	w	1,76	2,53	0,81	0,451	0,52	0,2	0,2	0,2	0,2
411085	Fleisch	m	2,58	2,23	1,31	0,74	0,2	0,2	0,2	0,52	0,2
411086	Fleisch	m	2,28	1,63	1,11	1,31					
411088	Fleisch	w	6,06	3,22	4,53	2,53	1,04	0,77	0,2	0,2	
411089	Fleisch	m	4,12	1,96	1,79	1,15	0,62	0,58	0,2	0,57	0,2
411090	Fleisch	w	6,57	3,05	3,77	2,71	1,55	0,75	0,2	0,2	0,68
411091	Fleisch	m	2,36	3,53	4,37	1,54	1,61	0,88	0,2	0,2	0,2
411092	Fleisch	m	3,73	2,74	2,9	2,19	1,64	1,66	0,2	0,2	0,2
411093	Fleisch	m	10,12	13,01	4,08	3,51	4,05	2,95	1,18	0,2	0,2
411094	Fleisch	m	2,94	9,26	8,04	5	5,41	2,92	0,2	0,2	0,2
411095	Fleisch	m	2,59	7,88	6,46	3,61	2,63	1,18	0,2	0,2	0,2
411096	Fleisch	m	1,31	4,29	4,63	2,44	1,83	1,12	0,2	0,52	0,2
411097	Fleisch	w	2,38	2,73	1,87	0,77	1,09	0,43	0,2	0,2	0,2
411098	Fleisch	w	2,95	2,98	1,97	1,32	0,53	0,2	0,2	0,2	0,2
411099	Fleisch	m	1,47								
411100	Fleisch	w	7,17	3,21	3,22	3	1,85	1,21	0,8	0,4	0,42
411101	Fleisch	m	4,76	3,76	4,27	1,74	2	2,31	0,91	0,2	0,45
411102	Fleisch	m	1,68								
411103	Fleisch	w		2,92	2,81	2,92	1,36	1,6	0,2	0,2	0,65
411104	Fleisch	w				1,39	1,1	0,2	0,4	0,2	0,66
411105	Fleisch	w				0,87	1,45	0,53	0,2	0,2	0,2
411106	Fleisch	w				1,26	3,22	0,49	0,2	0,2	0,4
89r	Milch	w	4,38	4,76	3,59	2,19	2,51	1,18	0,2	0,2	0,2
93g	Milch	m	5,16	5,31	3,36	2,95	1,22	0,94	0,2	0,2	0,2
84r	Milch	w	2,91	3,9	2,53	1,58	1,14	0,91	0,2	0,2	0,2
85r	Milch	w	3,26	3,79	3,35	1,71	1,08	0,87	0,2	0,2	0,2
86r	Milch	w	3,9	4,73	3,84	2,3	1,96	1,63	0,59	0,2	0,2
79r	Milch	w	5,37	3,57	2,6	1,98			0,88	0,2	0,2
87g	Milch	m	1,98	3,83	2,86	1,65	1,07	0,62	0,2	0,2	0,2
90g	Milch	m	5,19	6,1	5,04	4,04	3	1,83	0,2	0,2	0,2
91g	Milch	m	2,2	6,13	4,844	2,12	3,36	1,26	0,2	0,2	0,2
87r	Milch	w	4,72	6,23	3,99	4	2,53	1,72	0,2	0,2	0,2
92g	Milch	m	4,05	2,74	2,22	2,62	1,29	0,53	0,2	0,2	0,2
80r	Milch	w		2,78	2,42	2,42			0,48	0,2	0,54
83r	Milch	w	6,12	5,32	5,23	4,06	3,19	2,79	0,2	0,2	0,2
82r	Milch	w	5,54	4,35	3,49	2,91	2,64	1,8	0,2	0,2	0,2
72r	Milch	w			5,17	3,92	1,93	1,94	0,42	0,2	0,2
82g	Milch	m			3,61	2,1	2,53	2,58	0,2	0,2	0,2
84g	Milch	m	3,45	2,46	1,95	1,88	1,2	1,21	0,2	0,63	0,2
71r	Milch	w	3,91	3,19	1,58	1,22	0,79		0,64	0,2	0,2
70r	Milch	w	3,76	3,99	2,15	1,95	0,94		0,2	0,2	0,5

### 10.3.3 Ziegenmuttern

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 17	Tag 21	Tag 25
77592	Fleisch	22,01	8,81	5,81	4,78	4,57	3,18	2,93	2,59
20865	Fleisch	16,05	6,13	4,93	4,19	3,77	2,88	1,99	2,79
20801	Fleisch	9,6	6,44	6,41	4,47	4,06	3,13	2,03	0,97
79147	Fleisch	10,32	7,88 >15		6,56	3,69	3,11	2,25	2,03
79112	Fleisch	6,3	3,65	4,29	3,6	2,16	2,64	1,68	0,75
79105	Fleisch	22,02	9,89	6,08	5,33	4,67	3,6	2,41	1,59
79050	Fleisch	8,18	5,81	8,75	5,17	4,34	3,25	1,93	2,51
79041	Fleisch	20,82	13,61	6,08	4,26	4,16	3,4	2,69	2,25
79137	Fleisch	10,09		7,7	4,58	3,73	3,06	1,68	1,64
20790	Fleisch	21,875	5,8	4,38	3,67	2,98	2,14	1,37	0,65
35985	Fleisch	40	13,875	5,95	5,76	4,28	3,07	2,15	1,44
77602	Fleisch	8,93	8,93		5,54	3,97	4,41	3,43	2,65
36	Milch	6,24	6,36	2,8	2,52	2,45	2,52	1,43	0,55
188	Milch	19,78	6,01	11,64		3,66	3,17	2,02	2,72
114	Milch	15,19	5	3,96	3,2	1,8	0,77	0,51	0,86
115	Milch	23,49	9,97	3,18	2,98	2,99	1,99	0,81	0,78
210	Milch	18,85	5,69	3,26	2,69	1,97	1,7	0,2	0,2
374	Milch	40	9,36	13,19	5,52	7,72	4,59	4,61	3,21
236	Milch	6,8	4,31	3,77	2,98	2,07	1,55	1,99	0,43
929	Milch	16,25	4,42	1,72	1,83	0,45	0,53		0,41
821	Milch	6,38		2,86	1,8		0,58	0,6	
828	Milch	5,71	3,67	4,11	2,7		1,58	0,57	
822	Milch	18,84	8,38	5,23	3,28		1,1	0,49	
829	Milch	14,63	3,32						

### 10.3.4 Ziegenlämmer

Tiernummer	Rasse	Geschlecht	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 19	Tag 26
21622	Fleisch	m	3,68	2,85	0,77	1,42	1,54	0,2	0,2	0,2	0,2
21623	Fleisch	w		1,75	1,53	1,92	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
21625	Fleisch	w	0,47	2,12	1,23	0,82	0,2	0,45	0,2	0,2	0,2
21626	Fleisch	w	2,76	2,68	1,06	0,8	1,28		0,2	0,2	0,2
21627	Fleisch	w	5,87		1,99	0,95	0,65	0,2	0,2	0,2	0,2
21628	Fleisch	w	5	6,59	1,68	1,34	1,87	1,67	0,2	0,2	0,2
21629	Fleisch	m	2,58	3,6		1,77		1,8	0,2	0,2	0,2
21630	Fleisch	m	1,2	4,28	3,07	2,05	0,91	0,43	0,2	0,2	0,2
21631	Fleisch		0,4	2,38							
21632	Fleisch	w		6,89	3,26	2,33	0,63	0,65	0,2	0,2	0,2
21634	Fleisch	w	0,4		2,28		1,09	1,26	0,2	0,2	0,2
21635	Fleisch	m	0,64	10,77	5,31	2,38	1,52	1,97	0,2	0,2	0,2
21637	Fleisch	m			4,98	3,21	2,03	1,86	0,2	0,2	0,2
21638	Fleisch	w		1,03	2,86	2,06	2,24	1,26	0,2	0,2	0,2
21639	Fleisch	m	4,63	4,23	2,73	2,5	0,95	0,2	0,54	0,2	0,2
21640	Fleisch	m	3,39	3,6	1,27	0,7	1,25	1,25	0,2	0,2	0,2
21641	Fleisch	w	6,24	2,4	1,03	1,583	1,31	0,2	0,2	0,2	0,2
21643	Fleisch	w	2,12	0,93	0,57	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2
21644	Fleisch	w	2,27	1,28	0,86	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
21645	Fleisch	m			3,31	1,94	1,55	1,22	0,2	0,2	0,2
21646	Fleisch	w			5,33	3,33		0,75	0,2	0,2	0,2
21647	Fleisch			2,65	1,45	0,5	0,53	0,2	0,2	0,2	0,2
28r	Milch	w	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
29r	Milch	w	1,56		0,2	0,2	0,2		0,2	0,2	0,2
35g	Milch	m	1,08	2,04	0,84	0,49	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
34g	Milch	m	0,2	1,26	0,2	0,87	0,43	0,2	0,2	0,2	0,2
33r	Milch	w	2,86	1,89	0,67	0,2	0,69				
34r	Milch	w	4,76	2,98	1,37	0,97	0,41	0,76			
35r	Milch	w	2,17	2,8	1,4	1,23	0,95	0,2	0,2	0,2	0,2
36r	Milch	w	3,52		1,48	0,52	0,72				
37g	Milch	m	2,57	2,81	1,75	0,84	1,05	0,45	0,2	0,2	0,2
38g	Milch	m	4,87	3,03	2,21	1,16	0,89	0,73	0,2	0,2	0,2
37r	Milch	w	5,25	4,64	3,1	2,15	0,7				
39g	Milch	m	4,88	0,12	1,02	-0,2		0,58	0,2	0,2	0,2
40g	Milch	m	4,19	2,16	1,56	0,88	0,67	0,68	0,51	0,2	0,2
43r	Milch	w	2,33	1,69	1,31	0,56	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
44r	Milch	w	2,32	1,23	1,07	0,53	0,41	0,5	0,2	0,2	0,2
41r	Milch	w		0,2	0,2		0,2	0,2			
42r	Milch	w		0,88	0,4	0,44	0,55				
47g	Milch	m	2,92		0,5				0,2	0,2	0,2
48g	Milch	m		1,85	0,8	0,2	0,2	0,2	0,51	0,2	0,2
49g	Milch	m	0,2	0,7	0,54	0,2	0,2		0,2	0,53	0,2
50g	Milch	m			1,14	0,48	0,2			0,2	0,2
51g	Milch	m	2,3	2,6	1	0,2	0,2		0,2	0,2	0,2

## 10.4 Rohdaten Immunglobulin G und M

Werte aufgeführt in Units

### 10.4.1 Schafmuttern IgG

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 17	Tag 21	Tag 25
911005	Fleisch	58	47	48	60	68	60	64	52
211065	Fleisch	46	44	48	62	48	54	57	57
111072	Fleisch	65	59	60	50	54	59	79	48
611064	Fleisch	61	48	54	66	47	69	52	48
111085	Fleisch	41	45	50	45	53	39	37	44
711015	Fleisch	54	57	70	97	95	60	82	54
211039	Fleisch	53	53	72	65	56	54	52	61
111144	Fleisch	37	51	64	46	53	49	48	49
211080	Fleisch	43	50	58	58	44	48	43	56
11017	Fleisch		64	65	78	67	82	4	67
611117	Fleisch	103	65	82	74	68	76	79	95
811008	Fleisch	64	65	73	70	73	61	88	68
911130	Fleisch	31	63	40	56	48	37	47	51
111040	Fleisch	76	57	96	71	76	110	85	114
611112	Fleisch								
103	Milch	109	97	89	98	103	97	111	108
108	Milch	43	48	48	60	57	70	90	60
480	Milch	77	58	61	65	66	92	106	94
274	Milch	51	64	81	62	62	64	72	116
221	Milch	69	53	70	69	57	75	60	71
496	Milch	41	30	47	36	71	97	94	69
483	Milch	38	52	50	65	46	57	53	59
104	Milch	68	62	57	47	55	67	76	58
830	Milch	65	58	48	43		43	51	
224	Milch	54	44	42	33		55	49	
839	Milch	90	38	97	54		64	64	
225	Milch		38	55			62	84	

## 10.4.2 Schaflämmer IgG

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 19	Tag 26
411084	Fleisch	5	7	4	5	4	5	4	5	9
411085	Fleisch	19	9	23	13	13	16	8	8	6
411086	Fleisch		51	61	23					
411088	Fleisch	159	155	143	137	92	69	58	42	
411089	Fleisch	98	99	94	83	64	71	44	29	47
411090	Fleisch	35	79	73	65	65	62	46	37	37
411091	Fleisch	10	96	77	77	99	80	60	38	32
411092	Fleisch	99	89	84	104	92	70	64	38	32
411093	Fleisch	112	150	162	127	92	128	100	76	57
411094	Fleisch	11		115	107	110		59	43	38
411095	Fleisch	10	162	120	138	140		97	75	69
411096	Fleisch		125	86	75	64	64	46	45	32
411097	Fleisch	3	93	100	79	87	84	48	42	37
411098	Fleisch	23	53	78	46	43	43	21	22	21
411099	Fleisch	7								
411100	Fleisch	73	59	57	58	70	64	40	34	52
411101	Fleisch	76	80	63	55	60	49	41	48	45
411102	Fleisch	11								
411103	Fleisch		134	126	103	96	97	87	69	59
411104	Fleisch				86	88	80	58	36	42
411105	Fleisch				68	82	85	75	36	25
411106	Fleisch				52	58	59	37	37	84
89r	Milch	67	67	65	76	80	64	56	38	34
93g	Milch	65	55	57	49	40	41	35		
84r	Milch			105	69	84	69	72	80	35
85r	Milch	5	102	83	52	90	87	63	33	39
86r	Milch	5	50	45	39	40	29	33	25	34
79r	Milch	64	67	50	52			44	30	26
87g	Milch	4	115	93		65	72	84	52	45
90g	Milch	32	97	87	83	74	75	54	43	41
91g	Milch	3	99	65	58	62		45	33	26
87r	Milch	27	112	109		63	70	61	47	38
92g	Milch	56	48	42	43	37	36	33	31	
80r	Milch	101	80		71			50	47	46
83r	Milch		134	86	118	111	105	51	40	38
82r	Milch	31	32	64	58			28		
72r	Milch			106	63	60	66	52	34	32
82g	Milch	23				67	56	92	48	34
84g	Milch	7	48	32	44	24	41	25	17	22
71r	Milch	75	82	69	164	59		104	40	34
70r	Milch	82	40	83	42	53		34	27	25

### 10.4.3 Ziegenmuttern IgG

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 17	Tag 21	Tag 25
77592	Fleisch	51	54	57	66	60	65	65	76
20865	Fleisch	50	55	76	49	47	48	76	50
20801	Fleisch	78	71	50	52	72	71	55	77
79147	Fleisch	35	35		34	49	60	48	50
79112	Fleisch	52	53	35	37	49	51	56	52
79105	Fleisch	53	52	49	51	60	63	75	81
79050	Fleisch	76	85	114	71	154	119	165	79
79041	Fleisch	45	49	54	45	41	54	65	54
79137	Fleisch	78		67	70	80	93	84	140
20790	Fleisch	72	68	74	69	66	70	77	76
35985	Fleisch	68	57	59	66	84	66	113	86
77602	Fleisch	88	93		126	78	89	84	99
36	Milch	97	78	80	70	79	68	73	74
188	Milch	124	154	110		58	150	129	118
114	Milch	48	58	60	61	67	76	66	77
115	Milch	49	58	59	62	65	80	77	63
210	Milch	70	56	76	72	81	86	87	86
374	Milch	77	65	80	84	80	85	70	86
236	Milch	48	41	52	55	63	91	91	84
929	Milch	30	40	46	41	42		59	58
821	Milch	34	38	51	45		53	65	
828	Milch	58	65	75	84		87	86	
822	Milch	125	71	49	47		59	52	

### 10.4.4 Ziegenlämmer IgG

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 19	Tag 26	
	21622	Fleisch	91	119		80	77	53	39	32	35
	21623	Fleisch		77		55			36	30	33
	21625	Fleisch		66	57	60	50	42	30	36	35
	21626	Fleisch		104	86	86	72		50	41	33
	21627	Fleisch	117		77	69	50		46	32	34
	21628	Fleisch	96	175	110	113	143	127	100	69	68
	21629	Fleisch	59	148		128		113	77	62	51
	21630	Fleisch		264	216	199	181	186	122	79	59
	21631	Fleisch	9	138							
	21632	Fleisch		265		192	168	149	107	99	68
	21634	Fleisch			150		168	121	133	62	77
	21635	Fleisch		257	269	243	214	158	89	61	52
	21637	Fleisch			111	99	126	109	64	55	48
	21638	Fleisch	9		174	155	150	128		79	56
	21639	Fleisch	215	178	170	141			110	67	62
	21640	Fleisch	137	115	97	112	83	94	59	40	36
	21641	Fleisch	114		111	98	92	84	57		44
	21643	Fleisch	88	74	64	55		54	44		32
	21644	Fleisch	81	78	73	76	54	57	45		37
	21645	Fleisch			190		167	136	100		79
	21646	Fleisch			163	133		122	73		59
	21647	Fleisch		80	76	62	64	51	56		33
28r	Milch	76	89	75	72	60	55	51	29	30	
29r	Milch	52		26	27	25		17	12	23	
35g	Milch	2	133	142	106	133	86	74	53	36	
34g	Milch	8	108		150	101		70	55	28	
33r	Milch	85		142	105	96					
34r	Milch	141	165	211	173	153	119				
35r	Milch	44	123	105	101	96	83	54		28	
36r	Milch	70	119	96	93	81					
37g	Milch		193		144		132	77	59	39	
38g	Milch	77			97			63	56	58	
37r	Milch	73		117	109						
39g	Milch	153	130	122		109	84	63	56	58	
40g	Milch	203	183	163	140	119		87	73	56	
43r	Milch	164	147	174	131	96	107			45	
44r	Milch		203	159		119			67	52	
41r	Milch			64		45	45				
42r	Milch		103	126	88	95					
47g	Milch	133		114				45		29	
48g	Milch		254	100	209	77	69	117	46	31	
49g	Milch		52	72	45	45	42	37	31	23	
50g	Milch			167	133	132			79	56	
51g	Milch		145	182	174	124		66	45	44	

### 10.4.5 Ziegenmuttern IgM

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 17	Tag 21	Tag 25
77592	Fleisch	46	64	50	54	67	56	56	41
20865	Fleisch	41	51	44	42	43	44	66	43
20801	Fleisch	88	51	70	65	67	74	69	57
79147	Fleisch	78	69		59	66	54	64	80
79112	Fleisch	87	115	80	76	106	87	73	84
79105	Fleisch	69	63	61	56	49	56	55	53
79050	Fleisch	35	59	73	40	55	38	50	47
79041	Fleisch	57	76	53	41	56	42	54	53
79137	Fleisch	49		66	48	20	56	44	27
20790	Fleisch	96	59	53	75	103	55	58	62
35985	Fleisch	82	58	99	30	59	76	31	71
77602	Fleisch	151	149		87	102	127	100	101
36	Milch	111	114	97	112	122	102	103	95
188	Milch	63	97	65		58	72	68	49
114	Milch	84	93	81	92	98	81	72	101
115	Milch	81	73	79	79	62	67	58	72
210	Milch	72	83	62	68	54	54	69	60
374	Milch	99	75	57	69	87	59	73	65
236	Milch	71	75	77	105	116	108	88	98
929	Milch	102	133	75	66	34		72	71
821	Milch	109	145	148	133		94	113	
828	Milch	113	169	207	148		136	239	
822	Milch	70	70	90	78		92	72	

### 10.4.6 Ziegenlämmer IgM

Tiernummer	Rasse	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 12	Tag 19	Tag 26
21622	Fleisch	29	24		24	28	23	16	20	17
21623	Fleisch		36		37			37	28	36
21625	Fleisch		103	103	87	89	81	31	20	29
21626	Fleisch		82	72	87	75		35	24	22
21627	Fleisch	129		85	78	58		24	21	26
21628	Fleisch	31	66	88	69	40	50	32	19	22
21629	Fleisch	22	75		72		59	25	28	27
21630	Fleisch		70	53	50	60	50	29	26	32
21631	Fleisch	10	38							
21632	Fleisch		79		57	49	67	38	39	36
21634	Fleisch			62		69	62	31	26	29
21635	Fleisch		98	43	104	81	48	23	21	20
21637	Fleisch			55	55	43	43	31	21	13
21638	Fleisch	15		111	92	99	76		24	24
21639	Fleisch	71	69	76	74			26	28	33
21640	Fleisch	44	70	70	42	64	37	19	22	23
21641	Fleisch	46		56	51	46	41	29		47
21643	Fleisch	36	44	31	31		24	25		23
21644	Fleisch	51	34	31	28	26	28	23		23
21645	Fleisch			261		79	57	89		111
21646	Fleisch			78	29		54	31		33
21647	Fleisch		30	29	26	31	24	21		16
28r	Milch	20	41	19	19	22	21	28	44	44
29r	Milch	55		23	34	57		65	36	63
35g	Milch	4	161	128	159	93	131	59	20	13
34g	Milch	11	165		193	129		60	39	23
33r	Milch	90		181	134	97				
34r	Milch	132	149	219	142	118	102			
35r	Milch	40	156	130	62	119	61	25		17
36r	Milch	36	108	96	76	70				
37g	Milch		183		116		73	45	44	36
38g	Milch	86			92			53	44	40
37r	Milch	72		88	102					100
39g	Milch	141	151	131		85	88		29	42
40g	Milch	271	249	265	173	159		77	72	44
43r	Milch	230	224	189	138		130		38	27
44r	Milch		292	250		160	182		47	36
41r	Milch			111		59	65			
42r	Milch		244	217	212	135				
47g	Milch	234		186				85		27
48g	Milch		343	164	206	120	122	104	31	25
49g	Milch		68	75	57	40	38	32		52
50g	Milch			169	121	125			46	33
51g	Milch		151	159	138	115		54	44	29

# 11 Zusammenfassung

**Bianca Wiebusch**

## **Konzentration von trächtigkeits-assoziierten Glykoproteinen, sowie der Immunglobuline IgG und IgM im postpartalen Zeitraum bei Schafen und Ziegen unterschiedlicher Nutzungsrichtungen**

Trächtigkeit-assoziierte Glykoproteine (PAG) sind den Aspartat-Proteasen verwandte Glykoproteine, die von binukleären Zellen der Plazenta produziert werden. Sie wurden bereits bei diversen Tierspezies nachgewiesen, insbesondere aber bei Wiederkäuern sind sie gut untersucht. Welche dezidierte Funktion sie haben, ist aber noch immer nicht klar. Häufig diskutiert wird ein Einfluss auf das Immunsystem. In der vorliegenden Arbeit wurden PAG im postpartalen Zeitraum bei Schafen und Ziegen untersucht. Ziel der Studie war die Erfassung der Konzentrationsverläufe post partum, die Untersuchung der Übertragung der PAG auf die Neonaten via Kolostrum sowie der Vergleich von je einer Fleisch- und einer Milchrasse. Ebenfalls untersucht wurden die IgG-Konzentrationen post partum in Muttertieren und Lämmern, bei den Ziegen auch die IgM-Konzentrationen. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein ELISA entwickelt.

Als Versuchstiere standen Ziegen der Rassen Burenziege (Fleisch) und Bunte Deutsche Edelziege (Milch) sowie Schafe der Rassen Schwarzköpfiges Fleischschaf (Fleisch) und Ostfriesisches Milchschaaf (Milch) zur Verfügung. Mütter und Lämmer wurden ab dem Tag der Geburt via Blutentnahme beprobt. Den Lämmern wurde an den ersten sechs Lebenstagen je eine Blutprobe entnommen, darauf folgend noch einmal 1x pro Woche für insgesamt drei Wochen. Den Muttertieren wurde beginnend mit dem Tag der Niederkunft zweimal pro Woche Blut entnommen, für insgesamt vier Wochen.

In den Ergebnissen zeigte sich bei den Muttertieren durchweg ein rascher Abfall der PAG-Konzentration, die aber zum Endzeitpunkt des Versuches noch messbar war. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Rassen waren dabei bei den Ziegen von Tag 7 bis Tag 21, bei den Schafen an den Tagen 7-17 sichtbar. Dabei

starteten die Milchrassen mit höheren Werten, bauten die PAG aber offenbar schneller ab. Bei den Lämmern zeigte sich nur bei den Ziegenlämmern signifikante Unterschiede in der PAG-Konzentration an den Tagen 1-4, bei den Schaflämmern war dieser Effekt nur an Tag 5 statistisch signifikant. Die PAG-Konzentration der Lämmer stieg nach Kolostrumaufnahme erst einmal deutlich an, ehe die Konzentration binnen 10 Tagen unter die Nachweisgrenze fiel.

Die IgG-Konzentrationen der Ziegen stieg post partum sukzessive an, bei den Schafen war dieser Effekt nicht zu sehen. Bei den Lämmern beider Spezies fand wie zu erwarten ein starker Anstieg nach Kolostrumaufnahme statt. Gleiches gilt für die IgM-Werte bei den Ziegen. Sehr interessant war hier, dass sowohl bei den adulten Tieren als auch bei den Neonaten an mehreren Messzeitpunkten signifikante Rasseunterschiede bestanden.

Korrelationen zwischen den drei Variablen waren wenig ausgeprägt. PAG und IgG zeigten bei den Lämmern an einigen Tagen eine positive Korrelation, bei den Ziegen galt dies auch für IgG und IgM, wobei der Effekt bei den Milchziegen stärker ausgeprägt war. Bei den Schaflämmern hingegen waren die Korrelationen für die Fleischschafe stärker.

Es konnte nachgewiesen werden, dass PAG sowohl aus dem mütterlichen Kreislauf in die Milch als auch von dort in den Organismus des Neonaten übertreten. Außerdem müssen geringe Mengen PAG schon die Plazenta passieren, denn auch vor der Kolostrumaufnahme beprobte Lämmer zeigten messbare Werte. Die Korrelation mit den IgG-Konzentrationen deutet auf einen vergleichbaren Transport durch das Darmlumen, evtl. sogar einen Co-Transport hin, was aber noch näher untersucht werden muss.

Der IgM-ELISA für Schafe konnte nicht erfolgreich etabliert werden, da es zu starken unspezifischen Bindungen und mithin großem Hintergrundrauschen kam. Der IgG-ELISA für Schafe sowie die beiden Testsysteme für IgG und IgM bei Ziegen sind gut durchführbare, kostengünstige Alternativen zu erhältlichen Test Kits.

## 12 Summary

**Bianca Wiebusch**

### **Postpartum concentrations of pregnancy-associated glycoproteins (PAG), immunoglobulin IgG and IgM in two different breeds of sheep and goats**

Pregnancy-associated glycoproteins are related to aspartate proteases. They are produced by binucleate cells of the placenta in different species. Already a lot of research has been done on PAG, but their function remains unclear.

In the present study, PAG-concentrations have been examined in the postpartum period in sheep and goats, each a dairy and a meat breed. Too, the concentrations of IgG, and in the goats of IgM, were measured, using a newly designed ELISA-system.

Goat kids and lambs were sampled for six consecutive days beginning at the day of birth. In the following three weeks one sample per week was taken. Does and ewes were sampled twice a week, beginning with parturition and ongoing for four weeks in total.

Does and ewes showed declining PAG-levels over the time of examination, at the end of the trial there were low, but measurable levels of PAG. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in the does from day 7 to day 21 and in the ewes from day 7 to day 17. Dairy breeds started with higher levels of PAG which then decreased more rapidly than in the meat breed. Sheep lambs had only on day 5 significant differences between the two breeds, but goat kids presented them at days 1 to 4. PAG concentrations in the plasma rose after colostrum uptake before they started decreasing and reaching unmeasurable levels around day 10.

IgG concentrations in the does rose gradually after parturition, which could not be noticed as strong in the ewes. In lambs and goat kids, there was a noticeable and expected rise of IgG, and in goats, IgM, in the plasma. Interestingly, in does and goat kids, there were several points of measurement with significant differences of IgM concentrations between the two breeds.

Correlations between the three variables were scarce. PAG and IgG showed positive correlations in lambs and goat kids, in the goats as well for IgG and IgM. The effect was stronger for dairy goats, in the two sheep breeds it was clearer in the meat sheep.

With this work it could be demonstrated, that PAG are transferred from the maternal circulation to colostrum and via colostrum into the neonates as well as that they are transported in utero, for lambs and goat kids had measurable levels of PAG before colostrum uptake. Correlations to IgG concentrations hint to a comparable transport through the intestine's mucosa, possibly a co-transport, which needs further research.

The IgM-ELISA could not be established due to very high blank values. But the three newly setup ELISAs for IgG and IgM-analysis are a handy and cost-effective alternative to ready-to-use-kits.

## 13 Danksagung

*Ich möchte an dieser Stelle allen Menschen danken, die ein Stück dieses Weges mit mir gegangen sind und mich auf die vielfältigsten Weisen unterstützt haben. Ich kann nicht alle nennen, fühlt euch aber bitte trotzdem gemeint!*

Als erstes vielen Dank Herrn Prof. Matthias Gaulty für die Überlassung und Betreuung des Themas und Herrn Prof. Gerhard Breves für die interne Betreuung an der TiHo. Herrn Dr. Christian Lambertz herzlichen Dank für die direkte Ansprechbarkeit und konstruktiven Anmerkungen im gesamten Verlauf der Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe Immunologie, speziell an Herrn Prof. Hans-Joachim Schubert, der sich meiner rasch und unbürokratisch angenommen hat, als Not am Mann war. Danke an Silke und Udo, ihr habt meine unzähligen Fragen geduldig beantwortet und die Höhen und Tiefen der ELISA-Entwicklung mit mir durchlebt.

Herrn Martin Beyerbach danke ich für die Unterstützung und professionelle Beratung in Fragen der Statistik.

Und natürlich: Danke allen, die ihr euch mein gepflegtes Jammern angehört und mich aufgebaut habt! Meinen DoktorandenkollegInnen in Göttingen und Hannover, der ProV, den bvvd-KollegInnen, meinen Freunden: Ihr habt mir über viele Durststrecken hinweggeholfen und nicht den Glauben daran verloren, dass diese Arbeit eines Tages fertig wird!

Final, aber nicht weniger innig, danke ich meinen Eltern. Vielleicht habt ihr euch zwischendurch gefragt: Was macht sie da so lange? Aber ihr habt mich trotzdem unterstützt, auch, als das Geld beinahe über den Ausgang entschieden hätte. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Danke, Andreas. Du warst und bist mein Ruhepol, mein Anker, meine Reißleine.

Marian Leander hat final dafür gesorgt, dass trotz kurzer Nächte und totaler Erschöpfung plötzlich ein Ende in Sicht war. Ich wusste: Ich habe das geschafft – dann schaffe ich auch die Dissertation!