

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“



Forschungsbericht

Nr. 181

Untersuchungen zur genetischen Prädisposition von Schweinen gegenüber PRRS

Projektleitung: Prof. Dr. K. Schellander

Dr. agr. M. J. Pröll

Dr. agr. C. Neuhoff

Md. A. Islam

Dr. agr. C. Große-Brinkhaus

Dr. agr. M. J. Uddin

Institut für Tierwissenschaften
Professur für Tierzucht und Tierhaltung

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standort-gerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meckenheimer Allee 172 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2285; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und
Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes
Nordrhein-Westfalen
Bonn, Juli 2015

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Karl Schellander

Projektbearbeiter: Dr. agr. M. J. Pröll
Dr. agr. C. Neuhoff
M. A. Islam
Dr. agr. C. Große-Brinkhaus
Dr. agr. M. J. Uddin

Institut für Tierwissenschaften
Professur für Tierzucht und Tierhaltung
Endenicher Allee, 53115 Bonn
Tel.: 0228/73 9328; Fax.: 0228/73 2284

Kooperation:

Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn

Zitiervorschlag:

PRÖLL, M. J., NEUHOFF, C., ISLAM, M. A., GROSSE-BRINNHAUS, C., UDDIN, M. J., SCHELLANDER, K. (2015): Untersuchungen zur genetischen Prädisposition von Schweinen gegenüber PRRS. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunkts USL, Nr. 181, 49 Seiten

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Problemstellung/Wissensstand	1
1.2	Zielsetzung.....	3
2.	Material und Methoden	4
2.1	Material.....	4
2.1.1	Tiere	4
2.1.2	Proben.....	4
2.1.3	Zellisolierung von primären respiratorischen Zellen	5
2.2	Methoden	6
2.2.1	Zellcharakterisierung durch Durchflusszytometrie	6
2.2.2	Zellcharakterisierung durch Immunfluoreszenz.....	7
2.2.3	Viruswachstum, Virus Aufreinigung und Virustiter-Bestimmung	7
2.3.1	Virusinfektion der respiratorischen Zellen.....	8
2.3.2	RNA Isolierung	9
2.4	Auswertung.....	17
2.4.1	Next generation sequencing Analyse	17
2.4.2	Real-Time PCR Analysen	19
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	20
3.1	Zellcharakterisierung der Lungen-DCs und PAMs	20
3.2	Zellcharakterisierung der Trachea-Epithelzellen.....	20
3.3	Globale Transcriptomprofil Analyse der Piétrain und Duroc Lungen-DCs.....	21
3.4	PRRSV Wachstum auf Lungen-DCs.....	22
3.5	Cluster- und Netzwerk-Analyse nach der RNA-Sequenzierung	24
3.6	Signalweg-Analyse der Piétrain und Duroc Lungen-DCs Cluster	25
3.7	Virus-Wirt-Interaktion.....	26
3.8	Immunreaktion verschiedener Immunzellen auf eine PRRSV Infektion	28
4.	Zusammenfassung	37
5.	Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis	38
6.	Literaturverzeichnis.....	39
7.	Anhang	44
8.	Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten.....	46
9.	Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte	46
10.	Liste über Veröffentlichungen	46
11.	Liste über Vorträge.....	47
12.	Liste über Pressemitteilungen	47

II

13.	Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen, Demonstrationen	47
14.	Abstract	48
15.	Kurzfassung.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Experimentelles Design I für die Virusinfektion mit PRRSV	9
Abbildung 2:	Experimentelles Design II für die RNA Isolierung, RNA Isolierung für RNA-Seq von gepoolten Piétrain und Duroc Lungen-DCs (I); RNA Isolierung für die quantitative Real-Time PCR von gepoolten Piétrain und Duroc Lungen-DCs, gepoolten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen und gepoolten Piétrain und Duroc PAMs (II) sowie von nicht-gepoolten Lungen-DCs und nicht-gepoolten Trachea-Epithelzellen (III) von Piétrain (A 1, 2, 3) und Duroc Tieren (A 1, 2, 3); nicht-infizierte Zellen (grüner Kreis) zum Zeitpunkt 0 h und infizierte Zellen (blauer Kreis) zum Zeitpunkt 3, 6, 9, 12, 24 hpi	10
Abbildung 3:	Workflow des LT TruSeq RNA Sample Preparation Protokolls	14
Abbildung 4:	Immunfluoreszenz Assay (IFA) der Trachea-Epithelzellen mit den spezifischen Epithelzellmarkern zonula occludens protein (ZO-1) und Cytokeratin (CK). Merge stellt die Überlagerung der beiden Färbungen dar und DAPI die Färbung des Nukleus	21
Abbildung 5:	Virus-Sequenz-Alignment von Piétrain und Duroc Lungen-DCs vor und nach der PRRSV Infektion	23
Abbildung 6:	Anzahl der runter regulierten Gentranskripte in PRRSV infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs	27
Abbildung 7:	Anzahl der hoch regulierten Gentranskripte in PRRSV infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs	27
Abbildung 8:	Virus-Wirt-Interaktion (modifizierte Abbildung, Zhou et al. (2011)) * Gene und Genfamilien, die mit der RNA-Seq identifiziert wurden, + Gene, die mittels Real-Time PCR validiert wurden	29
Abbildung 9:	IL-6 Expressionprofile in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels RNA-Seq (A) und Real-Time PCR (B), IL-6 Expressionprofile PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (C) und IL-6 Expressionprofile PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (D) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi	31
Abbildung 10:	IL-6 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-	31

	infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot	
Abbildung 11:	NF- κ B1 Expressionprofil in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels Real-Time PCR (A), NF- κ B1 Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (B) und NF- κ B1 Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (C) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi	32
Abbildung 12:	NF- κ B p50 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot	33
Abbildung 13:	NF- κ B p50 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot	33
Abbildung 14:	TNF- α Expressionprofil in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels Real-Time PCR (A), TNF- α Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (B) und TNF- α Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (C) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi	34
Abbildung 15:	TNF- α Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot	35
Abbildung 16:	TNF- α Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot	35
Abbildung 17:	β -Actin Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot	35
Abbildung 18:	β -Actin Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oberflächenantikörper für die Durchflusszytometrie	6
Tabelle 2:	Kandidatengenauswahl für die Validierung mittels quantitativer Real-Time PCR	15
Tabelle 3:	Erst- und Zweit-Antikörper für die Proteindetektion mittels Western Blot	16
Tabelle 4:	„Top 10 Liste“ der Signalwege für Piétrain und Duroc Lungen-DCs	25

Abkürzungsverzeichnis

Acc Nr	Accession Nummer
BIC	Bayesian information criterion
Bp	Basenpaare
cDNA	Complementary DNA
CK	Cytokeratin
CPE	Cytopathische Effekt
CT	Threshold cycle
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindole
DCs	Dendritische Zellen
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dpi	Tage post Infektion
Du	Duroc
F	Forward
FBS	Fetal Bovine Serum
hpi	h post Infektion
HSD	Tukey Honest Significant Difference
IFA	Immunfluoreszenz Assay
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank
LV	Lelystad virus
MEM-NEAA 100 x	MEM Non-Essential Amino Acids 100x
MOI	Multiplicity of infection
min	Minute
NGS	Next generation sequencing
P	Primer
PAMs	Pulmonaren Alveolarmakrophagen
PFU/ml	Plaque-forming units per ml
Pi	Piétrain
PRRs	Pattern-recognition receptors
PRRS	Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom
PRRSV	Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
R	Reverse
RBC	Red Blood Cell
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung

s	Sekunde
rpm	Rounds per minute
ZO-1	Zonula occludens protein

1. Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom (PRRS) ist einer der weltweit wirtschaftlich bedeutendsten Krankheitskomplexe, das pro Jahr erhebliche Verluste in der Schweineproduktion verursacht (Balasuriya 2013, Neumann et al. 2005). Diese Krankheit wurde erstmals 1987 in den USA entdeckt und trat 1990 in Europa auf (reviewed by Albina 1997). Eine PRRS Erkrankung kann sich zu einem in schweren Reproduktionsstörungen bei tragenden Sauen äußern und u. a. zu Totgeburten, späten Abgängen, vorzeitigem Abferkeln, mumifizierten Ferkeln sowie zu einem sehr späten Wiedereintritt in die Rausche führen. Zum anderen wirkt sich PRRS auf die Atemwege aus und kann zu Atemnot bei jungen Schweinen führen sowie sich in einer interstitiellen Pneumonie mit Atembeschwerden (Dyspnoe) äußern. Verursacht wird PRRS durch das PRRS-Virus (PRRSV). PRRSV ist ein positiv orientierter Einzelstrang RNA Virus, der zu der Familie Arteriviridae gehört (Conzelmann et al. 1993, Meulenberg et al. 1993). Generell wird das PRRSV in zwei unterschiedliche Genotypen gegliedert: ein europäischer und ein amerikanischer Genotyp. Beide Genotypen weisen eine 55-70 % morphologische und strukturelle Sequenzähnlichkeit auf. Das PRRSV gehört zu den mutationsfreudigen RNA Viren, dadurch treten immer wieder innerhalb der oben genannten Genotypen Sequenzunterschiede auf (Balasuriya 2013, Benfield et al. 1992, Collins et al. 1992, Modrow et al. 2010, Wensvoort et al. 1991). Eine weitere produktionsgefährdende Eigenschaft des Virus ist die leichte Übertragbarkeit des PRRSV innerhalb von und zwischen den Betrieben. Es genügen z. B. Nasensekret, Kot oder Kleidung, um das Virus innerhalb einer Produktionsgruppe oder zwischen Betrieben zu übertragen. Auch Sperma oder Aerosole können Übertragungswege des krankheitsverursachenden Virus sein (reviewed by Cho and Dee 2006, reviewed by Rossow 1998).

Der Einsatz gezielter Präventionsmaßnahmen zur Bekämpfung und Eindämmung dieser Krankheit ist aufgrund der vielen sowie einfachen PRRSV Übertragungswege und der Mutationsfreudigkeit des Virus von großer Bedeutung. Die Kontrolle der optimalen Stallhygiene und das Einhalten der vorgeschriebenen Haltungsbedingungen sind daher grundlegend. Zusätzlich sollten die Schweine präventiv mit Lebend- oder Totimpfstoffe geimpft werden. Allerdings reichen diese Impfstoffe qualitativ nicht aus, um einen vollständigen Immunschutz der Tiere zu gewährleisten (Brockmeier et al. 2002, reviewed by Sørensen et al. 2006, reviewed by Zimmerman et al. 2012).

Aus früheren Untersuchungen geht hervor, dass PRRSV eine enge Virus-Wirt-Interaktion eingeht. Es wird beschrieben, dass das Virus die Immunmerkmale des Wirts stark moduliert und so der Wirt keine adäquate Immunreaktion auf eine PRRSV Infektion ausführen kann (Beura et al. 2010, Chen et al. 2010, Genini et al. 2008, Li et al. 2010, Wang et al. 2013).

Indikatoren für eine genetische Variabilität in der Reaktion auf einer PRRSV Infektion wurden zusätzlich in früheren Studien geliefert (Ait-Ali et al. 2011, Halbur et al. 1998, reviewed by Lunney and Chen 2010, Petry et al. 2005). Bekannt ist, dass die schwachen und ineffektiven Immunreaktionen der Schweine post PRRSV Infektion zu persistenten Erkrankungen führen und somit zu hohen ökonomischen Verlusten in der Schweineproduktion (reviewed by Murtaugh et al. 2002, reviewed by Zimmerman et al. 2012).

1.2 Zielsetzung

Bislang liegen wenige Erkenntnisse bezüglich der Einflüsse genetischer Elemente und Funktionen auf die protektive Immunreaktion post PRRSV vor. Die Gründe für die ineffektive Immunreaktion von Schweinen post PRRSV Infektion als auch die Auswirkungen dieser unzureichenden Immunreaktion sind zu klären.

Das Projektvorhaben zielt darauf ab:

- (1) die genetische Regulierung der PRRS Erkrankung bzw. der genetischen Einflüsse auf die Immunreaktion post PRRSV Infektion zu untersuchen
- (2) die globalen Veränderungen im Transkriptomprofil post PRRSV Infektion zu erkennen und zu beschreiben
- (3) die Expressionsprofile von unterschiedlichen respiratorischen Zellen post PRRSV Infektion zu bestimmen
- (4) funktionelle Kandidatengene mit einem großen Einfluss auf die Immunreaktion zu identifizieren

Mit den gewonnenen Erkenntnissen sollen zum einen im Rahmen von Zuchtprogrammen PRRSV resistente Schweine erzeugt werden und zum anderen effektivere Impfstoffe entwickelt werden, um das Leiden der Tiere zu minimieren. Darüber hinaus soll dies zur Reduzierung der ökonomischen Verluste führen.

2. Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Materialien und Methoden schließen die im Zwischenbericht vorgestellten Erweiterungen der Projekt-Meilensteine ein. Es sind Schweine einer Altersgruppe (30 Tage alt) zweier unterschiedlicher Rassen (Piétrain und Duroc) für die *in vitro* Studie ausgesucht worden. Anstatt einer umfasste die Versuchsreihe drei respiratorische Zelllinien. Die Versuchszeitpunkte wurden auf 0 h und 3, 6, 9, 12 und 24 hpi festgelegt. Die neuste Technologie - die RNA-Sequenzierung - konnte für das Transkriptomprofiling von dendritischen Zellen benutzt werden. Die Validierung mittels Real-Time PCR schloss ebenfalls alle drei respiratorischen Zelllinien ein. Drei selektierte Proteine wurden durch Western Blot bestimmt.

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Untersuchung der genetischen Regulierung der PRRS Erkrankung beim Schwein wurden verschiedene Proben von sechs weiblichen 30 Tage alten Ferkeln der zwei genetisch unterschiedlichen Schweinerassen Piétrain und Duroc verwendet. Die Tiere stammten von der Lehr- und Forschungsstation Frankenforst der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Drei Ferkel der Rasse Piétrain und drei Ferkel der Rasse Duroc wurden von je einem Wurf pro Rasse ausgewählt. Alle Ferkel waren gesund und wurden im Alter von 28 Tagen abgesetzt. Die Lehr- und Forschungsstation Frankenforst impft ihre Sauen nach einem statusunabhängigen Impfplan, so dass die Sauen dreimal pro Jahr mit dem Lebendimpfstoff Procilis® PRRS (Intervet), dem porcinen Parvovirus und gegen Rotlauf geimpft werden. Die Ferkel werden am Lebenstag 3 und 10 gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* geimpft.

2.1.2 Proben

Im Rahmen des Projektes wurden Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen aus der Trachea von allen sechs Versuchstieren isoliert (Isolierungsschritte werden im Einzelnen beschrieben, 2.1.3). Das Einschläfern der Tiere erfolgte mittels zweier Medikamente, zuerst bekamen die Ferkel Ketamin und anschließend T61 (Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH) gespritzt.

Der Brustkorb der Tiere wurde geöffnet und die gesamte Lunge einschließlich der Trachea entnommen. Danach wurden die Lungen von den Tracheen abgetrennt und mit sterilem Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) abgewaschen, bevor sie auf Eis in eine Transportkiste gelegt wurden. Die Tracheen wurden ebenfalls kurz mit DPBS abgewaschen und dann in 50 ml Falkonröhrchen, in denen sich steriles DPBS befand, überführt.

2.1.3 Zellisolierung von primären respiratorischen Zellen

Pulmonare Alveolarmakrophagen

Im Labor des Instituts für Tierwissenschaften wurden die Lungen nochmals mit sterilem DPBS abgewaschen und so von Blut und anderen Partikeln gesäubert. Zuerst wurden die pulmonaren Alveolarmakrophagen (PAMs) aus den Lungen isoliert. Dafür wurde 3x ca. 50-100 ml steriles DPBS mittels einer Plastikpipette in die Lungen gegeben und die Lungen anschließend massiert, damit die Flüssigkeit auch die kleinsten Alveolargänge in der Lunge erreichte. Im darauf folgenden Schritt wurde die Lungenlavageflüssigkeit mit der Plastikpipette angesaugt und in ein sauberes 50 ml Falkonröhrchen überführt. Es folgten Filterschritte zur Reinigung der Lavageflüssigkeit und Zentrifugationsschritte (1000 rpm für 10 min bei 4°C) zur Zellpelletierung. Um unerwünschte rote Blutkörperchen von den Zielzellen zu trennen, wurde 5 ml Red Blood Cell (RBC) Lysisbuffer verwendet. Die anschließende Zugabe von DPBS stoppte die Reaktion des Lysisbuffers. Dieser Vorgang wurde so oft durchgeführt, bis ein klares Zellpellet nach der Zentrifugation ersichtlich war. Die Zellzahl der PAMs wurde mit Hilfe der Anfärbung mit Trypan blue und einer Zellkammer bestimmt. Das Zellkulturmedium für PAMs bestand aus: Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™), mit den Zusätzen von 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 % Penicillin-Streptomycin 100 x konzentriert, 1 % Fungizone® Antimycotic, 1 % Sodium Pyruvate und 1 % MEM Non-Essential Amino Acids 100x (MEM-NEAA 100 x).

Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen (DCs) wurden nach dem Protokoll von Loving et al. (2007) isoliert, wobei kleine Veränderungen an dem Protokoll vorgenommen wurden. Verschieden große Gewebestücke wurden aus den ausgewaschenen Lungen geschnitten und in sterilen Petrischalen mit kaltem DPBS in sehr kleine und feine Stücke zerteilt. Ein Enzymverdau mit 2,5 mg Liberase und 20 µl DNase I wurde in einem 50 ml DPBS Falkonröhrchen angesetzt. Für eine Inkubationsperiode von 2 h wurden die feinen Lungengewebsstücke zusammen mit der Enzymmischung in einem auf 37°C vorgeheizten Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Gemisch durch ein 70 µm BD Biosciences Zellsieb gefiltert und die Enzymaktivität durch die Zugabe des DCs Kulturmediums gestoppt. Das Medium setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: RPMI-1640 mit den Zusätzen 10 % FBS, 1 % Gentamicin, 1 % Penicillin-Streptomycin 100 x konzentriert, 1 % Fungizone® Antimycotic und 1 % Sodium Pyruvate. Der anschließende Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C pelletierte die Zellen, so dass im Weiteren die roten Blutkörperchen durch die zuvor erläuterte RBC

Lysis Buffer Methode entfernt werden konnten. Im Anschluss daran konnten auch die primären Lungen-DCs in Kultur genommen werden.

Trachea-Epithelzellen

Der Transport der Tracheen zum Labor erfolgte in den schon erwähnten (2.1.2) 50 ml Falkonröhrchen, in denen sich steriles DPBS mit den Zusätzen 1 % Penicillin-Streptomycin 100 % konzentriert und 1 % Fungizone® Antimycotic befand. Vor der Zellisolierung mussten die Tracheen von Blut gesäubert und von Gewebepartikeln befreit werden. Anschließend wurden die Tracheen der Länge nach geöffnet und vorsichtig das innere Epithel abgezogen. Mit Hilfe von Skalpellern konnte das innere Epithel in kleine Stücke geschnitten werden, die anschließend in 6 Wellplatten ausgelegt wurden. Die Stücke trockneten ca. 1 - 4 min an, bevor tröpfchenweise Trachea-Epithelzellmedium in die Wells gegeben wurde. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen: 1:1 von RPMI-1640 und LH-9 Medium, und den Zusätzen 1 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin 100 x konzentriert sowie 1 % Fungizone® Antimycotic. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und nach sieben Tagen konnte das Tracheagewebestück aus der Platte entfernt werden. Danach wuchs ein Zellmonolayer und die FBS Konzentration wurde auf 10 % erhöht.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellcharakterisierung durch Durchflusszytometrie

Für die Zellcharakterisierung wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie ausgewählt. Lungen-DCs sowie auch PAMs wurden mittels Oberflächenantikörper bestimmt. Dafür wurden konjugierte Oberflächenantikörper verwendet, die in der nachstehenden Tabelle 1 aufgeführt sind.

Tabelle 1: Oberflächenantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Isotype	Clone	Fluoreszenz	Firma
CD86	IgG1	37301	APC	R&D Systems, cat. FAB141A
CD80	IgG1	37711	PE	R&D Systems, cat. FAB140P
CD40	IgG1	G28.5	FITC	NOVUS Biologicals®, cat. NB100-77786
CD11c	IgG	N418	PE-Cy7	eBioscience, cat. 25-0114
CD163	IgG1	2A10/11	FITC	Abdserotec, cat. MCA2311F

Für diese Analyse wurden die Zellen gesammelt, mit sterilem DPBS gewaschen und anschließend mit den in der Tabelle 1 aufgeführten Antikörpern einzeln, nach den Herstellerangaben angefärbt. Die Detektion erfolgte mittels dem FACSCanto Durchflusszytometer (BD Biosciences) und die Auswertung mit der Software FlowLogic® (BD Biosciences, Deutschland).

2.2.2 Zellcharakterisierung durch Immunfluoreszenz

Die Zellcharakterisierung der Trachea-Epithelzellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz Assay (IFA). Dafür wurden die Epithelzellen auf einen Objektträger übertragen und am darauffolgenden Tag mit DPBS gewaschen sowie mittels einer Aceton:Methanol-Lösung fixiert. Als Erstantikörper wurden mouse monoclonal Pancytokeratin Antikörper (mouse-monoclonal, Abcam, C-11, cat. ab7753) und Zonula occludens (ZO-1 Mid) (rabbit polyclonal, Invitrogen, cat. 40-2200) in der Verdünnung 1:400 in DPBS verwendet. Die Inkubation der Erstantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Als Zweitantikörper wurden cyanine 3-labeled donkey-anti-mouse serum und cyanine 2-labeled donkey-anti-rabbit serum (Dianova, Hamburg, Germany) eingesetzt. Der Nukleus konnte durch den Einsatz des 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) markiert werden. Die Aufnahmen der Zellfärbung erfolgten mit dem MoticAxiovision Mikroskop (Zeiss) (Eckerle et al. 2014).

2.2.3 Viruswachstum, Virus Aufreinigung und Virustiter-Bestimmung

Der europäische PRRSV Stamm Lelystad virus (LV) und die Zelllinie MARC-145 wurden dem Institut für Tierwissenschaften von Herrn Prof. Dr. Nauwynck von der Universität Belgien (Department of Virology, Parasitology and Immunology, in Ghent) zur Verfügung gestellt. Die Durchführung aller virologischen Experimente erfolgte im Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn unter der Institutsleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Drosten. Für die PRRSV Virusanzucht wurde die Zelllinie MARC-145 verwendet. Das Zellkulturmedium dafür bestand aus: DMEM und den Zusätzen 10 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin 100 x konzentriert und 1 % Gentamicine. Bereits 1 - 2 Tage nach ihrer Aussaat konnte eine Verdopplung der Zellen festgestellt werden, so dass die MARC-145 Zellen mit PRRSV LV infiziert werden konnten. Der cytopathische Effekt (CPE) konnte nach 5 - 6 Tage post Infektion (dpi) unter dem Mikroskop erkannt werden. Die Bestimmung der infektiösen Viruspartikel in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels Plaque-Assay. Der Plaque-Assay ist ein sehr bekanntes Verfahren zur Bestimmung von infektiösen Viruspartikeln (Dimmock et al. 2007, Herzog et al. 2008, Matrosovich et al. 2006). Bei diesem Verfahren werden die im Zellmonolayer auftretenden als Plaques bezeichneten runden, zellfreien Flächen gezählt und anschließend der Virustiter in der Einheit plaque-forming units per ml (PFU/ml) ermittelt.

Für die im Folgenden beschriebenen Infektionsversuche wurde das zuvor vervielfältigte Virus mit Hilfe des Verfahrens der Ultrazentrifugation gereinigt. Dabei sollte neben der Aufreinigung des Virus auch eine Steigerung des Virustiters erzielt werden. Durchgeführt wurde die Ultrazentrifugation mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Delputte et al. (2002). Jeweils 35 ml der Zellkulturüberstände wurden auf ein 36 % iges Saccharosekissen gegeben, um dann anschließend bei 32.000 rpm für 3 h bei 4°C im SW28Ti Beckman Coulter Rotor der Beckman Coulter Optima™ L-80XP Ultrazentrifuge zentrifugiert zu werden. Das durch die Zentrifugation gewonnene Viruspellet wurde mit 350 µl sterilem und kaltem DPBS resuspendiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2 h bei 4°C wurde das Virusgemisch noch einmal vermengt und für die weitere Lagerung bei -80°C in Cryo-tubes überführt. Der Virustiter wurde nach der Ultrazentrifugation nochmals mittels Plaqu-Assay bestimmt.

2.3.1 Virusinfektion der respiratorischen Zellen

Drei verschiedene primäre respiratorische Zelllinien wurden mit dem europäischen Virusstamm LV infiziert. Die Aussaat der Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen und die anschließende Infektion erfolgten in 24 Wellplatten. Nach dem sich ein Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen mit 100 µl sterilem DPBS gewaschen und mit einer multiplicity of infection (MOI) von 0,01 infiziert. Ein Gesamtvolumen von 200 µl je Well wurde für die Virusinfektion verwendet, welches aus einem Gemisch von OptiPRO™ SFM und PRRSV bestand. Die Kontrollzellen wurden mit 200 µl je Well OptiPRO™ SFM ohne PRRSV beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden von allen Zellen die Flüssigkeiten abgenommen und die respiratorischen Zellen mit ihrem jeweiligen Zellkulturmedium (500 µl/Well) versorgt. Das experimentelle Design I der Infektion ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Infektion erfolgte individuell für jede Zelllinie von jedem Tier einer Rasse. Zu insgesamt sechs Zeitpunkten wurden alle Zellen und Zellkulturüberstände gesammelt. Im Einzelnen wurden die Proben zum Zeitpunkt 0 (0 h, Kontrollzellen ohne Infektion) und zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 12, 24 h post Infektion (hpi) entnommen.

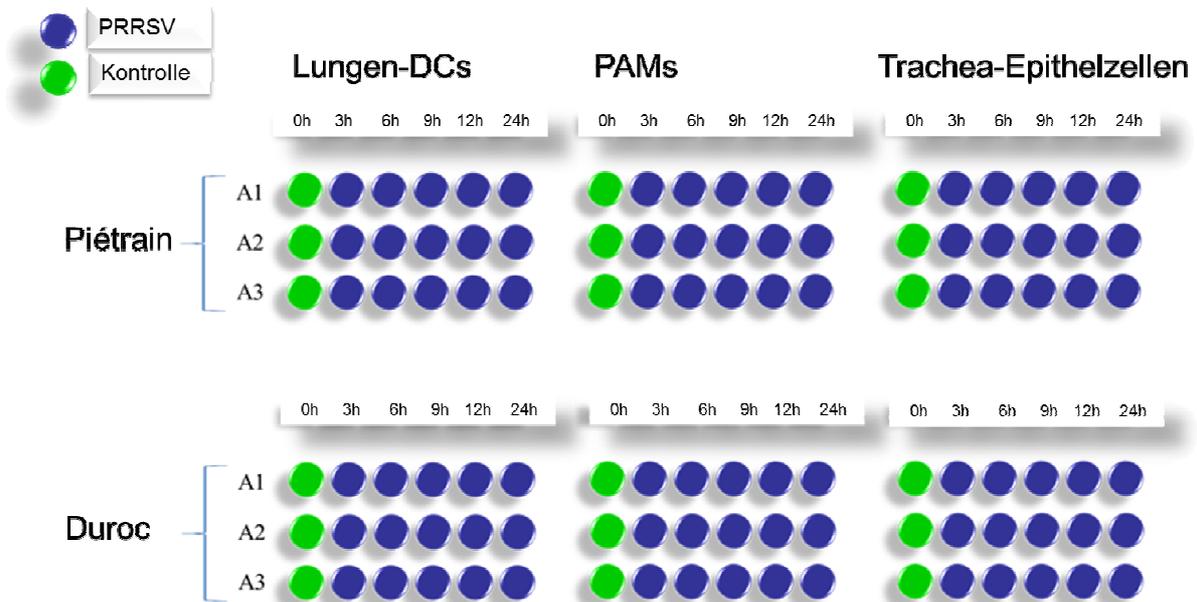


Abbildung 1: Experimentelles Design I für die Virusinfektion mit PRRSV

2.3.2 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte für unterschiedliche Versuchsvorhaben, zum einen wurde zelluläre RNA für die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) und zum anderen für die Validierung von Kandidatengenomen mittels quantitativer Real-Time PCR isoliert. Die genaue Darstellung von welchen Proben RNA extrahiert wurde, ist im experimentellen Design II in der Abbildung 2 illustriert.

Für die RNA-Seq wurden nur gepoolte RNA Proben von infizierten (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) Piétrain (Pool n=3) und Duroc (Pool n=3) Lungen-DCs sowie von nicht-infizierten (0 h) Piétrain (Pool n=3) und Duroc (Pool n=3) Lungen-DCs (Abb. 2) verwendet. Für die quantitative Real-Time PCR Analyse wurde RNA aus zwei unterschiedlichen Isolierungsprozessen eingesetzt: so wurde zum einen totale RNA von gepoolten Piétrain (Pool n=3) und gepoolten Duroc (Pool n=3) Proben (Lungen-DCs, PAMs, Trachea-Epithelzellen) und zum anderen RNA von nicht-gepoolten (Lungen-DCs, Trachea-Epithelzellen) Proben (Abb. 2) eingesetzt.

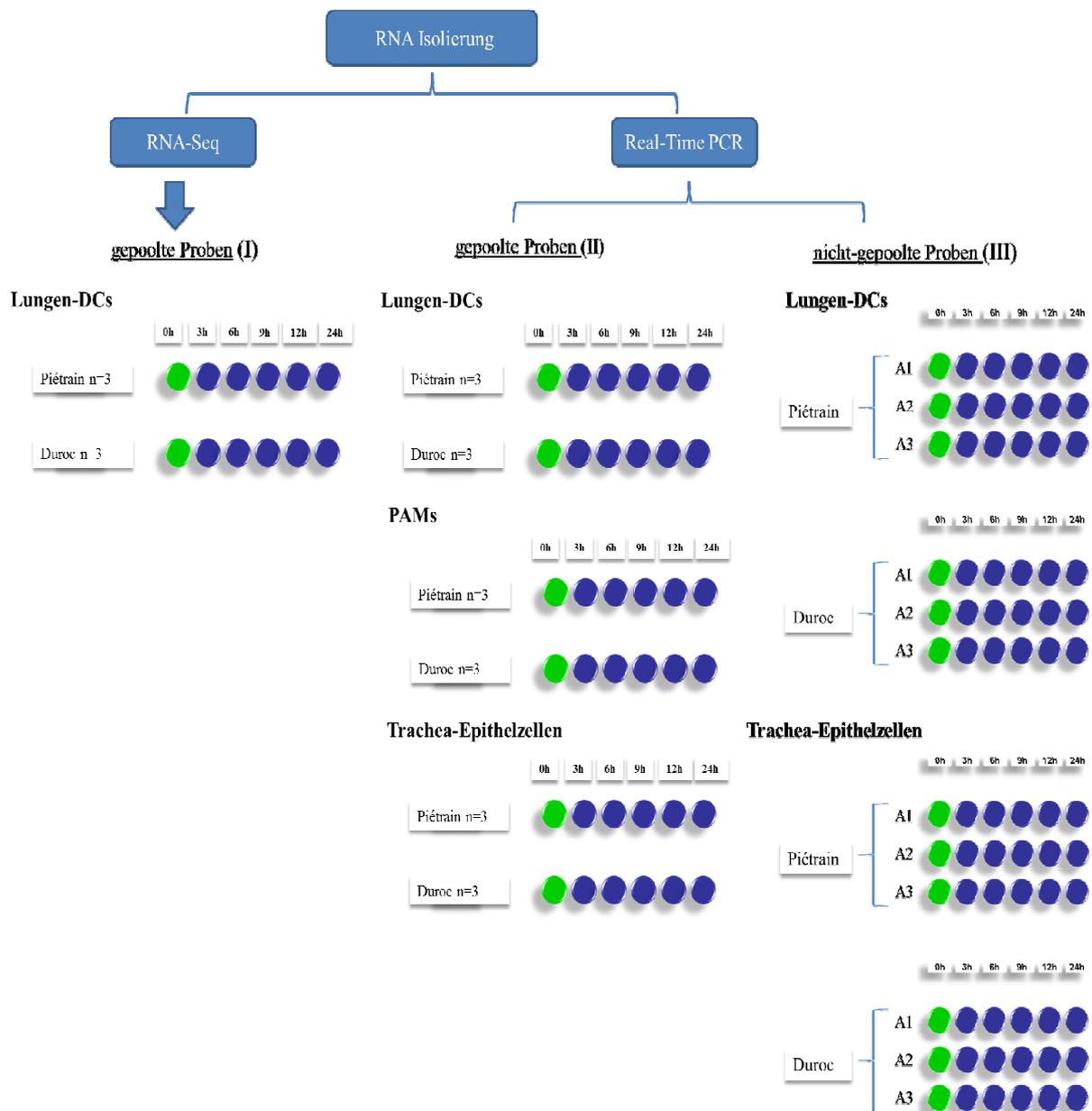


Abbildung 2: Experimentelles Design II für die RNA Isolierung, RNA Isolierung für RNA-Seq von gepoolten Piétrain und Duroc Lungen-DCs (I); RNA Isolierung für die quantitative Real-Time PCR von gepoolten Piétrain und Duroc Lungen-DCs, gepoolten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen und gepoolten Piétrain und Duroc PAMs (II) sowie von nicht-gepoolten Lungen-DCs und nicht-gepoolten Trachea-Epithelzellen (III) von Piétrain (A 1, 2, 3) und Duroc Tieren (A 1, 2, 3); nicht-infizierte Zellen (grüner Kreis) zum Zeitpunkt 0 h und infizierte Zellen (blauer Kreis) zum Zeitpunkt 3, 6, 9, 12, 24 hpi

Vorbereitungen der Zellen für die RNA Isolierung

An sechs Versuchszeitpunkten (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) wurde das Zellkulturmedium aus den Wells entfernt und die Zellen durch Trypsinisierung (50 µl Trypsin, Inkubation von 3 - 5 min bei 37°C in 5 % CO₂) gesammelt. In der Inkubationszeit lösten sich die Zellen vom Kulturboden ab, um diesen Prozess zu stoppen, wurde 100 - 150 µl Zellkulturmedium dazugegeben. Das Zellgemisch wurde aus den Wells entnommen und anschließend in ein Sammeltube überführt. Eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min führte zu einer Pelletierung der Zellen. Anschließend wurde die Suspension abgenommen und die pelletierten Zellen mit 200 µl Lysis Buffer (AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit, Qiagen) versetzt und bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden so lange eingefroren bis die RNA Isolierung von allen Proben durchgeführt werden konnte. Für die Isolierung wurde das AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen verwendet. Alle Isolierungsschritte erfolgten nach den Herstellerangaben, allerdings wurde der Mengeneinsatz der Chemikalien im Protokoll verändert. Die Veränderungen waren notwendig, um die RNA Isolierung mit dem geringeren Probeneinsatz von 300 µl durchzuführen. Nahezu alle Zentrifugationsschritte wurden bei 10.000 rpm durchgeführt, Änderungen der Geschwindigkeit werden im folgenden Text angegeben. Generell startete der RNA Isolierungsprozess mit dem Auftauen und dem Homogenisieren (1 min mittels vortexen) der lysierten Proben und dem anschließenden kurzen Runterzentrifugieren.

RNA Isolierung von gepoolten Lungen-DCs Proben für die RNA-Sequenzierung

Im Anschluss an die vorbereitenden Schritte wurden 100 µl jeder lysierten Lungen-DCs Probe eines Versuchszeitpunkts (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) einer Rasse (Piétrain n=3 und Duroc n=3) (Experimentelles Design II, Abb. 2) in einem AllPrep DNA spin column zusammengeführt und für 30 s zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das AllPrep DNA spin column in ein neues Tube überführt und für die spätere DNA Isolierung bei 4°C gelagert. Der Durchfluss des AllPrep DNA spin columns wurde für die weitere RNA Isolierung verwendet und mit 200 µl 96 % Ethanol von AnalaR NORMAPUR® ACS vermischt und auf ein RNeasy spin column aufgetragen. Ein Zentrifugationsschritt von 15 s schloss sich direkt an. Der Ausfluss wurde auch wieder gesammelt und in ein neues Sammeltube bei -80°C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt die Proteine zu isolieren. Das RNeasy spin column wurde in ein neues Tube eingesetzt und mit 450 µl RW1 Buffer versetzt und dann für 15 s zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die RNeasy spin Membran zweimal mit RPE Buffer gewaschen, als erstes mit 350 µl und im zweiten Schritt mit 250 µl. Nach diesen Waschschritten wurde das RNeasy spin column in ein neues Tube überführt und bei voller

Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde mittels 30 µl RNase-DNase-freiem Wasser die RNA aus dem RNeasy spin column eluiert und in einem 1,5 ml Tube nach einer 2 minütigen Zentrifugation aufgefangen. Die zelluläre RNA Qualität und Quantität wurde durch Messungen mit dem Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) sowie mit dem Agilent Bioanalyzer und dem verwendeten RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies Inc, CA, USA) ermittelt. Insgesamt wurden 5 µl der isolierten zellulären RNA an die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) für die RNA-Seq geschickt.

RNA Isolierung für die Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR von nicht-gepoolten Proben

Auch die zelluläre RNA von nicht-gepoolten Lungen-DCs und nicht-gepoolten Trachea-Epithelzellen (Experimentelles Design II, Abb. 2) wurde mittels dem AllPrep®DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen isoliert. Bei dieser Isolierung wurde den Protokollempfehlungen des Herstellers gefolgt, allerdings aufgrund des geringeren Probeneinsatzes von 100 µl der Einsatz der Chemikalien angepasst. Die folgenden Chemikalien wurden für diese Isolierung reduziert und wie folgt eingesetzt: 125 µl Ethanol AnalaR NORMAPUR® ACS, 300 µl RW1 Buffer, 200 µl und 150 µl RPE Buffer. Des Weiteren wurde die isolierte RNA mit dem Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen und anschließend die complementary DNA (cDNA) synthetisiert.

RNA Isolierung für die Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR von gepoolten Proben

Die Isolierung der zelluläre RNA von gepoolten infizierten (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) und gepoolten nicht-infizierten (0h) Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen (Experimentelles Design II, Abb. 2) erfolgte ebenfalls mit dem AllPrep®DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen (vgl. Isolierungsprotokoll der gepoolten Lungen-DCs für die RNA-Seq).

cDNA Synthese von gepoolten und nicht-gepoolten RNA Proben

Die cDNA Synthese erfolgte mittels SuperScript® II Reverse Transcriptase von Invitrogen™. Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 µl und beinhaltete: zelluläre RNA, ddH₂O, 0,5 µl Olig(dt)15 Primer, 0,5 µl Random Primer, 0,7 µl RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega) sowie 0,3 µl SuperScript® II Reverse Transcriptase, 1 µl dNTPs, 2 µl DTT 0,1 M und 4 µl 5x Reaction Buffer. Bevor die Enzyme in das Reaktionsgemisch überführt wurden, wurde das Gemisch auf 70°C für 5 min erwärmt und anschließend direkt für 1 min auf Eis platziert. Das

Programm für den Cycler bestand aus: 25°C für 5 min, 42°C für 90 min und 72°C für 15 min. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

RNA-Sequenzierung

Für die RNA-Seq wurde das TruSeq RNA Sample Preparation Kit von Illumina verwendet (Abb. 3). Insgesamt wurden 12 Lungen-DCs RNA Proben (Experimentelles Design II, Abb. 2) für die Sequenzierung eingesetzt. Die RNA-Seq erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG in Konstanz. Dort wurde die Technologie Illumina HiSeq 2000 sowie der 100 Basen single-read mode für diese Untersuchung benutzt. Die RNA-Seq Library beinhaltete zwei Pools und jeder Pool bestand aus sechs Proben. Vor Beginn der Analyse wurden die Proben mit 10 µl RNase-DNase-freiem Wasser versetzt, um ein Gesamtvolumen von 15 µl zu erhalten. Der anschließende Analyseablauf orientierte sich an dem Low-Throughput (LT) Protokoll des TruSeq™ RNA Sample Preparation Guides. Die Abbildung 3 skizziert den Vorbereitungsprozess der Firma GATC. Darin enthalten waren die folgenden Schritte: Aufreinigung der poly-A beinhaltenden mRNA Moleküle, die mRNA Fragmentation, die random primed first Strang cDNA Synthese, die second Strang cDNA Synthese, die Adapterligation und das Pooling der tagged Libraries in zwei Pools. Für die anschließende Sequenzierung wurde das Illumina Truseq PE Cluster Kit V3 und das Illumina TruSeq SBS V3 Kit verwendet. Das base calling, die Datenfilterung und die Sortierung wurde mittels der CASAVA Pipeline Version 1.8.0 durchgeführt. FastQ files wurden nach der Sequenzierung erstellt, diese beinhalteten die Sequenzen und die Qualitätsangaben.

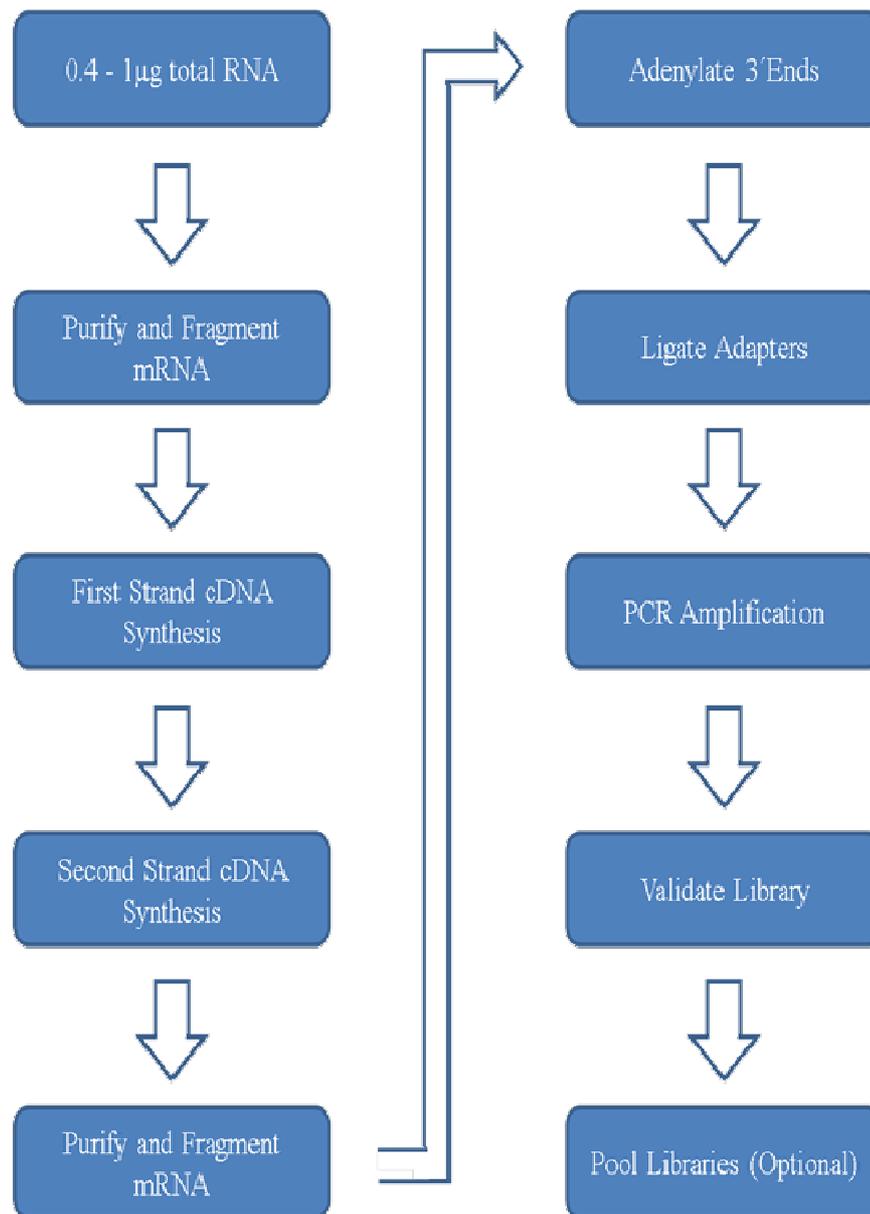


Abbildung 3: Workflow des LT TruSeq RNA Sample Preparation Protokolls

Validierung mit immunrelevanten Kandidatengenen

Die Validierung von ausgewählten Kandidatengenen erfolgte mittels der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) und dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). In Tabelle 2 sind alle in diesem Projekt validierten Kandidatengene aufgeführt. Das Expressionsprofil aller respiratorischen Zellen (Lungen-DCs, PAMs, Trachea-Epithelzellen) wurde zu allen sechs Versuchszeitpunkten (0 h, 3, 6, 9, 12, 24 hpi) ermittelt. Sowohl nicht-gepoolte als auch gepoolte Proben wurden für diese Analyse

verwendet (Experimentelles Design II, Abb. 2). Alle Primer wurden mittels der Primer3 Software (<http://primer3.ut.ee/>) designt und sind ebenfalls in der Tabelle 2 angegeben. Eine qRT-PCR Reaktion bestand aus: 2 µl cDNA (50 ng/µl), Forward (F) und Reverse (R) Primer sowie 10 µl des iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH) und RNase-DNase-freiem ddH₂O. Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 µl je Well. Das verwendete Real-Time PCR Programm setzte sich wie folgt zusammen: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min, 40 Zyklen bei 95°C für 15 s und 60°C für 1 min. Die Methode des komperativen threshold cycle (CT) wurde verwendet und die Normalisierung der Expressionsergebnisse erfolgte mittels der Referenzgene: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (HPRT1).

Tabelle 2: Kandidatengenauswahl für die Validierung mittels quantitativer Real-Time PCR

Acc Nr ¹	Gen-Name	P ²	Sequence (5'-3')
HQ013301	Glyceralde hyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	F ³ R ⁴	GCTGGTGCTGAGTATGTCGT CAAGCAGTTGGTGGTACAGG
NM_001032376	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (HPRT1)	F ³ R ⁴	AACCTTGCTTTCCTTGGTCA TCAAGGGCATAGCCTACCAC
NM_213779	Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4)	F ³ R ⁴	CTCTCCTCCAGCAAGACCAT CAGAGGCTGCTGGTCTCATA
NM_214087	CD80 molecule (CD80)	F ³ R ⁴	TCAGACACCCAGGTACACCA GACACATGGCTTCTGCTTGA
NM_214222	CD86 molecule (CD86)	F ³ R ⁴	TTTGGCAGGACCAGGATAAC GCCCTTGTCTTGATTTGAA
NM_001001861	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	F ³ R ⁴	ATCCAGGACCTGAAGGTGAC ATCAGTTGGCACTGCTCTTG
NM_001003923	Interferon, beta 1, fibroblast (IFNβ1)	F ³ R ⁴	ACCTGGAGACAATCCTGGAG AGGATTTCCACTTGGACGAC
NM_001252429	Interleukin-6 (IL-6)	F ³ R ⁴	GCTTCCAATCTGGGTTCAAT GGTGGCTTTGTCTGGATTCT
NM_214113	Janus kinase 2 (JAK2)	F ³ R ⁴	GACAGGAAATCCTCCCTTCA TCACCTCCACTGCAGATTTC
NM_001048232	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NF-κB1)	F ³ R ⁴	TGGGAAAGTCACAGAAACCA CCAGCAGCATCTTCACATCT
NM_214022	Tumor necrosis factor (TNF-α)	F ³ R ⁴	CCACCAACGTTTTCTCACT CCAAAATAGACCTGCCAGCA

NM_001097431	MHC class I antigen 1 (SLA-1)	F ³	AGAAGGAGGGGCAGGACTAT
		R ⁴	TCGTAGGCGTCCTGTCTGTA
NM_001113695	SLA-DRA MHC class II DR-alpha (SLA-DRA)	F ³	ACTGGAACAGCCAGAAGGAC
		R ⁴	AGAGCAGACCAGGAGGTTGT
NM_001044580	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (STAT3)	F ³	ATGCTGGAGGAGAGAATCGT
		R ⁴	AGGGAATTTGACCAGCAATC

Acc Nr¹ = Accession Nummer; P² = Primer, F³ = Forward, R⁴ = Reverse

Protein Isolierung und Western Blotting

Im Paragraph 2.3.2 (RNA Isolierung) wurde dargestellt, dass nach einem Zentrifugationsschritt der Ausfluss für die Proteinisolierung gesammelt und eingefroren wurde. Auch die Proteinisolierung erfolgte mittels dem AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit von Qiagen nach den Herstellerangaben. Die Chemikalien wurden auch hierbei aufgrund der geringeren Probenmenge reduziert, so dass 450 µl APP Buffer, 300 µl 70% Ethanol und 40 µl ALO Buffer für die Resuspension des Protein Pellets eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Proteine der gepoolten Lungen-DCs und der gepoolten Trachea-Epithelzell Proben beider Rassen (Experimentelles Design II, Abb. 2) für die Proteinanalysen mittels Western Blot eingesetzt. Dazu wurden die in der Tabelle 3 dargestellten Erst- und Zweit-Antikörper ausgewählt und verwendet.

Tabelle 3: Erst- und Zweit-Antikörper für die Proteindetektion mittels Western Blot

Erst-Antikörper	kDa	Katalognr.	Zweit-Antikörper
IL-6	22 - 28	AF686	Donkey anti goat (SC 2020)
TNF- α	17,5	LS-C43037	Goat anti rabbit (SC 2004)
NF- κ B p50	50	SC-114	Goat anti rabbit (SC 2004)
β -Actin	43	SC-47778	Goat anti mouse (SC 2005)

Die Zweit-Antikörper wurden immer mit der Konzentration 1:10.000 benutzt, mit der Ausnahme für TNF- α bei Piétrain Lungen-DCs dort wurde er mit einer Konzentration von 1:8000 eingesetzt. Der Referenz Erst-Antikörper β -Actin wurde mit einer Konzentration 1:2000 und die Erst-Antikörper IL-6, TNF- α und NF- κ B p50 mit einer Konzentration 1:500 eingesetzt. NF- κ B p50 wurde für die Lungen-DCs mit der Konzentration 1:400 verwendet.

2.4 Auswertung

Die statistische Analyse der RNA-Seq Daten und die Daten der anschließenden Real-Time PCR Analyse werden im folgenden Abschnitt im Einzelnen beschrieben.

2.4.1 Next generation sequencing Analyse

Datenverarbeitung

Für die erste Datenverarbeitung und Qualitätsbeurteilung wurde das Java gestützte Tool FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) verwendet (Wolf 2013). Dadurch konnten alle überrepräsentierten Adaptersequenzen identifiziert und mit Hilfe der Software cutadapt (<http://code.google.com/p/cutadapt/>) entfernt werden (Martin 2011). Dafür wurden eine Errorrate von 5 % und eine Überschneidungsrate von 80 % festgelegt. Mit dem Programm seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) wurden die ersten 15 bp des Datensatzes entfernt und ein weiterer Qualitätscheck mittels FastQC angeschlossen. Anschließend wurde die Software cutadapt für die Entfernung der Reads die kleiner als 50 bp waren und der Reads die einen Phred Score weniger als 20 (-q20) aufwiesen, benutzt. Final schloss sich eine weitere Qualitätskontrolle des Datensatzes mittels FastQC an.

Sequenz-Alignment und Expressionswerte

Im Anschluss an die finale Qualitätskontrolle wurden die gefilterten Reads zum Abgleich mit dem porcinen Referenzgenom eingesetzt. Zum einen wurde das porcine Referenzgenombild - Susscrofa 10.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/304498/>) und zum anderen das komplette Genom des LV Stamms (GenBank: M96262) verwendet. Für das Sequenz-Alignment wurden die Tools TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu>) und Bowtie 2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) verwendet (Langmead et al. 2009, Trapnell et al. 2009). Reads, die nicht durch das porcine Referenzgenom identifiziert werden konnten, wurden als unmapped Reads gekennzeichnet. Für die statistische Auswertung der Reads wurde im weiteren Verlauf das Tool SAMStat (<http://samstat.sourceforge.net/>) verwendet. Die Berechnung der Expressionswerte und die Darstellung der Readcountmatrix aller 12 Lungen-DCs Proben erfolgte unter Verwendung des coverageBed Tools, das zum Set der BEDTools (<http://bedtools.readthedocs.org/en/latest/>) gehört (Quinlan and Hall 2010). Zusätzlich wurden Geninformationen sowie Entrez Gene IDs durch die Verknüpfung mit den online zur Verfügung stehenden Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) in die Readcountmatrix eingefügt.

Wie zuvor erwähnt, wurde auch die virale Genomsequenz des LV Stamms für das Virusalignment verwendet. Dafür wurde das Vorkommen der viralen Sequenz in allen 12 Lungen-DCs Proben unter Verwendung des Mappers Bowtie 2 bestimmt. Für das Alignment wurde das komplette Genom des LV Stamms (GenBank: M96262) verwendet.

Normalisierung

Die Normalisierung der Daten ermöglicht einen akkuraten Vergleich der Expressionslevel zwischen und innerhalb der in diesem Versuch eingesetzten Proben. Für die Normalisierung wurde das DESeq Bioconductor Packet und die Statistik-Software R verwendet (Anders and Huber 2010).

Unterschiedlich exprimierte Gene

Nach der Normalisierung wurden die Transkripte aus dem Datensatz entfernt die über den gesamten Versuchszeitraum (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) beider Rassen (Duroc und Piétrain) Reads von 0 aufwiesen. Für die weiteren Analysen wurde nur der gefilterte Datensatz verwendet. Für die Identifizierung unterschiedlich exprimierte Gene wurde das DESeq Bioconductor Packet ("Working partially without replicates") ausgewählt und in R durchgeführt. Eine „pairwise comparison“ Analyse der Expressionsniveaus zwischen PRRSV infizierten (3, 6, 9, 12, 24 hpi) und PRRSV nicht-infizierten Zellen (0 h) schaffte die Voraussetzung für die Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Gentranskripten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeitpunkten wurden mit einem $p \leq 0,05$ und einer False discovery rate (FDR) von 10 % angegeben.

Cluster- und Netzwerkanalyse

Für die Clusterbildung der Gentranskripte und für die Netzwerkanalyse wurden die zuvor normalisierten Reads verwendet. Die D-NetWeaver Software, entwickelt in der University of Rochester Center for Biodefense Immune Modeling (<https://cbim.urmc.rochester.edu/software/d-netweaver/>), konnte für diese Analysen eingesetzt werden, da diese Software eine Daten-Visualisierungsfunktion bietet und Cluster von individuellen Genen bilden kann. Dabei werden die Gentranskripte in Gruppen zusammengefügt, die ein ähnliches Expressionsmuster während des gesamten Versuchszeitraums (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) aufwiesen. Zwei Schritte wurden bei dieser Vorgehensweise beachtet: Step I: nonparametric mixed-effects model with mixture distribution für das Clustering, Step II: nonparametric mixed-effects smoothing each module.

Zusätzlich beansprucht die Modullierung von Genexpression-Daten eines Zeitpunktversuchs einen mclust Algorithmus. 'mean curves' wurden für jedes Cluster durch smoothing spline ermittelt. Bayesian information criterion (BIC) gibt die finale Anzahl der Cluster an (Lu et al. 2011, Ma et al. 2006, Ma and Zhong 2008). Das Netzwerkmodell zeigt die Cluster jeder Rasse.

Funktionelle Analysen

Die Analyse der Signalwege sowie auch die funktionelle Annotierungsanalyse wurden mittels eines hyper geometrischen Testes in R durchgeführt. Eingesetzt wurden für diese Analyse die geclusterten Gentranskripte beider Rassen. Die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>) und ein Fisher's Test definierten überrepräsentierte Gen-sets. Mit einem $p \leq 0,05$ wird ein Gen-set als signifikant angesehen. In einer "Top 10 Liste" sind die Signalwege aufgelistet, die das statistische Ranking ($p \leq 0,05$) und Cluster mit einer Readnummer über 20 aufweisen. Das zweite Kriterium für die Auswahl der Signalwege für die "Top 10 Liste" ist die Frequenz des Vorkommens der Signalwege je Rasse.

2.4.2 Real-Time PCR Analysen

Die Normalisierung der Genexpressionsdaten der Lugen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen erfolgte mittels der beiden Referenzgene GAPDH und HPRT1. Für die weitere statistische Analyse wurde die "ANOVA pairwise comparison method" in R verwendet sowie zusätzlich die Tukey Honest Significant Difference (HSD) Methode. Diese „pairwise comparison“ Analyse wurde verwendet, um zu alle Zeitpunkten (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) die Ergebnisse einer Rasse als auch die Ergebnisse beider Rassen Duroc und Piétrain miteinander zu vergleichen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Zellcharakterisierung der Lungen-DCs und PAMs

Die Zellcharakterisierung der Lungen-DCs erfolgte mittels der Durchflusszytometrie, wobei die vier Oberflächenantikörper CD11c, CD80, CD86 und CD40 für die Bestimmung der Zellen eingesetzt wurden. Für die Charakterisierung der PAMs wurde der porcine Makrophagen spezifische Oberflächenantikörper CD163 eingesetzt. Die Expression der Oberflächenantikörper konnte wie folgt ermittelt werden: zu 83 % CD11c, zu 29 % CD86, zu 14 % CD80 und zu 64 % CD40 waren auf den Lungen-DCs exprimiert. CD163 konnte mit 27 % auf den PAMs identifiziert werden. Das Ergebnis der Lungen-DCs spiegelte den phenotypischen Charakter der immaturren DCs wider. Das schließt eine hohe Expression des CD11c und eine geringe Expression der Oberflächenmarker CD80/86 ein. Die phenotypischen Ergebnisse der Lungen-DCs dieses Forschungsprojektes stimmten mit den geringen CD80 und CD86 Expressionsergebnisse von Loving et al. (2007) überein.

3.2 Zellcharakterisierung der Trachea-Epithelzellen

Die Trachea-Epithelzellen wurden mit Hilfe spezifischer Epithelzellmarker sowie durch den IFA charakterisiert. Dabei wurde die Expression der Zelleigenschaften Cytokeratin (CK) und des tight junction Proteins, zonula occludens protein (ZO-1), ermittelt. Der Nukleus der Zellen wurde durch die DAPI Färbung sichtbar. In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse des IFA der Trachea-Epithelzellen abgebildet. Darin ist deutlich zu erkennen, dass die Trachea-Epithelzellen (A, B, C) für beide spezifischen Epithelzellmarker positiv waren.

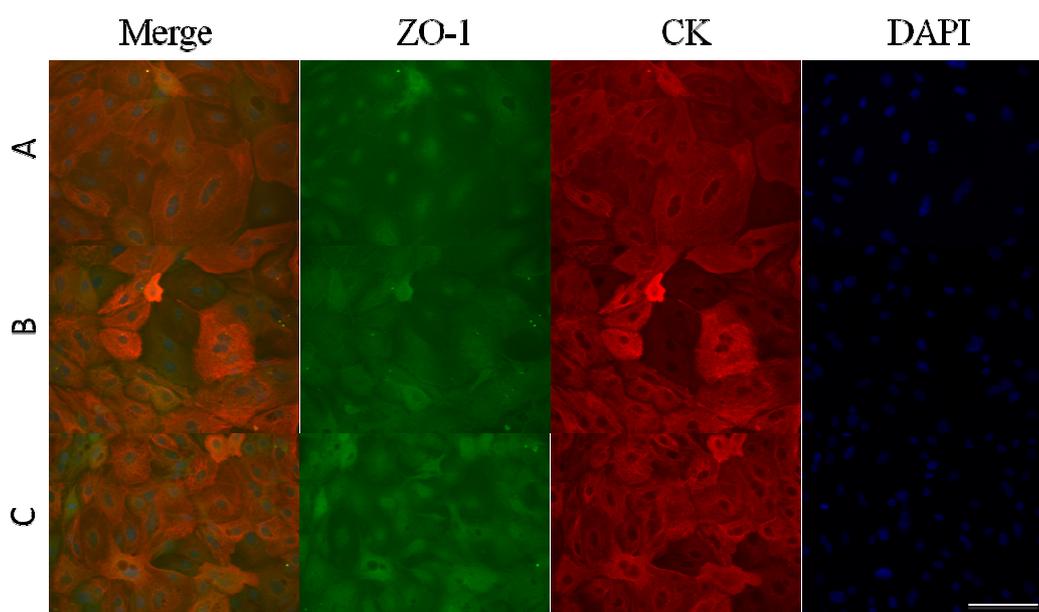


Abbildung 4: Immunfluoreszenz Assay (IFA) der Trachea-Epithelzellen mit den spezifischen Epithelzellmarkern zonula occludens protein (ZO-1) und Cytokeratin (CK). Merge stellt die Überlagerung der beiden Färbungen dar und DAPI die Färbung des Nukleus

3.3 Globale Transcriptomprofil Analyse der Piétrain und Duroc Lungen-DCs

Für die Untersuchung des globalen Transcriptomprofils der Lungen-DCs post PRRSV Infektion wurde eine RNA-Seq mittels dem Illumina HiSeq 2000 durchgeführt. RNA-Seq ist eine der neusten Technologien für die globale Transkriptomanalyse. Diese Technologie machte es möglich, große Mengen an Gentranskripten, die durch die PRRSV Infektion beeinflusst wurden, zu identifizieren. Die Transkriptomanalyse erfolgte mit PRRSV infizierten (3, 6, 9, 12, 24 hpi) und nicht infizierten (0 h) Lungen-DCs beider Rassen (Piétrain und Duroc). Als erstes Ergebnis nach der Sequenzierung konnten insgesamt 20,9 bis 30,2 Millionen Reads pro Library identifiziert werden. Allerdings erbrachte die Analyse der Probe 3 hpi der Rasse Piétrain nur 13 Million Reads. Das Tool FastQC wurde für die fundamentalen statistischen Analysen eingesetzt, dabei wurden u. a. Werte über die Sequenzqualität, den Qualitätsscore der Sequenz, den GC Gehalt sowie Daten über die Sequenzlängenverteilung und von überrepräsentierten Sequenzen erfasst. Auf der Basis dieser ersten Ergebnisse wurden die überrepräsentierten Sequenzen sowie die Adaptersequenzen und die ersten 15 bp von den gesamten Rohsequenzen entfernt. Nach dieser Filterung lagen die Reads zwischen 12,9 und 29,5 Millionen und wiesen eine hohe Qualität auf. Das Sequenz-Alignment mit dem *Sus scrofa* Referenz Genom 10.2 zeigte, dass sich 74,8 % bis 81,3 % der Reads an das Referenz Genom angelagert hatten und nur ein geringer Anteil von 18,7 % bis 25,2 % nicht.

Insgesamt wurden 20.396 porcine Genetranskripte charakterisiert. Alle identifizierten Reads wiesen Readcounts zwischen 0 und 762.300 auf.

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind frühere Studien aufgelistet in denen die Methoden der Microarray und Next generation sequencing (NGS) Technologie eingesetzt wurden. Die Studien bezogen sich überwiegend auf die Analyse der Transkriptomprofile von PAMs und von Lungengewebe. In dem aktuellen Forschungsprojekt wurden mittels der neusten Technologien - RNA-Seq - 20.396 porcine Genetranskripte aus PRRSV infizierten und nicht infizierten Lungen-DCs zweier unterschiedlicher Schweinerassen (Piétrain und Duroc) identifiziert. Für die weitere Transkriptomprofilanalyse wurden verschiedene bioinformatische Tools eingesetzt.

Tabelle 3: Microarray und Next generation sequencing Studien post PRRSV Infektion

Technologie	Zellen oder Gewebe	Rasse und Tieranzahl	Referenzen
Microarray	PAMs	Rattlerow-Seghers genetic line (n=6)	Genini et al. (2008)
Microarray	PAMs	Tongcheng boars (n=3 nicht infiziert and n=3 infiziert)	Zhou et al. (2011)
Microarray	PAMs	Landrace (n=3), Pietrain (n=3)	Ait-Ali et al. (2011)
NGS	Lungengewebe	Landrace×Yorkshire (n=9)	Xiao et al. (2010b)
NGS	PAMs	Piglets (n=3) from JSR Genepacker 90 English: Landrace×Large White and Pietrain boars	Badaoui et al. (2014)

3.4 PRRSV Wachstum auf Lungen-DCs

Die Analyse des Virus-Sequence-Alignments wurde durchgeführt, um das Viruswachstum in allen 12 Lungen-DCs zu bestimmen. Dafür wurde ein Alignment mit der Virussequenz des LV Stammes und den identifizierten Reads durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der nachstehenden Abbildung 5 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h konnten keine Virussequenzanteile ermittelt werden. Dabei war ein deutlicher Anstieg der Virussequenz nach der PRRSV Infektion (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) zu erkennen. Am Zeitpunkt 3 hpi stiegen die Readcounts der Virussequenz für Lungen-DCs der Rasse Piétrain auf 9.433 an. Für die Duroc Lungen-DCs zeigte sich ein Anstieg des Viruswachstums auf 4.924 Readcounts. Ein kontinuierlicher Anstieg des Viruswachstums konnte für die Lungen-DCs der Rasse Piétrain

beobachtet werden, die Reads stiegen zum Zeitpunkt 6 hpi auf 13.941, zum Zeitpunkt 9 hpi auf 25.948 und zum Zeitpunkt 12 hpi auf 177.590 an. Ein plötzlicher Abfall der Virus Readcounts konnte am Zeitpunkt 24 hpi auf 36.435 Reads beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte das Viruswachstum für Duroc Lungen-DCs zwischen den Zeitpunkten 3, 6, 9 hpi keine große Veränderungen auf. Zum Zeitpunkt 12 hpi kam es zum Anstieg der Virus Readcounts auf 49.617. Anschließend explodierte das Viruswachstum zum Zeitpunkt 24 hpi der Duroc Lungen-DCs und erreichte 1.119.046 Readcounts. Zum Zeitpunkt 3 hpi lag die Viruswachstumsdifferenz zwischen Piétrain und Duroc Lungen-DCs bei ca. 50 %. Zu den weiteren Zeitpunkten 6 und 9 hpi betrug die Differenz des Viruswachstums über 50 %. Zum Zeitpunkt 24 hpi war ein extremer Anstieg des Viruswachstums in Duroc Lungen-DCs zu beobachten und im Vergleich dazu ein erheblicher Abfall des Viruswachstums in Piétrain Lungen-DCs.

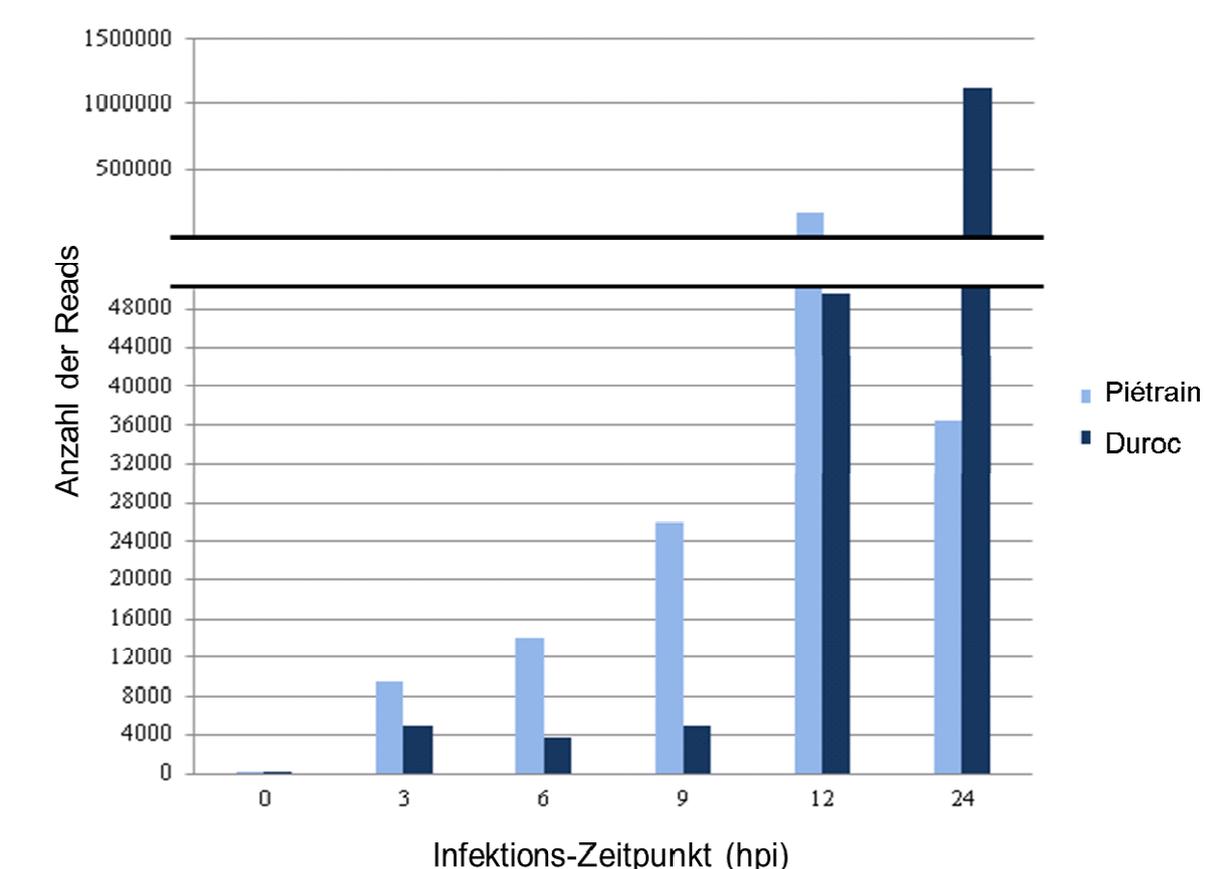


Abbildung 5: Virus-Sequenz-Alignment von Piétrain und Duroc Lungen-DCs vor und nach der PRRSV Infektion

Loving et al. (2007) zeigten in ihrer Studie, dass PRRSV sich nicht in Lungen-DCs replizierte, aber dass das Virus fähig war, diese Zellen zu benutzen. In dem hier vorliegenden Forschungsprojekt konnte durch das Virus-Alignment nach dem NGS ein replizierendes LV in Piétrain und Duroc Lungen-DCs nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass LV Lungen-DCs infizieren und sich in diesen replizieren kann. Damit stehen diese neuen Erkenntnisse im Kontrast zu den Ergebnisse von Loving et al. (2007). Ein möglicher Grund für diese konträren Ergebnisse könnte der Einsatz von unterschiedlichen Virus Stämmen sein. Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen zeigten die Ergebnisse des Virus-Sequenz-Alignments Rassenunterschiede im Viruswachstum. Wie zuvor dargestellt, zeigte PRRSV einen extremen Anstieg in Piétrain Lungen-DCs bis 12 hpi und dann einen Abfall. Wobei im Gegensatz dazu ein explosionsartiger signifikanter Virusanstieg für Duroc Lungen-DCs zu den Zeitpunkten 12 hpi zu 24 hpi erkennbar war. Zwei Zeitpunkte können als Wendepunkte für das Viruswachstum festgehalten werden, zum einen 12 hpi für Piétrain Lungen-DCs und zum anderen 9 hpi für Duroc Lungen-DCs. Es kann angenommen werden, dass zu diesen zwei Zeitpunkten wichtige molekulare Veränderungen eintraten und damit den extremen Unterschied im Viruswachstum zwischen Piétrain und Duroc Lungen-DCs verursachten. Basierend auf diesen Ergebnissen, kann angenommen werden, dass in einer frühen Phase der Virusinfektion Duroc Lungen-DCs effektiver auf PRRSV reagieren als Piétrain Lungen-DCs.

3.5 Cluster- und Netzwerk-Analyse nach der RNA-Sequenzierung

Cluster- und Netzwerk-Analysen sind hilfreiche Tools, um großen Datensätzen, wie z.B. nach einer RNA-Seq, eine Struktur zu verleihen und um Übereinstimmungen oder Unterschiede in den Datensätzen zu identifizieren (Ma and Zhong 2008).

In dem aktuellen Forschungsprojekt wurden 20.396 Gentranskripte anhand ihrer temporären Expressionsmuster post PRRSV Infektion (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) in verschiedene Cluster sortiert. Mit Hilfe der D-NetWeaver Software konnten 37 individuelle Cluster für Piétrain Lungen-DCs und 35 individuelle Cluster für Duroc Lungen-DCs identifiziert werden. Es ist bemerkenswert, dass aus einer identischen Datenmenge eine unterschiedliche Anzahl von Clustern (37 und 35) ermittelt werden konnte. Das Ergebnis zeigte, dass es zu 37 unterschiedlichen Reaktionen im Expressionsprofil post PRRSV Infektion für Piétrain Lungen-DCs und zu 35 verschiedenen Reaktionen im Expressionsprofil post PRRSV für Duroc Lungen-DCs kam. Im Weiteren wurden diese Cluster für die funktionelle Analysen verwendet. Dadurch sollten die viralen Einflüsse auf die Wirt-Genexpression und die funktionellen Hintergründe post PRRSV Infektion untersucht und verstanden werden.

3.6 Signalweg-Analyse der Piétrain und Duroc Lungen-DCs Cluster

Die Signalweg-Analyse wurde mit allen identifizierten Clustern (37 für Piétrain Lungen-DCs und 35 für Duroc Lungen-DCs) durchgeführt. Insgesamt konnten für beide Rassen 171 Signalwege ($p \leq 0,05$) identifiziert werden. Zusätzlich wurden 47 Signalwege ($p \leq 0,05$) nur für die Rasse Duroc ermittelt. Eine „Top 10 Liste“ von den 10 am häufigsten vorkommenden Signalwegen konnte erstellt werden. In dieser Liste (Tabelle 4) befinden sich nur Cluster deren Readcounts größer als 20 waren.

Tabelle 4: „Top 10 Liste“ der Signalwege für Piétrain und Duroc Lungen-DCs

Signalweg	Piétrain Cluster	Duroc Cluster
Phagosom	12, 22, 33, 34, 35, 36, 37	25, 30, 31, 32, 33, 34
Spliceosom	28, 29, 31, 32, 34	22, 23, 29, 32
Proteinentwicklung am endoplasmatische Retikulum	28, 31, 33, 34, 35	28, 29, 31, 32
fokale Adhäsion	29, 31, 35, 36, 37	26, 33, 34, 35
Endozytose	28, 32, 34	3, 22, 25, 30, 32
rheumatoide Arthritis	15, 29, 35, 36	25, 30, 32, 34
homologe Rekombination	14, 17, 18, 24	1, 6, 18, 19
Zellzyklus	16, 18, 21, 25	1, 6, 18, 19
oxidativen Phosphorylierung	27, 30, 33, 34	27, 28, 31, 32
JAK-STAT	9, 10, 15, 32	7, 20

Die Cluster 28, 29, 31, 32, 33, 35, 36 der Piétrain Lungen-DCs traten mit einer sehr hohen Frequenz in der „Top 10 Liste“ auf, am häufigsten das Cluster 34. Auch für Duroc Lungen-DCs konnten die Cluster 30, 31, 34 mit einem erhöhten Vorkommen festgestellt werden, wobei das Cluster 32 am häufigsten vertreten war. Cluster 34 für Piétrain Lungen-DCs und Cluster 32 für Duroc Lungen-DCs zeigten eine Übereinstimmung in 5 Signalwegen: Phagosom, Spliceosom, Proteinentwicklung am endoplasmatischen Retikulum, Endozytose Signalweg und der der oxidativen Phosphorylierung. Im Rahmen des aktuellen Forschungsprojekts ist die erste Studie (Pröll 2014) entstanden, die die Signalwege post PRRSV Infektion für Lungen-DCs identifizierte und so den funktionellen Hintergrund charakterisierte. Die biologischen Hauptfunktionen der Piétrain und Duroc PRRSV infizierten Lungen-DCs sind in der „Top 10 Liste“ (Tabelle 4) dargestellt.

Aus einer früheren Studie ist bekannt, dass das Virus zum Eindringen in die Wirtszelle den Signalweg der Endozytose benutzt (Nauwynck et al. 1999). De Baere et al. (2012) beschrieben die Wichtigkeit des Phagozytose Signalwegs für die Virus-Wirt-Interaktion und den Viruseintritt. Chen et al. (2010) wiesen darauf hin, dass das virale NSP1 β die Phosphorylierung und die Aktivität des STAT1 und somit den JAK-STAT Signalweg hemmt. Durch ihre Ergebnisse stellen sie die Wichtigkeit des JAK-STAT Signalwegs für die Virus-Wirt-Interaktion dar.

In dem vorliegenden Projekt konnten einzelne Signalwege aufgrund ihrer Funktionalität für DCs und ihre Rolle in der Virus-Wirt-Interaktion hervorgehoben und als Schlüssel-Signalwege gekennzeichnet werden. Die Schlüssel-Signalwege im Einzelnen sind: Phagosom, Endozytose, rheumatoide Arthritis und der JAK-STAT Signalweg. Zusätzlich konnten das Cluster 34 der Piétrain Lungen-DCs und das Cluster 32 der Duroc Lungen-DCs als Schlüssel-Cluster bestimmt werden.

3.7 Virus-Wirt-Interaktion

Die Virus-Wirt-Interaktion konnte mittels der globalen Transkriptomanalyse post PRRSV Infektion in porcinen Lungen-DCs identifiziert und beschrieben werden. Durch die „pairwise comparison“-Analyse zwischen nicht-infizierten Zellen (0 h) und PRRSV infizierten Zellen (3, 6, 9, 12, 24 hpi) je Rasse wurden unterschiedlich exprimierte Gentranskripte ermittelt. Insgesamt zeigten 4.472 Gentranskripte Unterschiede in ihrem Genexpressionsprofil ($p \leq 0,05$) post PRRSV Infektion. Davon waren 170 Gentranskripte in Piétrain PRRSV infizierten Lungen-DCs unterschiedlich exprimiert ($p \leq 0,05$, FDR 10 %). Von den 170 zeigten 133 Gentranskripte einen runter regulierten (Abbildung 6) und 37 Gene einen hoch regulierten (Abbildung 7) Expressionstrend. Insgesamt konnten für Duroc Lungen-DCs post PRRSV Infektion 228 unterschiedlich exprimierte Gentranskripte ($p \leq 0,05$, FDR 10 %) ermittelt werden. Davon waren 41 Gentranskripte runter (Abbildung 6) und 187 hoch reguliert (Abbildung 7).

Zu einem frühen Infektionsszeitpunkt (3 hpi) wurde nur eine geringe Anzahl an runter regulierte Gentranskripten für Piétrain Lungen-DCs identifiziert. Anschließend stieg die Zahl kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 24 hpi an. Auffallend dazu verlief der Genexpressionstrend der runter regulierten Gentranskripte für Duroc Lungen-DCs konträr (Abbildung 6).

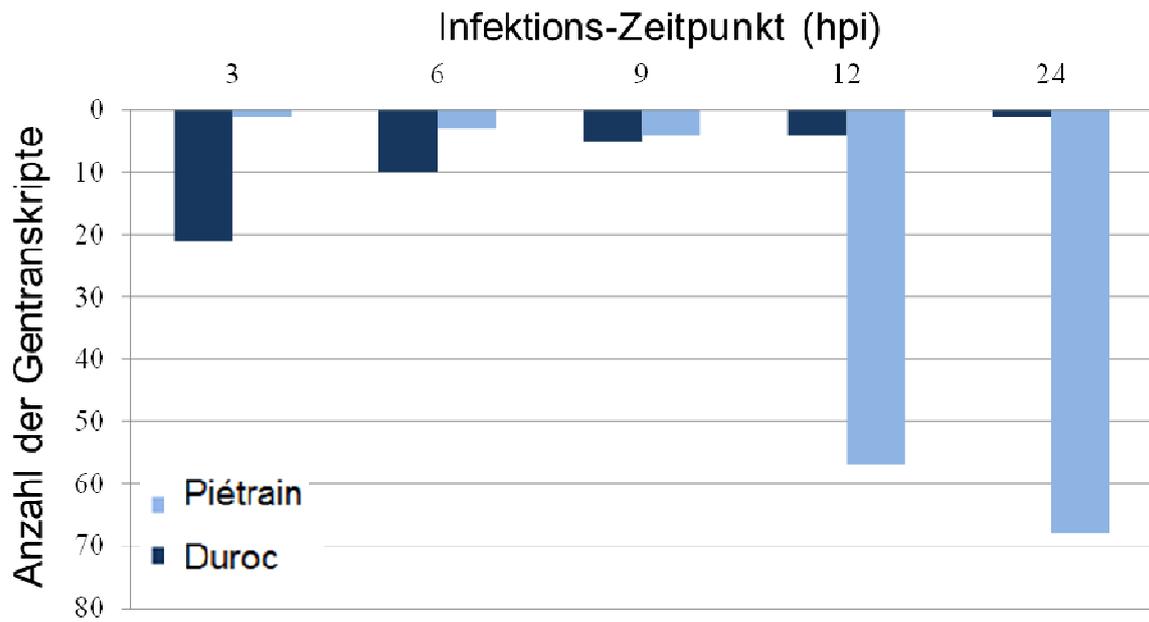


Abbildung 6: Anzahl der runter regulierten Gentranskripte in PRRSV infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs

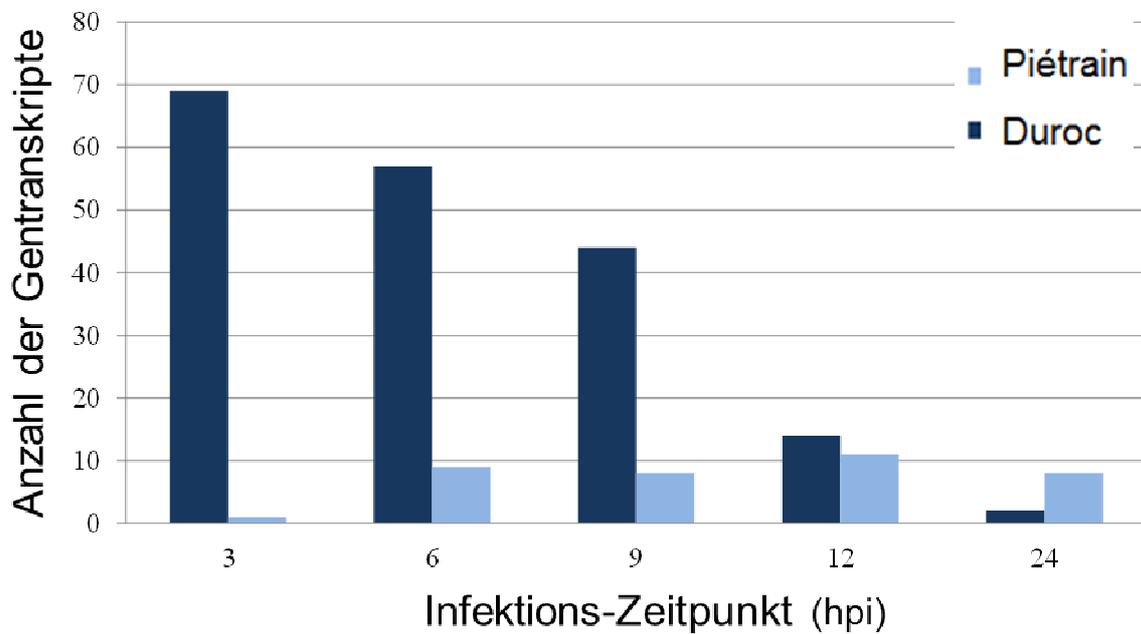


Abbildung 7: Anzahl der hoch regulierten Gentranskripte in PRRSV infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs

Zu einem frühen Infektionszeitpunkt (3 hpi) wurde eine große Anzahl von hoch regulierten Gentranskripten für Duroc PRRSV infizierte Lungen-DCs identifiziert, gefolgt von einer kontinuierlichen Abnahme der hoch regulierten Gentranskripte bis zum Zeitpunkt 24 hpi. Die Rasse Piétrain zeigte nur geringe Veränderungen in ihrer Anzahl der hoch regulierten Gentranskripte. Im Vergleich der runter und hoch regulierten Expressionstrends beider Rassen, konnte deutlich eine konträre Reaktion beider Rassen auf eine PRRSV Infektion ermittelt werden.

Ebenfalls war ein starker Anstieg von runter regulierten immunrelevanten Gentranskripten für PRRSV infizierte Piétrain Lungen-DCs (CXCL2, IL-6, IL-1 β , TNF, CCL4, IL-1 α , SLA-DRA, CCL3L1, CCL23, CCL20) zum Zeitpunkt 9 hpi zu 24 hpi (Abbildung 6) zu erkennen. Rassenunterschiede in der Reaktion auf PRRSV machten sich auch hier bemerkbar, so waren die immunrelevanten Gentranskripte (CCL4, CXCL2, IL-1 β , CXCL10 und CCL8) in Duroc Lungen-DCs zum Zeitpunkt 3 hpi zu 24 hpi hoch reguliert (Abbildung 7).

Die Ergebnisse und Erkenntnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Ergebnisse vorangegangenen Arbeiten von Genini et al. (2008) und Ait-Ali et al. (2011), in denen sie angaben, dass sie ebenfalls innerhalb einer frühen Infektionsperiode (24 h) bemerkenswerte Reaktionen auf PRRSV beobachten konnten. Beide beschrieben den Zeitraum zwischen 8 - 10 hpi als einen kritischen Zeitraum der Virusinfektion und der Virus-Wirt-Ausweichtaktik.

Aufgrund der aktuellen Studie lässt sich festhalten, dass in Bezug auf die konträren Expressionstrends der Piétrain Lungen-DCs und der Duroc Lungen-DCs post PRRSV deutliche Rassenunterschiede in der Immunreaktion auf PRRSV vorliegen. Daraus ist zu schließen, dass aufgrund der hoch regulierten immunrelevanten Gentranskripte in Duroc Lungen-DCs, die Duroc Lungen-DCs in einer frühen Infektionsphase (24 hpi) besser und effektiver auf PRRSV reagieren als Piétrain Lungen-DCs.

3.8 Immunreaktion verschiedener Immunzellen auf eine PRRSV Infektion

Für die Validierung wurden die Genexpressionsprofile von 12 immunrelevanten Kandidatengen (Tabelle 2) in verschiedenen Immunzellen mittels der Real-Time PCR bestimmt. Ausgewählt wurden Kandidatengene zum einen aus den identifizierten unterschiedlich regulierten Gentranskripten (3.7) und zum anderen aus dem aus der Literatur bekannten Virusinfektionsweg (Abbildung 8).

Der Immunreaktionsweg startet mit der Identifikation des Virus durch spezifische Oberflächenrezeptoren (SIGLEC-1/CD169 und HSPG2) (Abbildung 8). Diese Rezeptoren sind grundlegend für den „Virusintritt“ in die Zelle (Delputte et al. 2002, Duan et al. 1998, Nauwynck et al. 1999). Das Virus repliziert dann im Zellinneren und wird dort durch die

Pattern-recognition receptors (PRRs), TLR3 (Liu et al. 2009) und/oder durch TLR7/8 (Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004) erkannt. Nach der Viruserkennung startet eine Signalkaskade im Zellinneren und somit die Aktivierung der Immunreaktion post PRRSV Infektion. Folgende Gene spielen in dieser Signalkaskade eine entscheidende Rolle: MyD88, IRF3, IRF7, IRAK4, DDX58/RIG-I, MAVS/IPS-1 und RELA/NF- κ B (Abbildung 8) (Zhou et al. 2011). Diese Gene sind verantwortlich für die Aktivierung wichtiger Immunmediatoren und –gene, die der Genfamilie der Type I IFN (z.B. IFN α , IFN β) oder zu den Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) gehören. Sowohl Zytokine als auch Chemokine (z.B. IL-12, IL-6) können u. a. den JAK-STAT Signalweg anregen, der wiederum zu einer Aktivierung der IFN-stimulierenden Gene (ISGs) führt (Alberts et al. 2008, Kindt et al. 2007, Zhou et al. 2011).

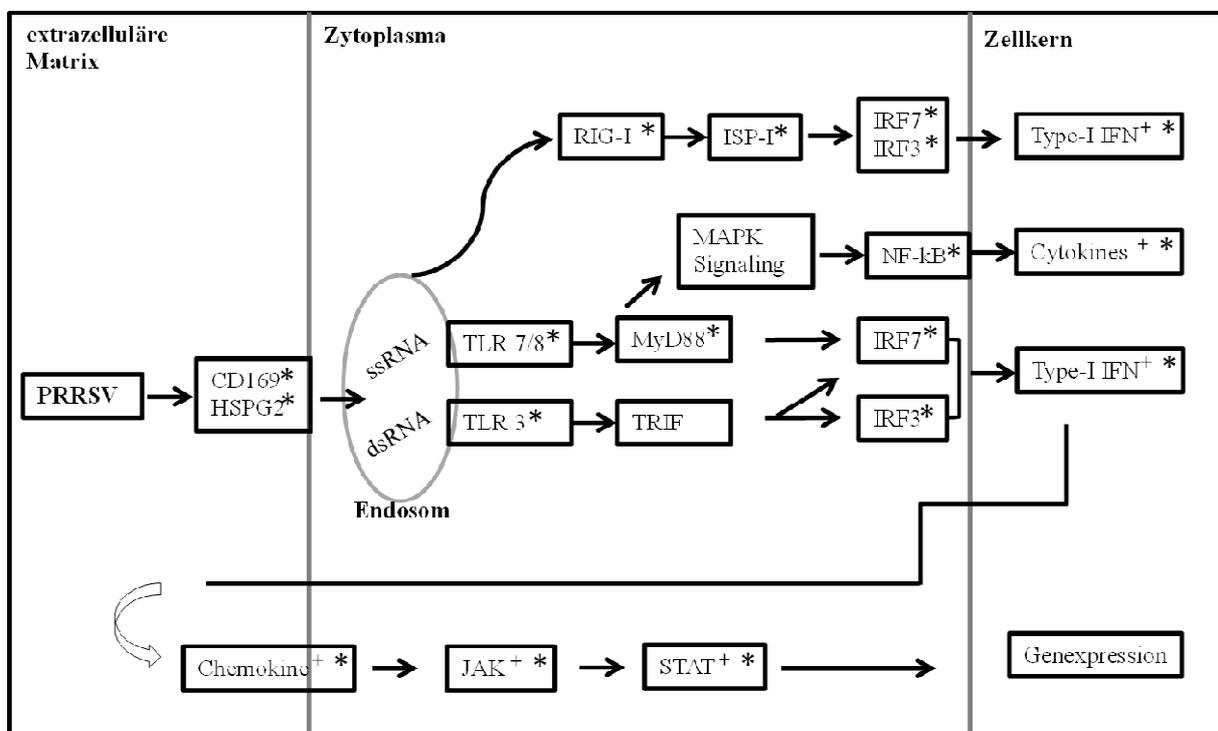


Abbildung 8: Virus-Wirt-Interaktion (modifizierte Abbildung, Zhou et al. (2011)) * Gene und Genfamilien, die mit der RNA-Seq identifiziert wurden, + Gene, die mittels Real-Time PCR validiert wurden

Expressionsprofile der validierten Kandidatengene in Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen werden dargestellt, vereinzelte Expressionsprofile werden auch im Folgenden graphisch abgebildet.

Die Expressionsprofile wurden sowohl in nicht-gepoolten Lungen-DCs und Trachea-Epithelzellen als auch in gepoolten PAMs, Lungen-DCs und Trachea-Epithelzellen

(Experimentelles Design II, Abbildung 2) für alle Infektionszeitpunkte ermittelt. Für einen besseren Vergleich zwischen den RNA-Seq Ergebnissen der Lungen-DCs und den Real-Time PCR Ergebnissen werden in einigen der nachfolgenden Graphiken die Expressionsprofile in den Lungen-DCs nach der RNA-Seq zusätzlich dargestellt. Die Probe 24 hpi der gepoolten Duroc Lungen-DCs und die Probe 24 hpi der gepoolten Piétrain PAMs (Abbildung 10, Gen NF- κ B1) konnten in der Real-Time PCR Analyse nicht detektiert werden.

IL-6 stimuliert B und T Zellen und aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT3. Das Gen IL-6 übernimmt dabei eine zentrale Rolle in der Immunreaktion (Abbas et al. 2012, Kindt et al. 2007, Tizard 2013).

Das Expressionsprofil des inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) zeigte nach der RNA-Seq Analyse einen reduzierten Expressionstrend zu den Zeitpunkten 3, 6, und 9 hpi ($p \leq 0,05$), 12 hpi ($p \leq 0,05$, FDR 10 %) und 24 hpi ($p \leq 0,05$) in Piétrain Lungen-DCs sowie nach 12 hpi ($p \leq 0,05$) in Duroc Lungen-DCs (Abbildung 9A). Dieser Expressionstrend in den Lungen-DCs wurde durch die Validierung mittels Real-Time PCR (Abbildung 9B) bestätigt. Das IL-6 Expressionsprofil in PAMs war konträr zu dem der Lungen-DCs und dem der Trachea-Epithelzellen, es zeigte einen hoch orientierten Expressionstrend. Zusätzlich konnte für die Expressionsprofile der Lungen-DCs ($p \leq 0,1$) und der Trachea-Epithelzellen ($p < 0,001$) globale Rassenunterschiede mittels Real-Time PCR identifiziert werden (Abbildung 9B und 9D).

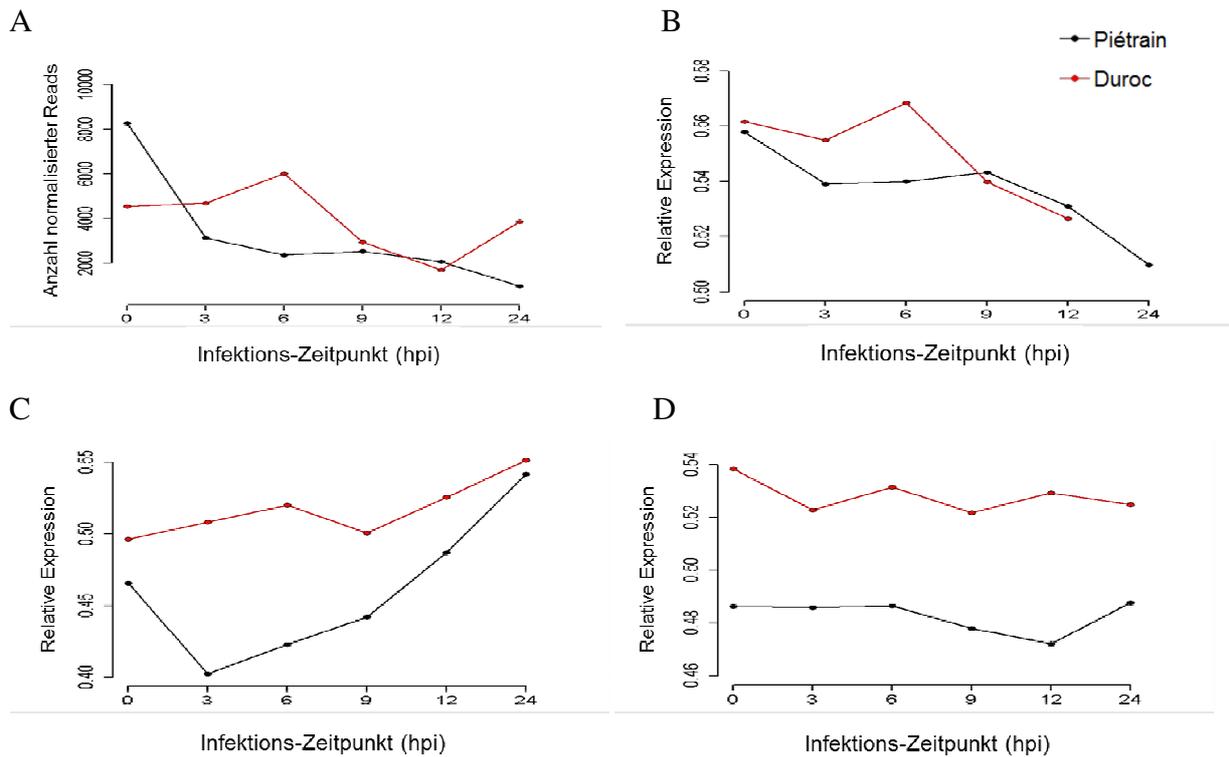


Abbildung 9: IL-6 Expressionprofile in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels RNA-Seq (A) und Real-Time PCR (B), IL-6 Expressionprofile PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (C) und IL-6 Expressionprofile PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (D) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi

Zusätzlich zu der IL-6 Expressionsanalyse wurde das IL-6 Proteinprofil mittels Western Blot ermittelt. Das inflammatorische Zytokin IL-6 konnte nur in Lungen-DCs Proteinen bestimmt werden. In Piétrain Lungen-DCs konnten Unterschiede in der Proteinexpression (6 hpi und 12 hpi) identifiziert werden.



Abbildung 10: IL-6 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot

NF- κ B1 ist ein Transkriptionsfaktor, er hat eine entscheidende Funktion in der angeborenen Immunantwort und der Immunreaktion bei Entzündungen (Alberts et al. 2008).

Das NF- κ B1 Expressionsprofil zeigte globale Rassenunterschiede in Lungen-DCs ($p \leq 0,05$) und Trachea-Epithelzellen ($p < 0,001$) (Abbildung 11A und 11B). Ebenfalls konnte in Duroc Trachea-Epithelzellen zwischen den Zeitpunkten 0 h und 3 hpi ($p \leq 0,05$) sowie zwischen den Zeitpunkten 0 h und 24 hpi ($p \leq 0,1$) Unterschiede im Expressionstrend identifiziert werden. Wie bei dem Gen IL-6 zeigten sich auch bei NF- κ B1 deutlich die zellspezifischen Reaktionen nach der PRRSV Infektion.



Abbildung 11: NF- κ B1 Expressionprofil in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels Real-Time PCR (A), NF- κ B1 Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (B) und NF- κ B1 Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (C) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi

Zusätzlich zu der NF- κ B Expressionsanalyse wurde das Protein NF- κ B p50 mittels Western Blot in den Lungen-DCs und Trachea-Epithelzellen bestimmt.



Abbildung 12: NF- κ B p50 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot

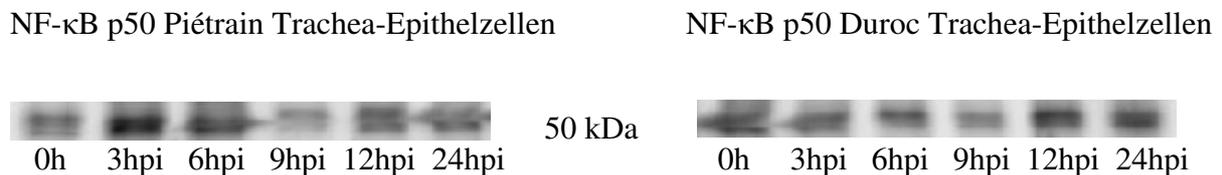


Abbildung 13: NF- κ B p50 Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot

Der JAK-STAT Signalweg spielt eine grundlegende Rolle in der Immunreaktion und arbeitet mit vier bekannten Janus kinasen (JAK1-3, TYK2) und sieben Transkriptionsfaktoren - signal transducers and activators of transcription (STAT1-4, 5a, 5b und 6) (Abbas et al. 2012, Alberts et al. 2008, Kindt et al. 2007). Die JAK induziert STAT Phosphorylierung kann durch die an die Zellrezeptoren gebundenen IFNs hervorgerufen werden. Im Anschluss daran wandern STATs zum Nukleus und aktivieren die Transkription von verschiedenen Genen. Der JAK-STAT Signalweg kann u. a. durch IFN- γ , IFN- α , IL-3 und Hormone ausgelöst werden (Alberts et al. 2008, reviewed by Shuai and Liu 2003).

CCL4 ist ein bedeutendes Chemoattractant und spielt eine wichtige Rolle bei Virus-induzierten Krankheiten (Chen et al. 2014, Murphy et al. 2008, Zhao et al. 2007). Chemokine bestehen aus einer Familie von mindestens 50 Chemoattractants. Ihre Aufgabe ist die Zell-Migration zu koordinieren und Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten zu rekrutieren (Kindt et al. 2007, Tizard 2013).

In der aktuellen Studie zeigten nicht nur die Expressionsprofile von IL-6 und NF- κ B1 Zell- und Rassenunterschiede in der Reaktion auf PRRSV, sondern auch die hier nicht graphisch dargestellten JAK2 und CCL4 Gene. Dabei konnte bei IL-6 und NF- κ B1 auch für JAK2 und

CCL4 jeweils eine hoch-orientierte Expression von PAMs post PRRSV Infektion, im Vergleich zu einem runter orientierten Expressionstrend von Lungen-DCs identifiziert werden. Darüber hinaus konnte auch in den Expressionsprofilen von IL-6 und JAK2 in Trachea-Epithelzellen im Vergleich zu den Expressionsprofilen in PAMs Unterschiede festgestellt werden. IL-6 war in Trachea-Epithelzellen gleichförmig exprimiert und in JAK2 runter reguliert.

TNF- α ist ein akuter Entzündungs-Mediator und bewirkt ähnliche biologische Funktionen wie Interleukin-1 (Abbas et al. 2012, Murphy et al. 2008). Des Weiteren stimuliert es Zellen dazu, Acute-Phase Proteine zu bilden und es rekrutiert Neutrophile (Murphy et al. 2008).

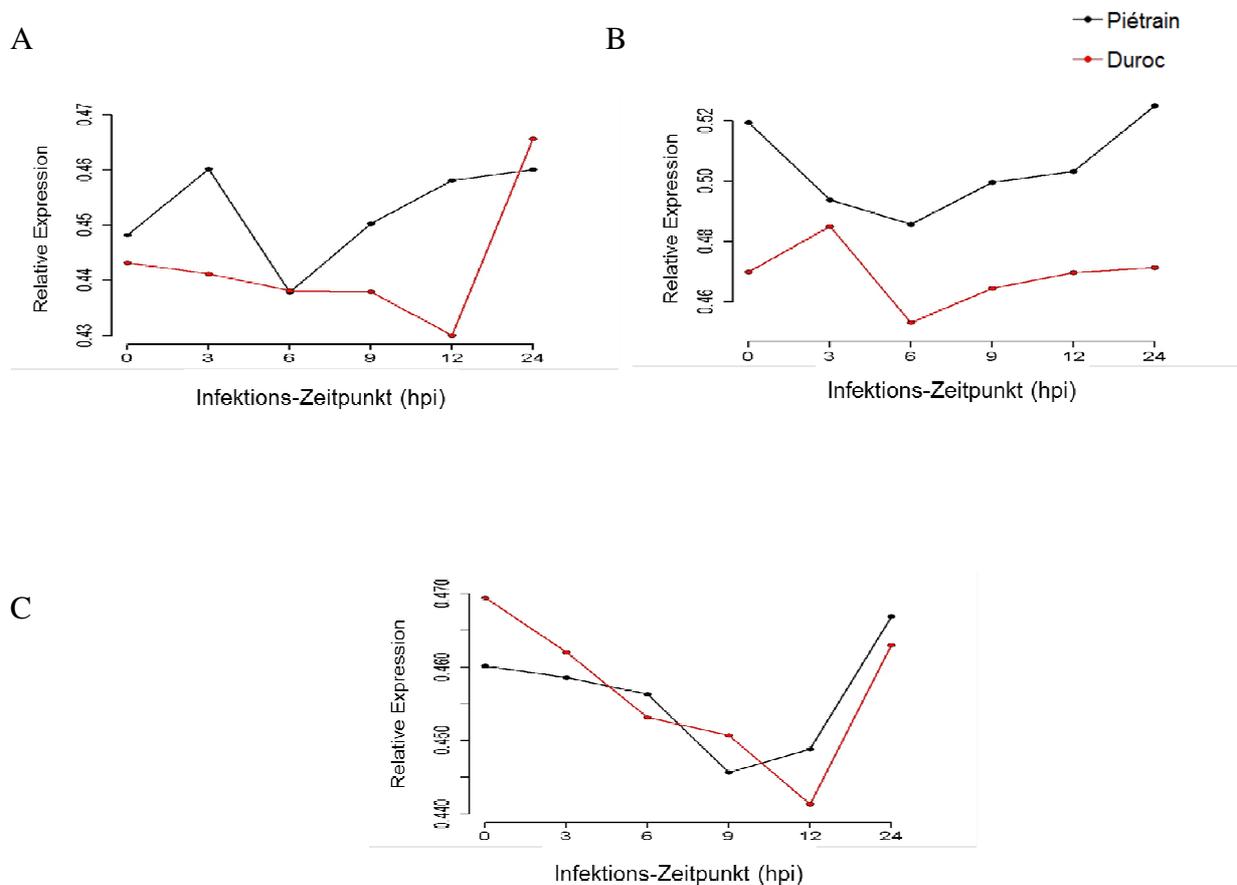


Abbildung 14: TNF- α Expressionprofil in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Lungen-DCs mittels Real-Time PCR (A), TNF- α Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter PAMs mittels Real-Time PCR (B) und TNF- α Expressionprofil PRRSV infizierter und nicht-infizierter Trachea-Epithelzellen mittels Real-Time PCR (C) von Piétrain (schwarze Linie) und Duroc (rote Linie), Versuchszeitpunkte 0 h und 3, 6, 9, 12, 24 hpi

Die TNF- α Expressionsprofile zeigen in allen respiratorischen Zellen (Piétrain und Duroc Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen) zum Zeitpunkt 24 hpi einen nach oben orientierten Expressionstrend.

Zusätzlich zu der TNF- α Expressionsanalyse wurde das TNF- α Proteinprofil mittels Western Blot ermittelt.



Abbildung 15: TNF- α Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot



Abbildung 16: TNF- α Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot

Das Referenz Protein β -Actin wurde auch in allen Zelllinien (Piétrain und Duroc Lungen-DCs sowie Trachea-Epithelzellen) und zu allen Versuchszeitpunkten (0 h, 3, 6, 9, 12 und 24 hpi) mittels Western Blot detektiert und zeigte eine gleichförmige Expression in allen respiratorischen Zellen.



Abbildung 17: β -Actin Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs mittels Western Blot

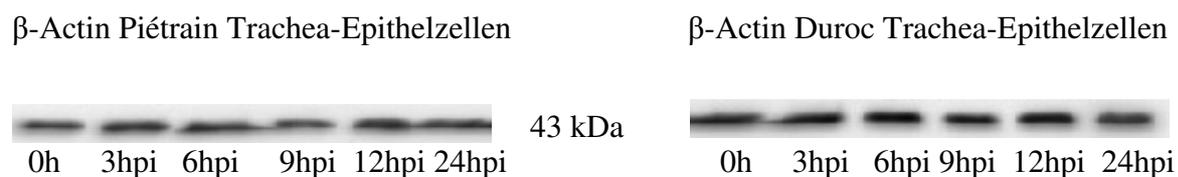


Abbildung 18: β -Actin Proteinexpression in PRRSV infizierten und nicht-infizierten Piétrain und Duroc Trachea-Epithelzellen mittels Western Blot

Aus früheren Studien ist bekannt, dass PRRSV die Fähigkeit besitzt, der Wirt-Immunreaktion zu entkommen, bzw. diese zu manipulieren hinsichtlich einer Hemmung der Immunreaktion der Zytokine und Chemokine (Genini et al. 2008, Miller et al. 2010, Xiao et al. 2010a, Xiao et al. 2010b). Zytokine und Chemokine spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Sie sind wichtig bei der Interaktion mit Immunzellen und aktivieren die inflammatorische und adaptive Immunreaktion. Sie arbeiten als Mediatoren (Abbas et al. 2012, Alberts et al. 2008).

In der aktuellen Studie wird die Zytokin-Veränderung post PRRSV Infektion in den Expressionsprofilen der Kandidatengene (IL-6, NF- κ B1, TNF- α , JAK2, CCL4, CXCL2) deutlich. Auffallend waren die vorkommenden Rassen- und Zellunterschiede in der Reaktion auf PRRSV. PRRSV infizierte Lungen-DCs zeigten im Gegensatz zu PRRSV infizierten PAMs einen runter orientierten Expressionstrend zum Zeitpunkt 24 hpi. Deshalb ist anzunehmen, dass die PRRSV infizierten Lungen-DCs nicht „genügend Energie“ haben die folgenden Gen-Kaskaden zu aktivieren, um eine effektive Immunreaktion hervorzurufen, bzw. dass diese Zellen durch das Virus gehemmt wurden. Im Gegensatz dazu weisen die hoch regulierten PAMs daraufhin, dass sie trotz des Viruseintritts ausreichend Energie haben, um die folgenden Signalketten im Immunsystem zu aktivieren.

4. Zusammenfassung

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom (PRRS), einer der weltweit wirtschaftlich bedeutendsten Krankheitskomplexe, verursacht enorme Verluste und Schäden in der Schweineproduktion. Die Managementleistungen, die Betriebsgröße und -struktur, die Stallhygiene, das Alter und die genetische Herkunft der Tiere spielen bei einer PRRS Krankheitsentstehung entscheidende Rollen. Die Kontrolle dieser Krankheit bleibt problematisch, so lange keine effizienteren Impfstoffe entwickelt worden sind. Eine weitere Möglichkeit, PRRS-Wirkungen zu vermeiden, bieten Zuchtprogramme, die die Krankheitsresistenz und -toleranz steigern.

Die Einflussnahme von genetischen Elementen und Funktionen auf die Immunreaktion post PRRSV sind noch unklar. Deswegen waren Hauptziele dieser Studie, das globale Transkriptomprofil von PRRSV infizierten Lungen-DCs mittels RNA-Seq von zwei unterschiedlichen Schweinerassen (Piétrain und Duroc) zu charakterisieren und Gründe für die ineffektive Immunreaktion von Schweinen post PRRSV Infektion als auch die Auswirkungen dieser unzureichenden Immunreaktion zu klären.

Für die Untersuchung wurden sechs weibliche, 30 Tage alte Ferkel von zwei unterschiedlichen Schweinerassen (Piétrain und Duroc) ausgewählt. Es wurden PAMs und Lungen-DCs sowie Trachea-Epithelzellen isoliert und anschließend mit dem europäischen PRRSV Stamm LV infiziert. Nicht-infizierte (0 h) und infizierte (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen wurden gesammelt. Für die RNA-Seq wurden nicht-infizierte (0 h) und infizierte (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) Piétrain und Duroc Lungen-DCs eingesetzt. Das Sequenz-Alignment erfolgte mit dem aktuellen Referenzgenombild Suscrofa 10.2 und zusätzlich mit dem kompletten Genom des LV Stammes. Für die Validierung wurden die Genexpressionsprofile von 12 immunrelevanten Kandidatengen in den verschiedenen respiratorischen Zellen (Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen) ermittelt.

Insgesamt konnten nach der RNA-Seq 20.396 porcine Gentranskripte in Piétrain und Duroc Lungen-DCs charakterisiert werden. Durch die globale Transkriptomanalyse wurden frühe, temporal verschiedene und konträre Immunreaktionen in PRRSV infizierten Lungen-DCs (Piétrain & Duroc) identifiziert. Das Virus-Sequenz-Alignment zeigte, dass der LV Stamm sowohl Piétrain und Duroc Lungen-DCs infizierte als auch, dass es sich dort replizieren kann. Nach der PRRSV Infektion konnten rassen- und zellspezifische Unterschiede in der Reaktion auf eine PRRSV Infektion ermittelt werden. Rassenunterschiede waren sowohl beim Viruswachstum als auch in den identifizierten mRNA Expressionsprofilen sowie in den unterschiedlich exprimierten Immungenen und Kandidatengen feststellbar. Duroc Lungen-DCs reagierten in dem frühen Infektionszeitraum (24 hpi) effektiver als Piétrain Lungen-DCs. Die zellspezifischen Reaktionsunterschiede konnten durch die Expressionsprofil-Analyse der

selektierten Kandidatengenom identifiziert werden. Lungen-DCs waren nach der PRRSV Infektion in ihrer Immunreaktion gehemmt, während PRRSV infizierte PAMs aktiviert waren. Zusätzlich konnten durch die Cluster-, Netzwerk- und die Signalweg-Analyse Schlüssel-Cluster - Cluster 34 für Piétrain und Cluster 32 für Duroc Lungen-DCs – und Schlüssel-Signalwege ermittelt werden.

5. Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Durch die globale Transkriptomanalyse konnten rassenspezifische Unterschiede in der Reaktion auf PRRSV identifiziert werden. PRRSV infizierte Duroc Lungen-DCs reagierten effektiver in einer frühen Phase (24 hpi) der Infektion als Piétrain Lungen-DCs. Diese Erkenntnis sollte in einer Modifizierung der Züchtungsstrategien berücksichtigt werden.

Weitere Ergebnisse dieser Studie waren Erkenntnisse über die unterschiedlichen Virus-Wirt-Interaktionen der verschiedenen respiratorischen Zelllinien (Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen) post PRRSV Infektion. PRRSV infizierte Lungen-DCs waren in ihrer Immunreaktion gehemmt, während PRRSV infizierte PAMs aktiviert waren. Diese Erkenntnisse sollten die Entwicklung effektiverer Impfstoffe beeinflussen, um die Prävention einer PRRSV Infektion zu verbessern.

Die in dieser Untersuchung identifizierten Schlüssel-Cluster, Schlüssel-Signalwege und spezifischen Gene liefen Informationen über die biologischen Hintergründe. Diese Schlüssel-Cluster, Schlüssel-Signalwege und Gene sollten ebenfalls für die Prävention und in der Impfstoffentwicklung genutzt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2012): Cellular and Molecular Immunology 7th edition. Saunders an imprint of Elsevier Inc. 1-35, 37-53, 55-88, 139-171, 203-224, 243-268, 293-317
- Ait-Ali T, Wilson AD, Carre W, Westcott DG, Frossard JP, Mellencamp MA, Mouzaki D, Matika O, Waddington D, Drew TW, Bishop SC, Archibald AL (2011): Host inhibits replication of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus in macrophages by altering differential regulation of type-I interferon transcriptional response. *Immunogenetics* 63, 437-448
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008): Molecular biology of the cell 5th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 921-944, 1417-1601
- Albina E (1997): Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55, 309-316
- Anders S, Huber W (2010): Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106
- Badaoui B, Rutigliano T, Anselmo A, Vanhee M, Nauwynck H, Giuffra E, Botti S (2014): RNA-Sequence Analysis of Primary Alveolar Macrophages after In Vitro Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strains of Differing Virulence. *PLoS One* 9, e91918
- Balasuriya UB (2013): Coronaviridae; arteriviridae and roniviridae, In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, editors. *Veterinary Microbiology* 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc. 456-486
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D (1992): Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4, 127-133
- Beura LK, Sarkar SN, Kwon B, Subramaniam S, Jones C, Pattnaik AK, Osorio FA (2010): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol* 84, 1574-1584
- Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL (2002): Porcine respiratory disease complex, In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): ASM Press, Chapter 13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>
- Chen XX, Quan R, Guo XK, Gao L, Shi J, Feng WH (2014): Up-regulation of pro-inflammatory factors by HP-PRRSV infection in microglia: implications for HP-PRRSV neuropathogenesis. *Vet Microbiol* 170, 48-57
- Chen Z, Lawson S, Sun Z, Zhou X, Guan X, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Fang Y (2010): Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, 87-97

- Cho JG, Dee SA (2006): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66, 655-662
- Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, et al. (1992): Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126
- Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ (1993): Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193, 329-339
- De Baere MI, Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ (2012): Interaction of the European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with sialoadhesin (CD169/Siglec-1) inhibits alveolar macrophage phagocytosis. *Vet Res* 43, 47
- Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, Pensaert MB (2002): Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 76, 4312-4320
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531
- Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN (2007): Introduction to modern virology 6th edition. Blackwell Publishing Ltd. 1-17, 214-225, 394-395
- Duan X, Nauwynck HJ, Favoreel HW, Pensaert MB (1998): Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 72, 4520-4523
- Eckerle I, Ehlen L, Kallies R, Wollny R, Corman VM, Cottontail VM, Tschapka M, Oppong S, Drosten C, Muller MA (2014): Bat airway epithelial cells: a novel tool for the study of zoonotic viruses. *PLoS One* 9, e84679
- Genini S, Delputte PL, Malinverni R, Cecere M, Stella A, Nauwynck HJ, Giuffra E (2008): Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 89, 2550-2564
- Halbur PG, Rothschild MF, Thacker BJ, Meng X-J, Paul PS (1998): Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Anim Breed Genet* 115. 181-189
- Herzog P, Drosten C, Muller MA (2008): Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virol J* 5, 138
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007): Kuby Immunology sixth edition, W. H. Freeman and Company. 1-75, 302-370, 447-474

- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009): Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25
- Li H, Zheng Z, Zhou P, Zhang B, Shi Z, Hu Q, Wang H (2010): The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes interferon regulatory factor 3 activation. *J Gen Virol* 91, 2947-2958
- Liu CH, Chaung HC, Chang HL, Peng YT, Chung WB (2009): Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 136, 266-276
- Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE (2007): Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229
- Lu T, Liang H, Li H, Wu H (2011): High Dimensional ODEs Coupled with Mixed-Effects Modeling Techniques for Dynamic Gene Regulatory Network Identification. *J Am Stat Assoc* 106, 1242-1258
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci* 101, 5598-5603
- Lunney JK, Chen H (2010): Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Res* 154, 161-169
- Ma P, Castillo-Davis CI, Zhong W, Liu JS (2006): A data-driven clustering method for time course gene expression data. *Nucleic Acids Res* 34, 1261-1269
- Ma P, Zhong W (2008): Penalized Clustering of Large-Scale Functional Data With Multiple Covariates. *J Am Stat Assoc*, 103:482 625-636
- Martin M (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17, 10-12
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD (2006): New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J* 3, 63
- Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJ (1993): Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72
- Miller LC, Neill JD, Harhay GP, Lager KM, Laegreid WW, Kehrli ME, Jr. (2010): In-depth global analysis of transcript abundance levels in porcine alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv Virol* 2010, 864181
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2010): Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung. In: *Molekulare Virologie* 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 145-262

- Murphy K, Travers P, Walter P (2008): *Janeway's Immunobiology, Seventh Edition Interactive*, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 1-38, 39-108, 323-377, 421-495
- Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F (2002): Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15, 533-547
- Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB (1999): Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 297-305
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ (2005): Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392
- Petry DB, Holl JW, Weber JS, Doster AR, Osorio FA, Johnson RK (2005): Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations. *J Anim Sci* 83, 1494-1502
- Pröll MJ (2014): Transcriptome analysis using RNA-Seq on response of respiratory cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [dissertation]. Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Tierzucht und Tierhaltung, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Heft 172, urn:nbn:de:hbz:5n-38304
- Quinlan AR, Hall IM (2010): BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841-842
- Rossow KD (1998): Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* 35, 1-20
- Shuai K, Liu B (2003): Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3, 900-911
- Sørensen V, Jorsal SE, Mousing J (2006): Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine 9th edition*. Blackwell Publishing Company, Ames Iowa. 149-178
- Tizard IR (2013): *Veterinary Immunology 9th edition*, Saunders an imprint of Elsevier Inc. 1-164, 209-310
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009): TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111
- Wang R, Nan Y, Yu Y, Yang Z, Zhang YJ (2013): Variable interference with interferon signal transduction by different strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 166, 493-503
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, et al. (1991): Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Quart* 13, 121-130

- Wolf JB (2013): Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol Ecol Resour* 13, 559-572
- Xiao S, Jia J, Mo D, Wang Q, Qin L, He Z, Zhao X, Huang Y, Li A, Yu J, Niu Y, Liu X, Chen Y (2010a): Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS One* 5, e11377
- Xiao S, Mo D, Wang Q, Jia J, Qin L, Yu X, Niu Y, Zhao X, Liu X, Chen Y (2010b): Aberrant host immune response induced by highly virulent PRRSV identified by digital gene expression tag profiling. *BMC Genomics* 11, 544
- Zhao W, Pahar B, Borda JT, Alvarez X, Sestak K (2007): A decline in CCL3-5 chemokine gene expression during primary simian-human immunodeficiency virus infection. *PLoS One* 2, e726
- Zhou P, Zhai S, Zhou X, Lin P, Jiang T, Hu X, Jiang Y, Wu B, Zhang Q, Xu X, Li JP, Liu B (2011): Molecular characterization of transcriptome-wide interactions between highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine alveolar macrophages in vivo. *Int J Biol Sci* 7, 947-959
- Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M (2012): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine arterivirus). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine* 10th edition, John Wiley & Sons, Inc. 461-486

7. Anhang

Gen-Namen	
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
CCL23	Chemokine (C-C motif) ligand 23
CCL3L1	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1
CD80	CD80 molecule
CD86	CD86 molecule
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DDX58/RIG-I	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2
IFN- α	Interferon, alpha
IFN β 1	Interferon, beta 1, fibroblast
IFN- γ	Interferon, gamma
IL-1	Interleukin 1
IL-1 α	Interleukin 1, alpha
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8/CXCL8	Interleukin 8
IL-12	Interleukin 12
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF7	Interferon regulatory factor 7
JAK2	Janus kinase 2
MAVS/IPS-1	Mitochondrial antiviral signaling protein
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NF- κ B	Nuclear factor- κ B

RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
SIGLEC-1/CD169	Sialoadhesin
SLA-1/MHC I	MHC class I antigen 1
SLA-DRA	SLA-DRA MHC class II DR-alpha
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
TLR3	Toll-like receptor 3
TLR7	Toll-like receptor 7
TLR8	Toll-like receptor 8
TNF- α	Tumor necrosis factor
TYK2	Tyrosine kinase 2

8. Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten

Notwendig wäre abzuklären, ob die hier gewonnen Ergebnisse und Erkenntnisse über die effektiver reagierenden Duroc Tiere auf PRRSV sich in einem Vergleich mit anderen Schweinerassen bestätigen.

Um den zellspezifischen Unterschied der respiratorischen Zellen in der Immunreaktion auf PRRSV in der Impfstoffforschung nutzbar zu machen, sollten aktivierte Lungen-DCs als Adjuvantien für die Impfstoffgewinnung genutzt werden.

Ein Projekt zur genetischen Untersuchung der Impfantwort von Schweinen auf eine Immunisierung mit dem PRRSV-Antigen wurde im Rahmen des Lehr- und Forschungsschwerpunkts „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“ genehmigt. Die in diesem Projekt angestrebten Ziele bauen auf den hier vorliegenden Ergebnissen und Erkenntnissen auf.

9. Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte

10. Liste über Veröffentlichungen

Pröll MJ (2014): Transcriptome analysis using RNA-Seq on response of respiratory cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [dissertation]. Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Tierzucht und Tierhaltung, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Heft 172, urn:nbn:de:hbz:5n-38304

Pröll M, Neuhoff C, Große-Brinkhaus C, Sahadevan S, Qu X, Cinar MU, Müller MA, Drosten C, Uddin MJ, Tesfaye D, Tholen E, Looft C, Schellander K; RNA-Seq analysis of respiratory cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Workshop „Animal Immunogenetic and Molecular Immunology“, 30./31.10.2014, Kayseri, Türkei

Pröll M, Große-Brinkhaus C, Sahadevan S, Qu X, Islam MA, Müller MA, Drosten C, Cinar MU, Uddin MJ, Tesfaye D, Tholen E, Looft C, Schellander K; RNA-Seq Analyse von porcinen dendritischen Zellen nach experimenteller Infektion mit PRRSV; DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung, 4./5.9.2013, Göttingen, Tagungsband:B1

11. Liste über Vorträge

Pröll M, Neuhoff C, Große-Brinkhaus C, Sahadevan S, Qu X, Cinar MU, Müller MA, Drosten C, Uddin MJ, Tesfaye D, Tholen E, Looft C, Schellander K; RNA-Seq analysis of respiratory cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) Workshop „Animal Immunogenetic and Molecular Immunology“, 30./31.10.2014, Kayseri, Türkei

Pröll M, Große-Brinkhaus C, Sahadevan S, Qu X, Islam MA, Müller MA, Drosten C, Cinar MU, Uddin MJ, Tesfaye D, Tholen E, Looft C, Schellander K; RNA-Seq Analyse von porcinen dendritischen Zellen nach experimenteller Infektion mit PRRSV; DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung, 4./5.9.2013, Göttingen

12. Liste über Pressemitteilungen**13. Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen, Demonstrationen**

14. Abstract

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most important viral diseases of the swine industry worldwide (Balasuriya 2013). Its aetiological agent is the PRRS virus (PRRSV) (Balasuriya 2013, Conzelmann et al. 1993). The understanding of the genetic elements and functions, involved in the immune response to PRRSV, remains still unclear.

The main objectives of this study are to characterize the global transcriptome profile of PRRSV infected lung DCs, by using the RNA-Sequencing (RNA-Seq), to identify causes of the ineffective immune response to PRRSV as well as to determine changes in the expression profile in different respiratory cells post PRRSV infection.

For the *in vitro* investigations six female 30 days old piglets of two different porcine breeds (Pietrain and Duroc) were selected, pulmonary alveolar macrophages (PAMs), lung dendritic cells (lung DCs) and trachea epithelial cells were isolated and infected with the European prototype PRRSV strain Lelystad virus (LV). The cell characterization of the lung DCs and PAMs was carried out by using a flow cytometric analysis, for trachea-epithelial cells the cell characterization was done by an immunofluorescence assay. Non-infected (0 h) and infected (3, 6, 9, 12 and 24 hpi) lung DCs, PAMs and trachea epithelial cells were collected. After the RNA isolation the RNA quality was measured by Bioanalyzer. Non-infected (0 h) and infected (3, 6, 9, 12 and 24 hpi) lung DCs of both breeds were used for RNA-Seq. The sequence alignment was done with the reference genome build Suscrofa 10.2 and with the complete genome of LV strain.

The transcriptome analysis of PRRSV infected lung DCs of Pietrain and Duroc resulted in an amount of 20,396 porcine predicted gene transcripts. Through the global transcriptome analysis early temporal, different and contrary immune reactions in PRRSV infected lung DCs (Pietrain & Duroc) were identified. The virus sequence alignment exhibited that the LV strain was able to infect Pietrain and Duroc lung DCs and to replicate there. Not only breed-differences (Pietrain und Duroc) post PRRSV infection in the virus growth, also breed-differences in the detected mRNA expression profiles and in the differently expressed genes were identified. Beside these breed-dependent differences, respiratory cell-type (lung DCs, PAMs, trachea-epithelial cells) dependent differences in the response to PRRSV were characterized. 37 clusters for Pietrain and 35 clusters for Duroc as well as important key clusters and key pathways were identified.

15. Kurzfassung

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom (PRRS) ist eine der wichtigsten viralen Erkrankungen in der weltweiten Schweineindustrie (Balasuriya 2013). Der ätiologische Erreger ist das PRRS Virus (PRRSV) (Balasuriya 2013, Conzelmann et al. 1993). Die Einflussnahme von genetischen Elementen und Funktionen auf die Immunreaktion post PRRSV ist noch unklar.

Hauptziele dieser Studie sind, das globale Transkriptomprofil von PRRSV infizierten Lungen-DCs mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von zwei unterschiedlichen Schweinerassen (Piétrain und Duroc) zu charakterisieren und Gründe für die ineffektive Immunreaktion von Schweinen post PRRSV Infektion als auch Veränderungen im Expressionsprofil von unterschiedlichen respiratorischen Zellen nach der Virusinfektion zu ermitteln.

Für das in vitro Infektionsmodell wurden sechs weibliche, 30 Tage alte Ferkel von zwei unterschiedlichen Schweinerassen (Piétrain und Duroc) ausgewählt. Alveolarmakrophagen (PAMs), dendritische Zellen (Lungen-DCs) und Epithelzellen aus der Trachea wurden von allen Versuchstieren isoliert. Die Zellcharakterisierung der PAMs und der Lungen-DCs erfolgte mittels der Durchflusszytometrie und die der Tracheaepithelzellen mittels Immunfluoreszenz Assay. Alle respiratorischen Zellen wurden mit dem europäischen PRRSV Stamm Lelystad Virus (LV) infiziert. Nicht-infizierte (0 h) und infizierte (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen wurden gesammelt. Nach der RNA Isolierung folgte die Qualitätsbestimmung der RNA mittels Bioanalyzer. Zur RNA-Seq wurden nicht-infizierte (0 h) und infizierte (3, 6, 9, 12 und 24 hpi) Lungen-DCs beider Schweinerassen eingesetzt. Das Sequenz-Alignment erfolgte mit dem aktuellen Referenzgenombild Suscrofa 10.2 und mit dem kompletten Genom des LV Stammes.

Die Transkriptom-Analyse von PRRSV infizierten Piétrain und Duroc Lungen-DCs charakterisierte 20.396 porcine Gentranskripte. Durch die globale Transkriptomanalyse wurden frühe, temporal verschiedene und konträre Immunreaktionen in PRRSV infizierten Lungen-DCs (Piétrain & Duroc) identifiziert. Das Virus-Sequenz-Alignment zeigte, dass der LV Stamm sowohl Piétrain und Duroc Lungen-DCs infizieren als auch sich dort replizieren kann. Nach der PRRSV Infektion konnten Rassenunterschiede (Piétrain und Duroc) in der Reaktion auf eine PRRSV Infektion festgestellt werden, sowohl beim Viruswachstum als auch in identifizierten mRNA Expressionsprofilen und bei den unterschiedlich exprimierten Genen. Zudem konnten zellspezifischen Reaktionsunterschiede auf PRRSV in den verschiedenen respiratorischen Zelltypen (Lungen-DCs, PAMs und Trachea-Epithelzellen) durch die Expressionsprofil-Analyse der selektierten Kandidatengene charakterisiert werden. Zusätzlich wurden 37 Cluster für Piétrain, 35 für Duroc sowie entscheidende Schlüssel-Cluster und Schlüssel-Signalwege identifiziert.