

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Landwirtschaftliche Fakultät

The logo consists of the letters 'U', 'S', and 'L' in a stylized, hand-drawn font. The 'U' is green, the 'S' is black, and the 'L' is red. Below the letters are two parallel green diagonal lines.

Lehr- und Forschungsschwerpunkt

„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“

Forschungsbericht

Nr. 186

Untersuchung der angeborenen Immunkompetenz von Schweinen stimuliert mit PRRS-Virus Impfstoff

Projektleitung: Prof. Dr. K. Schellander

Dr. agr. C. Neuhoff

Dr. agr. Md. A. Islam

Dr. agr. M. J. Pröll

Dr. agr. M. J. Uddin

Institut für Tierwissenschaften

Professur für Tierzucht und Tierhaltung

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte 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, Oktober 2017

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Karl Schellander

Projektbearbeiter: Dr. agr. C. Neuhoff
Dr. agr. M. A. Islam
Dr. agr. M. J. Pröll
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

Zitiervorschlag:

NEUHOFF, C., ISLAM, M. A., PRÖLL, M. J., GROSSE-BRINNHAUS, C., UDDIN, M. J., SCHELLANDER, K. (2017): Untersuchung der angeborenen Immunkompetenz von Schweinen stimuliert mit PRRS-Virus Impfstoff. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunkts USL, Nr. 186, 72 Seiten.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung/Wissensstand.....	1
1.2	Zielsetzung	3
2	Material und Methoden	5
2.1	Material.....	5
2.1.1	Tiere	5
2.2	Methoden	7
2.2.1	Isolation der PBMCs und des Plasmas	7
2.2.2	Messung des Antikörperstatus im Plasma	7
2.2.3	Extraktion und Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	7
2.2.4	Erstellung eines Microarray basiertem globalen mRNA Expressionsprofils in PBMCs.....	8
2.2.5	Erstellung eines Microarray basiertem globalen miRNA Expressionsprofils in PBMCs....	11
2.2.6	Validierung der Microarray Ergebnisse mittels qRT-PCR.....	12
2.3	Statistische Analyse der Microarray Daten.....	12
2.3.1	Normalisierung, Hintergrundkorrektur, Filterung und Zusammenfügung	12
2.3.2	Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Gene (DEGs)	13
2.3.3	Alternative Splicing Analyse	13
2.3.4	Bioinformatische Auswertung der Microarraydaten.....	13
3	Ergebnisse	18
3.1	PRRSV spezifische Antikörper Reaktion.....	18
3.2	Transkriptomprofil von PBMCs nach der PRRSV-Impfung.....	19
3.3	Variationen im PBMC Transkriptomprofil zwischen geimpften und nicht geimpften Schweine	19
3.4	Unterschiedlich exprimierte Gene in PBMCs nach der PRRSV-Impfung	20
3.5	GO- und Signalweganalyse mit unterschiedlich exprimierte Genen nach einer PRRSV Impfung.....	23
3.6	Transkriptionale Netzwerke von PRRSV-Impfung induzierten Gene der angeborene Immunantwort in PBMCs.....	27
3.7	Validierung der Microarray Daten.....	30
3.8	Vergleichende Transkriptomstudie zwischen den Rassen Deutsche Landrasse und Piétrain.....	30

3.8.1	Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene in PBMCs nach einer PRRSV-Impfung im Rassenvergleich	31
3.8.2	Globales Expressionsprofil von unterschiedlich exprimierten Genen zwischen DL und Pi Schweinen	33
3.8.3	Netzwerkanalyse der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den Rassen DL und Pi	35
3.8.4	GO- und Signalweganalyse mit rassespezifischen unterschiedlich exprimierten Genen.....	36
3.8.5	Rassespezifische Transkriptomsignatur	38
3.9	Vergleich angeborene und erworbene Immunantwort in Piétrain Schweinen	41
3.9.1	Antikörper Nachweis	41
3.9.2	Transkriptomprofil von PBMCs nach einer PRRSV-Impfung	41
3.9.3	PBMCs Expressionsausprägung im Zusammenhang mit der angeborenen und adaptierten Immunantwort	41
3.9.4	GO und Signalweganalyse.....	44
3.9.5	Transkriptionsfaktoren	46
3.9.6	Zelltyp Charakterisierung.....	48
3.9.7	Funktionale Netzwerkanalyse für das angeborene Immuntranskriptom.....	49
3.9.8	Funktionelle Netzwerkanalyse für das adaptive Immuntranskriptom	51
3.10	Integrierte Analyse der mRNA und der miRNA Microarray Daten.....	53
3.10.1	Zeitliche Expressionsdynamik von miRNAs nach einer PRRSV-Impfung	53
3.10.2	Rassespezifische miRNA Expression zwischen DL und Pi Schweinen	56
3.10.3	Vorhersage von mRNA-Targets für die DE miRNAs in PRRSV-geimpften PBMCs	56
3.10.4	Integriertes miRNA-mRNA-Netzwerk für PRRSV-Impfstoffreaktionen in PBMCs	59
3.10.5	Funktionelle Annotation des miRNA-mRNA-Netzwerks.....	60
4	Zusammenfassung.....	62
5	Anhang.....	63
6	Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis	63
7	Referenzen	64
8	Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten	68
9	Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte	69
10	Liste über Veröffentlichungen.....	69
11	Liste über Vorträge	69
12	Liste über Pressemitteilungen.....	70

13	Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen, Demonstrationen	70
14	Kurzfassung Deutsch.....	71
15	Kurzfassung Englisch.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Übersicht über das experimentelle Design. Die vertikalen roten Linien stehen für die Blutprobensammlung. Die Pfeile stehen für die Zeitpunkte der Impfung. Die roten Kreise stehen für die mRNA Microarray Proben und die grünen für die miRNA Microarrays Proben, die für die Analysen eingesetzt wurden	6
Abbildung 2	Übersicht über die Präparation und das Markieren der mRNA Microarrays	10
Abbildung 3	Übersicht über die Präparation und das Markieren der miRNA Microarray.....	11
Abbildung 4	Antikörpertiter der geimpften und nicht geimpften Proben von DL Schweinen. Messung mittels ELISA	18
Abbildung 5	Venn-Diagramm der unterschiedlich exprimierten Gene in der Deutschen Landrasse zu den unterschiedliche Zeitpunkten verglichen mit der Kontrollgruppe	21
Abbildung 6	Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene nach der PRRSV Impfung. Grün repräsentiert die Anzahl der runterregulierten Gene und rot die Anzahl der hochregulierten Gene.....	22
Abbildung 7	Hierarchisches Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene über die Zeitpunkte hinweg.....	23
Abbildung 8	Biologische Signalwege der unterschiedlich exprimierten Gene nach der PRRSV-Impfung. In der Abbildung sind die Top 10 Signalwege mit der Anzahl der involvierten Gene und ihrer Regulation (grün/rot) zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 72 h nach der Impfung dargestellt	26
Abbildung 9	Globales Transkriptomnetzwerk der PRRSV Impfreaktion in PBMCs. Hier dargestellt das Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt 24 h nach Impfung. Jeder Kreis symbolisiert ein Gen. Je größer der Durchmesser desto vernetzter das Gen. Die Farben stehen für unterschiedliche Module mit unterschiedlicher biologischer Funktion.....	28
Abbildung 10	Kernnetzwerk der 13 Hauptgene aus dem globalem Netzwerk. Die Abbildung zeigt die Interaktionen zwischen den regulatorischen Genen aus dem globalen Netzwerk. Die blauen Kreise symbolisieren die Gene, die am stärksten an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind.....	29
Abbildung 11	qRT-PCR Validierung der Microarray Daten. Hier zu sehen die Korrelation zwischen dem FC der Microarray Daten (X-Achse) und der qRT-PCR Daten (Y-Achse) von 5 selektierten Genen.....	30
Abbildung 12	Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene im Vergleich der Rassen Deutsche Landrasse und Piétrain. Im Venn-Diagramm (A) sind die Gene aus den 4 Vergleichen überlappend dargestellt. In Abbildung (B) ist die Regulation der unterschiedlich exprimierten Gene zu sehen (Rot = hoch Regulation, Grün = runter Regulation).....	32
Abbildung 13	Der Volcano-Plot zeigt den FC Bereich der unterschiedlich exprimierten Gene in den 4 Vergleichen.....	33
Abbildung 14	Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene in den 4 Vergleichen und in beiden Rassen	34

Abbildung 15	Globales Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene beider Rassen. Der Durchmesser steht für die Stärke des Genes im Netzwerk und die Linien für ihre Verbindungen.....	35
Abbildung 16	Gen Ontologie der unterschiedlich exprimierten Gene. Die Balken spiegeln die Anzahl der Gene in dem jeweiligen GOs für die Rasse DL (A) und Pi (B) wieder	37
Abbildung 17	Rassenspezifische Netzwerke. (A) Deutsche Landrasse, (B) Piétrain	40
Abbildung 18	Volcano-Plot der am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt kurz nach der Impfung. Dargestellt ist der FC der Top-Ten Transkripte.....	42
Abbildung 19	Volcano-Plot der am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt 28 Tage nach der Impfung. Dargestellt ist der FC der Top-Ten Transkripte.....	43
Abbildung 20	Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene kurz nach und 28 Tage nach der Impfung	44
Abbildung 21	Die Top signifikanten Signalwege für (A) kurz nach der Impfung und (B) 28 Tage nach der Impfung.....	46
Abbildung 22	Die identifizierten Transkriptionsfaktoren der unterschiedlich exprimierten Gene für (A) kurz nach der Impfung und (B) 28 Tage nach der Impfung. Die blaue Linie gilt als Grenzwert für das Signifikanzniveau	47
Abbildung 23	Kreisplot der Zelltypisierung aus den unterschiedlich exprimierten Genen. (A) angeborene Immunität, (B) erworbene Immunität	49
Abbildung 24	Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene der angeborenen Immunantwort. Die Kreise stehen für einzelne Gene des Netzwerks, die Linien für ihre Interaction, die durch die Farben in Module eingeteilt sind	51
Abbildung 25	Venn-Diagramm der unterschiedlich exprimierten miRNAs für (A) Deutsche Landrasse und (B) Piétrain. Die Abbildung zeigt die Anzahl der Gene und ihre Überlappung.....	53
Abbildung 26	Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten miRNAs der Deutschen Landrasse über die unterschiedlichen Zeitpunkte hinweg	54
Abbildung 27	Integriertes Netzwerk von runterregulierten miRNAs und ihren hochregulierten mRNAs in DL Tieren nach der Impfung. Die roten Kreise stehen für die miRNAs und ihre Verbindungen zu den Genen	60
Abbildung 28	Signifikante Signalwege und GOs der Zielgene der unterschiedlich exprimierten miRNAs für DL Tiere.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Signifikante Gensets aus der Genset Enrichment Analyse	20
Tabelle 2	Gen Ontologische Einteilung der unterschiedlich exprimierten Gene.....	25
Tabelle 3	Messwerte des Netzwerkes und der relative Expressionswert der Hauptgene für beide Rassen	36
Tabelle 4	Biologische Signalwege der beiden Rassen und ihrer darin vorkommenden Gene	38
Tabelle 5	Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene für den Vergleich der angeborenen und erworbenen Immunität	42
Tabelle 6	Die signifikanten GOs mit der Anzahl der darin enthaltenen Gene	45
Tabelle 7	Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene aus den unterschiedlich exprimierten Genen.....	48

Tabelle 8	Signifikant unterschiedlich regulierten miRNAs und ihre Familien mit dem False Change für die unterschiedlichen Zeitpunkte.....	55
Tabelle 9	Rassenvergleich der durch Impfung induzierten unterschiedlich exprimierten miRNAs. Anzahl und Regulation der miRNAs.	56
Tabelle 10	Top 10 der runterregulierten miRNAs und ihre unterschiedlich regulierten Zielgene	58

Abkürzungsverzeichnis

BH	Benjamin und Hochberg
cDNA	Complementary DNA
cRNA	Antisense-RNA
CT	Threshold cycle
DE	Differenziell exprimiert
DEGs	Differenziell exprimierte Gene
DL	Deutsche Landrasse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FC	Log2 Fold Change
FDR	False Discovery Rate
GOs	Gen Ontologie
GSEA	Gen Set Enrichment Analyse
HECS	Zellspezifische Datenbank
IRFs	Interferon regulatorische Faktoren
IQR	Interquartilbereich
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
miRNA	Micro Ribonukleinsäure
NAb	Neutralisierenden Antikörpern
NES	Normalisierter Enrichment Score
OD	Optische Dichte

PAMs	Pulmonaren Alveolarmakrophagen
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cell
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
RMA	Robust Multi-Array Average
ss-cDNA	Sense-strand-cDNA
RNA	Ribonukleinsäure
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktor Bindungsstellen
TLR	Toll Like Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom (PRRS) ist einer der weltweit wirtschaftlich bedeutendsten Krankheitskomplexe, welcher erhebliche ökonomische Verluste in der Schweineproduktion verursacht (Neumann et al. 2005). Erstmals entdeckt wurde diese Krankheit 1987 in den USA und trat dann 1990 in Europa auf (Albina 1997). Eine PRRS Erkrankung kann sich zum einem in schweren Reproduktionsstörungen bei tragenden Sauen äußern und 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. PRRS ist seit jeher von großer Bedeutung für die Gesundheit, das Wohlergehen und die Produktion von Schweinen in kommerziellen Betrieben. Trotz sorgfältiger und stetiger Entwicklung von präventiven Maßnahmen, ist eine nachhaltige PRRS-Kontrolle noch nicht etabliert. Der Einsatz gezielter Präventionsmaßnahmen zur Bekämpfung und Eindämmung dieser Krankheit ist aufgrund der vielen sowie einfachen PRRS-Virus (PRRSV) Übertragungswege und der Mutationsfreudigkeit des Virus von großer Bedeutung. Eine Impfung gegen PRRSV (Tot- Lebendimpfstoff) ist grundsätzlich möglich und sollte zusätzlich zu Managementmaßnahmen präventiv durchgeführt 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). Eine weitere Möglichkeit könnte die genetische Kontrolle von PRRS durch Marker-gestützte Selektionszucht sein, die ein verbessertes Verständnis der Wirtsgenetik voraussetzt. In den letzten Jahren gab es große Durchbrüche bezüglich des Hintergrundwissens der Biologie und Ökologie des PRRS-Virus (PRRSV), aber die Komplexität der Virus-Wirts-Interaktion in Bezug auf genetische und epigenetische Resistenz-Mechanismen ist noch nicht gänzlich aufgeklärt (Lunney et al. 2016).

Verursacht wird PRRS durch 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, Collins et al. 1992, Modrow et al. 2010, Wensvoort et al. 1991). Studien beschreiben, dass die Virusinfektion unzureichend durch die Immunabwehr erkannt und die Immunmerkmale des Wirtes stark durch PRRSV moduliert werden. Um die Anfälligkeit von Schweinen auf das PRRS-Virus verbessern zu können, spielen die genetischen Einflüsse und damit die züchterischen Möglichkeiten eine

große Rolle (Genini et al., 2008, Petry et al., 2005, Rossow, 1998, Suradhat and Thanawongnuwech, 2003).

PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) bestehen aus Lymphozyten (T Zellen, B Zellen, und Natürliche Killerzellen) sowie Monozyten und sind wichtige Komponenten des Immunsystems. Peripheres Blut stellt eine attraktive Gewebequelle für in vivo Modelle dar, da es leicht zu gewinnen ist und ausreichend das Immunsystem widerspiegelt. Die Transkriptom-Profilierung von PBMCs im Laufe der Immunantwort wurde weithin verwendet, um das Ausmaß und die Kinetik der differentiellen Genexpression zu identifizieren (Ojha und Kostrzynska 2008, Gao et al. 2010, Huang et al. 2011, Wilkinson et al. 2012, Adler et al. 2013a). Die globalen Transkriptomstudien haben gezeigt, dass Schweine-PBMCs Genexpressionsmuster aufweisen können, die für eine bestimmte pathogene Infektion charakteristisch sind, beispielsweise klassische Schweinepest (Li et al. 2010) und Tetanustoxoid (Adler et al. 2013b). Es gibt klare Defizite im Verständnis über die wichtigsten immunologischen Ziele, den B- und T-Zell-vermittelten Schutz, ebenso wie über die genetischen Grundlagen der immunologischen Ereignisse, die auf der Transkriptionsebene im peripheren Blut nach einem frühen Stadium der PRRSV-Impfung auftreten.

1.2 Zielsetzung

Um die immunogenetischen Reaktionen der Virus-Wirts-Interaktion aufzudecken, wurden in diesem Projekt globale Expressionsprofile von mRNA und microRNAs (miRNA) in PBMCs von PRRSV-geimpften Deutschen Landrasse- und Piétrain -Schweinen durchgeführt. Diese Studie zielte darauf ab, die potenziellen Kandidatengene, biologische Signalwege, Transkriptionsnetze sowie epigenetische regulatorische Mechanismen zu identifizieren, die mit der Wirtsimmunantwort auf eine PRRSV-Impfung beteiligt sind.

Das Projektvorhaben zielt darauf ab:

(1) die genetische Regulierung der PRRS Erkrankung bzw. der genetischen Einflüsse auf die Immunreaktion in einem in-vivo Modell post PRRSV-Impfung in PBMCs zu untersuchen.

(2) die globalen Veränderungen im Transkriptomprofil von mRNAs post PRRSV-Impfung zu erkennen und zu beschreiben, um:

- die transkriptionelle angeborene Immunantwort auf einem Impfstoff in zwei Rassen zu charakterisieren.
- potenzielle Kandidatengene und funktionelle Netzwerke in Piétrain Schweinen zu identifizieren, die mit der angeborenen und erworbenen Immunantwort assoziiert sind.
- Rassenunterschiede in der Immunantwort des Transkriptoms von Deutschen Landrasse und Piétrain Schweinen aufzudecken.

(3) Erstellung von einem globalen Expressionsprofile miRNAs in PRRSV geimpften Tieren, um:

- das microRNAome in PBMCs zu charakterisieren und einen Zusammenhang zur angeborenen Immunantwort aufzudecken.
- epigenetische regulatorische Rassenunterschiede in der Reaktion auf die PRRSV-Impfung zu identifizieren.

(4) Integrierte Analyse der mRNA-miRNA Expressionsprofile in den PBMCs, um ein besseres Verständnis zu erlangen über die zellulären regulatorischen Netzwerke der Genexpression, die mit der Wirtsimmunantwort nach einer PRRSV-Impfung assoziiert sind.

Die gewonnenen Erkenntnissen sollen zusammen mit unserem bereits abgeschlossenen Projekt „Untersuchungen zur genetischen Prädisposition von Schweinen gegenüber PRRS“ das genetische Verständnis der Immunreaktion auf das Eindringen eines Virus verbessern und dazu beitragen im Rahmen von Zuchtprogrammen PRRSV resistente Schweine erzeugen zu können und zum anderen effektivere Impfstoffe entwickeln zu können, 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 weibliche abgesetzte Schweine einer Altersgruppe (ca. 28 Tage alt) zweier unterschiedlicher Rassen (Piétrain (Pi) $n = 6$ und Deutsche Landrasse (DL) $n = 12$) für die *in vivo* Studie ausgesucht worden. Des Weiteren, wurde sich aufgrund eines Angebotes der Firma Affymetrix dafür entschieden nicht mittels *In Silico* Analyse nach Ziel-miRNAs zu suchen, sondern auch hier die Array-Technologie zu nutzen, um ein holistisches Profil anzufertigen.

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Für die Untersuchung der Wirt spezifischen Immunantwort auf eine PRRSV-Impfung in Schweinen zweier unterschiedlicher Rassen wurden zwei *in vivo* Immunisierungsmodelle erarbeitet. Das erste Experiment erfolgte in Tieren der Rasse Deutsche Landrasse (Abb. 1 A) zur Festlegung von notwendigen und wichtigen Zeitpunkten der Blutprobenziehung nach der Impfung, gefolgt von einem zweiten Experiment mit ausgewählten Zeitpunkten in der Rasse Piétrain (Abb. 1 B). Es wurden nur Tiere die klinisch gesund und keine Anzeichen von respiratorischen Erkrankungen sowie Geburtsdefekte aufzeigten, in den Versuch mit einbezogen. Die Tiere wurden auf der Forschungsstation Frankenforst der Rheinischen Friedrich-Wilhelms- Universität Bonn geboren und nach dem Absetzen beprobt. Die Ferkel wurden am Lebenstag 3 und 10 standartmäßig gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* geimpft.

Für die Untersuchung wurden Blutproben, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, von insgesamt 18 weiblichen Ferkeln der zwei genetisch unterschiedlichen Schweinerassen Pi und DL, gesammelt. Zwölf Ferkel der Rasse DL wurden von zwei Würfen ausgewählt. Diese Tiere wurden in zwei Gruppen, eine Kontrollgruppe (ungeimpft) und eine Versuchsgruppe (geimpft) mit jeweils 6 Tieren pro Gruppe eingeteilt. Die Versuchsgruppe erhielt ein Tag nach dem Absetzen die erste PRRSV Impfung sowie im Alter von 56 Tagen eine Auffrischung. Beim verwendeten Impfstoff handelte es sich um den Lebendimpfstoff Procilis® PRRS (Intervet). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 1 A und B) wurden 8 ml Blut von den Tieren aus der Halsvene entnommen und in Reaktionsgefäße mit 1,5 ml Antikoagulants (0,5 M EDTA) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung kühl gehalten.

Für das zweite Experiment wurden dann, aufgrund der erhaltenen Ergebnisse, nur 6 Piétrain Versuchstiere verwendet, da Zeitpunkt 0 (kurz vor der Impfung) sich als ausreichende Kontrolle erwies. Die Blutproben wurden direkt nach der Sammlung ins Institut verbracht und dort direkt weiter verarbeitet. Eine komplette Übersicht des Experimentes ist in Abb. 1 zu sehen.

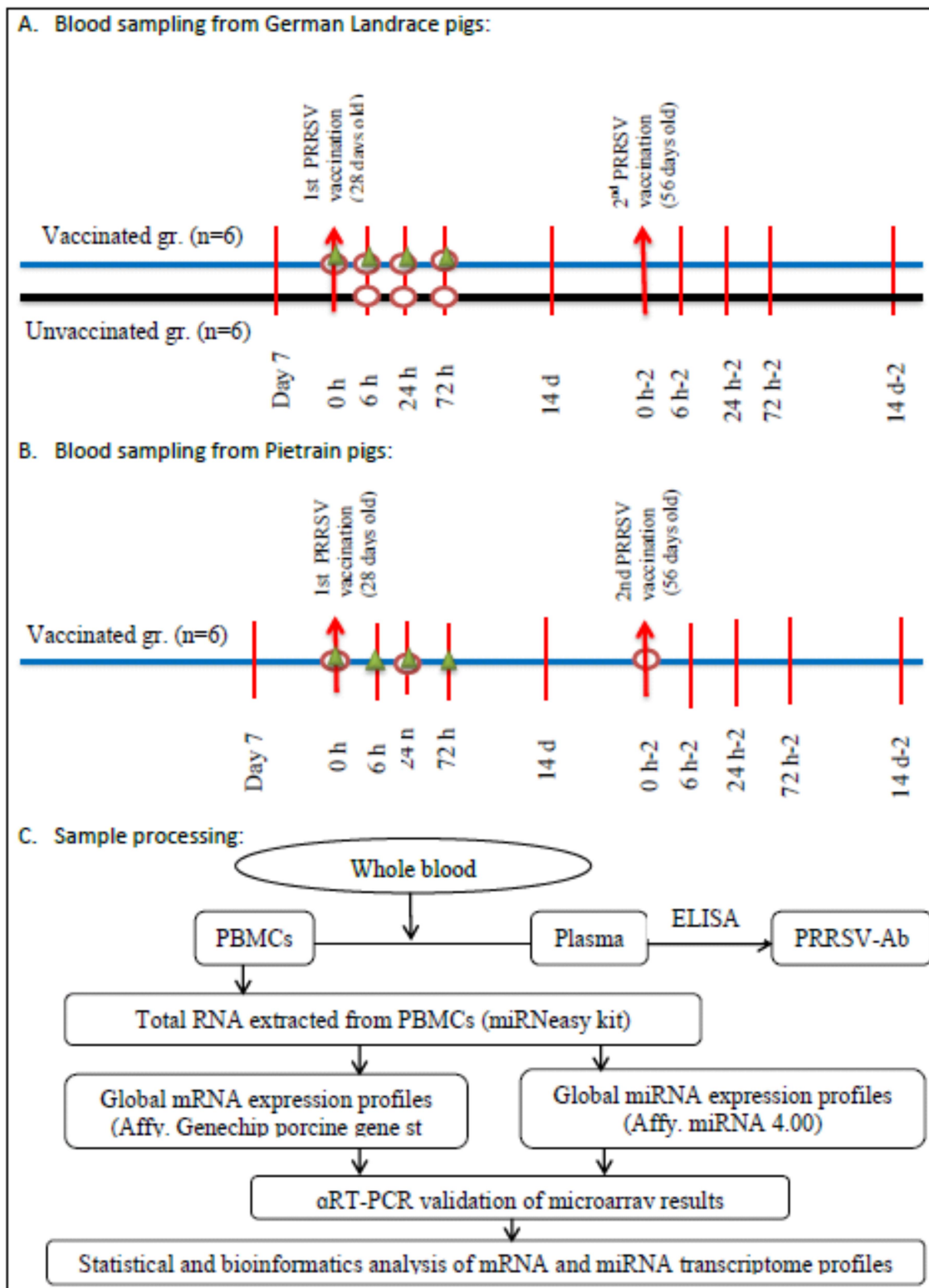


Abbildung 1 Schematische Übersicht über das experimentelle Design. Die vertikalen roten Linien stehen für die Blutprobensammlung. Die Pfeile stehen für die Zeitpunkte der Impfung. Die roten Kreise stehen für die mRNA Microarray Proben und die grünen für die miRNA Microarrays Proben, die für die Analysen eingesetzt wurden

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation der PBMCs und des Plasmas

Im Rahmen des Projektes wurden PBMCs und Plasma von ausgewählten Zeitpunkten und Tieren isoliert. Die Isolierung der PBMCs wurde mittels einer Dichtegradienten Zentrifugation mit Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt. Die Blutprobe wurden 1:1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt (PBS, pH = 7,4); und sorgfältig über 8 ml Histopaque®-1077-Lösung in einem 50 ml konischen Röhrchen geschichtet und bei 1500 U/min für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die PBMC-Präparation sorgfältig aspiriert und mit RBC-Lysepuffer (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) behandelt, um sie von Erythrozyten zu befreien. Anschließend wurden die PBMCs zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet geerntet. Die PBMC wurden bei -80°C bis zur RNA-Isolierung gelagert.

2.2.2 Messung des Antikörperstatus im Plasma

Zur Feststellung des PRRSV-spezifischen Antikörpertiters und zum Ausschluss von maternalen Effekten, wurden die Plasmaproben mittels eines ELISA nach Herstellerprotokoll gescreent (PRRSV-AK Screening, Synlab Vet GmbH, Augsburg, Deutschland). Die optische Dichte (OD) jeder Probe wurde bei 650 nm gemessen in einem Bio-Rad 680 Mikroplattenleser. Die Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von PRRSV-Antikörper erfolgte durch die Berechnung des positivem (S/P)-Verhältnis. Das S/P-Verhältnis wurde berechnet nach der folgenden Gleichung: $S/P\text{-Verhältnis (\%)} = 100 \times [(OD \text{ der Testprobe} - \text{Mittlerer OD von Negativkontrollen}) / (\text{Mittlerer OD der positiven Kontrollen} - \text{Mittlerer OD der Negativkontrollen})]$. Die Proben wurden als positiv auf PRRSV-Antikörper angesehen, wenn das S/P-Verhältnis mehr als 0,4 war, wie von Kittawornrat et al. (2012) beschrieben.

2.2.3 Extraktion und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA (einschließlich der miRNA) aus den PBMCs erfolgte unter Verwendung des miRNeasy-Minikits (P/N 217004, Qiagen, Co.) nach der Anleitung des Herstellers, gefolgt von einer DNase Behandlung (P/N 79254, Qiagen, Co). Die RNA-Konzentration und die Reinheit wurden mittels NanoDrop® Spektrophotometrie (ND-8000, NanoDrop Technologies) gemessen. Die extrahierte RNA galt als rein, wenn das Absorptionsverhältnis (A260:A280) nahe bei 2,00 (1,80 - 2,20) lag. Die RNA-Integrität wurde durch Visualisierung auf einem 2% Agarosegel überprüft, gefolgt von einer Mikrokapillarelektrophorese auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer mit einem RNA 6000 Nanochip Kit (Agilent Technologies, Waghäusel - Wiesental, Deutschland).

2.2.4 Erstellung eines Microarray basierendem globalen mRNA Expressionsprofils in PBMCs

Die Microarray-Technologie ermöglicht eine Momentaufnahme des gesamten zellulären Transkriptoms (entweder messenger RNA oder microRNA) auf einem einzigen Microarray-Chip. Eine Untersuchung auf die komplexen Wechselwirkungen zwischen tausenden von Genen gleichzeitig (Schena 1996). Tatsächlich ist das aus Mikroarrays erhaltene RNA-Profil eine statische Darstellung von dem biologischen Zustand der Probe und liefert höchste Informationen und Durchsatz zur Klassifikation (Ebert und Golub 2004). In der vorliegenden Studie wurde für die globalen Expressionsprofile die Affymetrix Oligonukleotid-Microarray-Plattform eingesetzt, sowohl für mRNA als auch miRNA, in PBMC Proben, um die Konsequenzen einer PRRSV-Impfung auf zellulären regulatorischen Netzwerken der Genexpression zu untersuchen.

Für die mRNA-Expressionsprofilierung wurde das GeneChip® WT PLUS Reagenz Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet, um die Mikroarray-Zielsonden zu synthetisieren. Das cDNA-basierte Mikroarrayprotokoll, basierend auf dem WT PLUS Kit, wurde aus folgende Gründe durchgeführt: 1). Dieses Kit ermöglicht die Betrachtung der gesamten Länge der einzelnen Transkripte in einer Probe, sowohl polyadenylierte (Poly-A) als auch Nicht-Poly-A-mRNA Enden, während viele traditionelle 3'-basierte Expressions-Arrays nur mit Poly-A-Enden arbeiten. 2). Dieses Kit ermöglicht die Synthese von biotinylierten Sense-Strang-DNA-Targets, die durch Hybridisierung ein DNA-DNA-Duplex erzeugen, anstelle von biotinylierter Antisense-RNA (cRNA), was in einem RNA-DNA-Duplex bei der Hybridisierung resultieren würde, wie es in Standardprotokollen für 3'-basierte Expressions-Arrays eingesetzt wird (Eklund et al., 2006). Daher bietet dieses Protokoll eine spezifischere, unvoreingenommenere und maximale Abdeckung des Transkriptoms in der Stichprobe. Ein Satz von Poly-A-RNA Kontrollen wurde als exogen positive Kontrolle zur Überwachung des gesamten Prozesses der Target Vorbereitung verwendet.

Die Einzel-Strang-cDNA wurde aus 100 ng Gesamt-RNA synthetisiert. Darauf folgte die Synthese des komplementären zweiten cDNA Strangs durch DNA-Polymerase in Gegenwart von RNase H (Abb. 2). Die Doppelstrang-cDNA wurde in-vitro transkribiert für die Synthese der Antisense-RNA (cRNA). Nach einer Aufreinigung mittels Bead-Technologie wurde die cRNA in die Sense-strand-cDNA (ss-cDNA) umgewandelt. Die gereinigte ss-cDNA wurde fragmentiert, gefolgt von der Markierung mit Biotin. Dann wurden die biotinylierten Microarray-Target-Sonden hybridisiert, gewaschen und gefärbt unter Verwendung des GeneChip® Hybridisierungs-, Wasch- und Färbe-Kit (Affymetrix, Inc.). Etwa 130 µl der fragmentierten und markierten ss-cDNA-Präparation wurden auf die Transkript-Microarrays (GeneChip® porcine Gene 1.0 ST Array von 81/4 Format) gegeben und für 16 h bei 45°C

und 60 U/min hybridisiert. Die Hybridisierung und das Scannen erfolgte in der Affymetrix Array Processing Unit am Life and Brain Center, Institut für Humangenetik, Universität Bonn. Die Array Signale wurden dann mit der Affymetrix GeneChip Command Console™ (AGCC) Software verarbeitet um sogenannte Spots zu erzeugen, um die ID-Dateien zu integrieren und die generierten Daten einschließlich der Spot-Intensität zu exportieren.

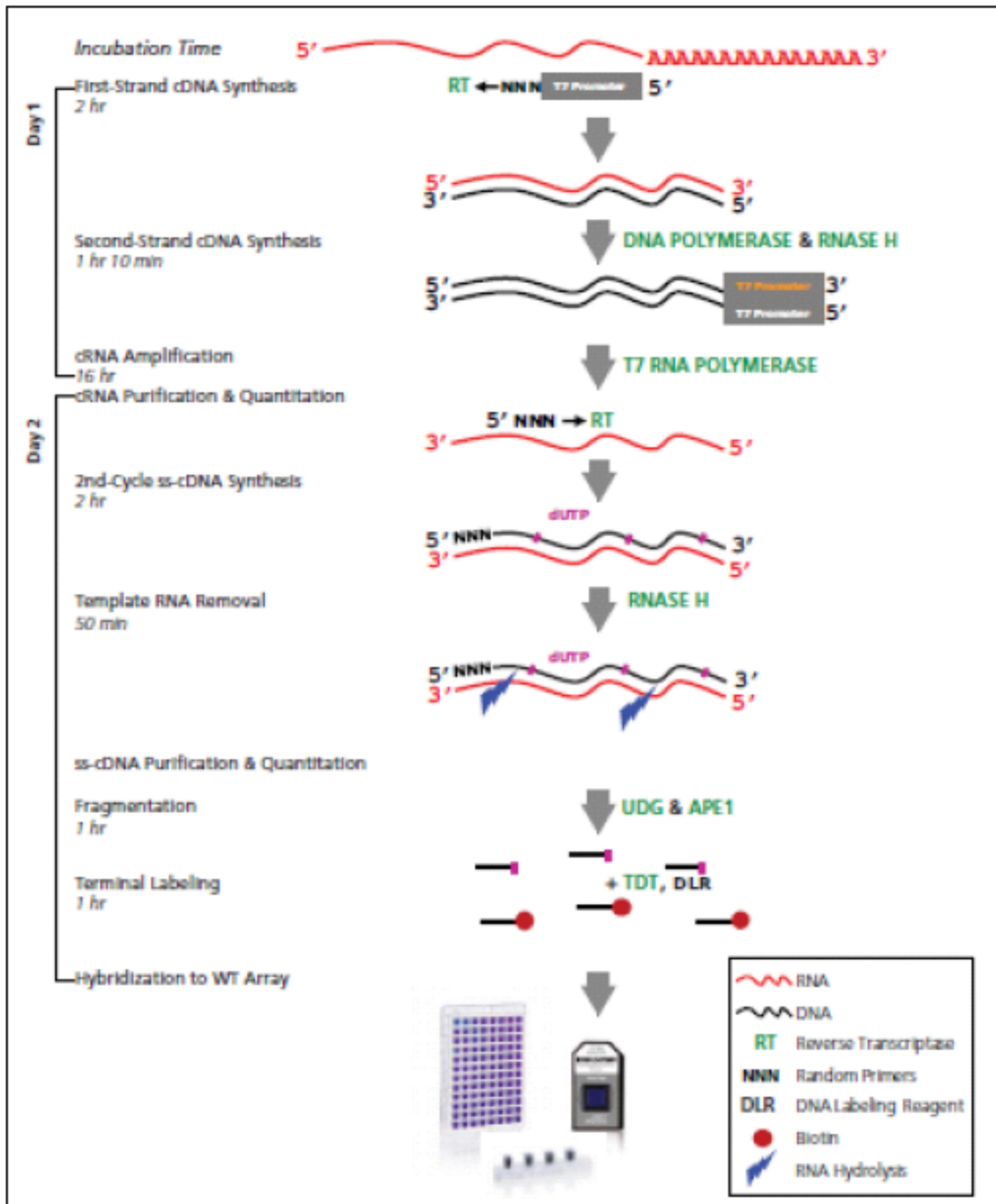


Abbildung 2 Übersicht über die Präparation und das Markieren der mRNA Microarrays

2.2.5 Erstellung eines Microarray basiertem globalen miRNA Expressionsprofils in PBMCs

Für das globale microRNA Expressionsprofiling, wurde das FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (P/N 901910, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für die Synthese der markierten Mikroarray-Target-Sonden verwendet (Abb. 3). Ein ELOSA-Test wurde durchgeführt, um die Markierungseffizienz zu bewerten. Die biotinylierte Gesamt-RNA wurde dann für 16 h unter Verwendung der Affymetrix GeneChip miRNA Array v. 4.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, U.S.) hybridisiert. Dann wurden die hybridisierten Array-Chips gewaschen und gefärbt mittels des Affymetrix GeneChip Hybridisierungs- Wasch- und Färbe-Kit, gefolgt vom Scannen mit dem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, U.S.).

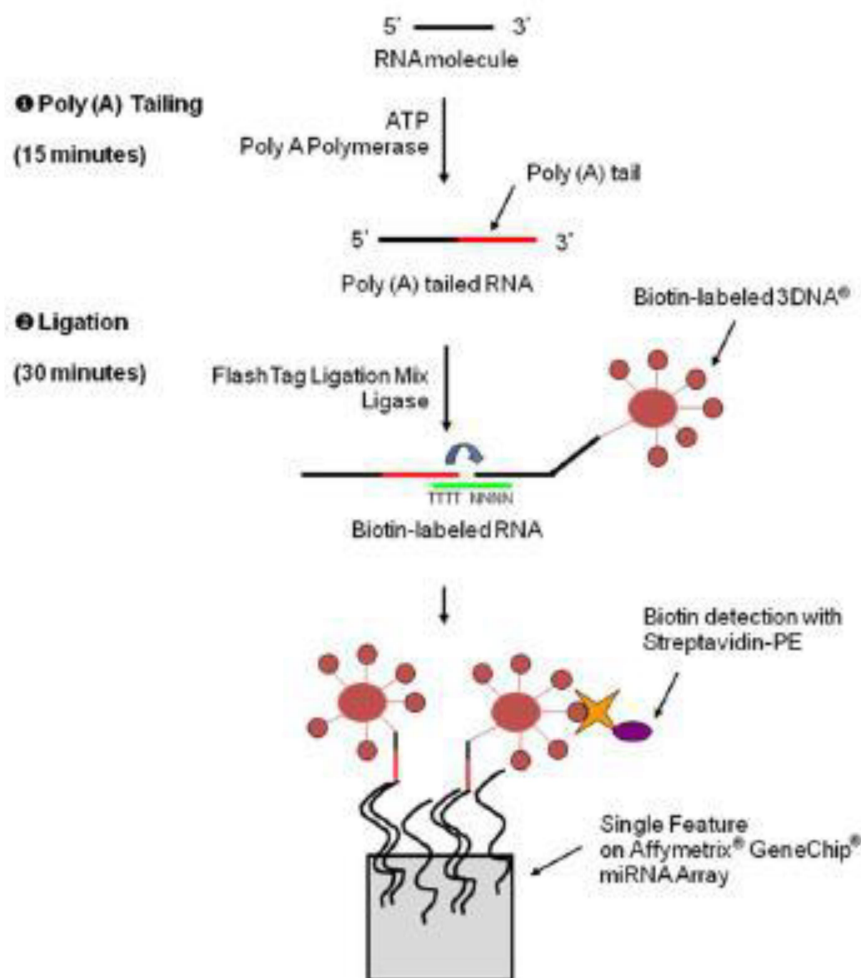


Abbildung 3 Übersicht über die Präparation und das Markieren der miRNA Microarray

2.2.6 Validierung der Microarray Ergebnisse mittels qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) gilt als eine sensitive Methode zur technischen Validierung von Expressionsänderungen, die in Mikroarray beobachtet wurden (Chuaqui et al. 2002). Daher wurden die Ergebnisse aus den aktuellen Mikroarrays für mRNA durch qRT-PCR mit ausgewählten Genen und in den gleichen RNA-Proben validiert. Zur Validierung der mRNA-Expression wurde die gesamte RNA in cDNA unter Verwendung eines erst Strang-cDNA-Synthesekits (P/N K1612, Thermo Scientific, Co.) synthetisiert. Für die qRT-PCR-Reaktion wurden 1,0 µl cDNA, 8,0 µl deionisiertes RNase-freies Wasser, 0,5 µl forward and revers Primer und 10 µl iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad laboratories GmbH, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt und mittels des StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Die thermischen Zyklusbedingungen waren 95°C für 3 min, 95°C für 15 sek, 6°C für 45 sek (40 Zyklen); 95°C für 15 sek, 62°C für 1 min, 95°C für 15 sek. Alle Reaktionen wurden im Doppelansatz bestimmt und der Mittelwert wurde als Expressionswert verwendet. Die genspezifische Expression ergab sich aus dem Verhältnis zum geometrischen Mittel der Expression von zwei Housekeeping Genen (GAPDH und ACTB). Der Vergleichszyklusschwelle (ΔCt) [$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{housekeeping\ Gene}$] wurden als Differenz zwischen Zielgenen und Referenzgenen berechnet und die Expression wurde als $2^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001) bestimmt. Die Korrelation zwischen Microarray und qRT-PCR Ergebnisse wurden durch den Spearman's Rho-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

2.3 Statistische Analyse der Microarray Daten

Die Normalisierung und die statistischen Analysen sowohl der mRNA- als auch der miRNA-Expressionsdaten erfolgte mit Paketen von der Bioconductor-Plattform die in die R-Projekt-Software (v. 3.1.2) implementiert wurden (Gentleman et al. 2004).

2.3.1 Normalisierung, Hintergrundkorrektur, Filterung und Zusammenfügung

Die RMA (Robust Multi-Array Average) basierte Quantilnormalisierung sowohl der mRNA als auch der miRNA-Array-Daten erfolgte unter Verwendung des "Oligo"-Pakets (Carvalho und Irizarry 2010) in der R Software. Für die Qualitätskontrolle wurden einige Diagnoseplots der Rohdatenintensität vor und nach der Normalisierung überprüft. Nach der Normalisierung, wurden verschiedene interne Kontrollsonden des Chips herausgefiltert. Zusätzlich wurde die Interquartilbereich (IQR) -basierte Filterung (Varianz-Cut Off Wert 0,25) angewendet, um die Heterogenität der Expression über die Proben zu reduzieren. Die Sonde zur Gen-Transkript-Annotation wurde mit der aktuellsten Affymetrix-Annotationsdatei für das zugeordnete Array durchgeführt (Liu et al., 2003).

2.3.2 Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Gene (DEGs)

Das Hauptziel der Analyse der globalen Genexpressionsdaten ist die Identifizierung von Genen, deren Expressionsmuster sich je nach Phänotyp oder experimentellen Design unterscheidet. Der statistische Ansatz, um diese quantitativen Veränderungen im Genexpressionsniveaus zwischen experimentellen Gruppen zu entdecken wird als Differential-Expressionsanalyse beschrieben. Die Differential-Expressionsanalyse wurde unter Verwendung der linearen Analyse der Mikroarray-Technik mit dem 'Limma' Paket (Smyth 2005) mit empirischen Bayes Anpassung an die Varianz, gefolgt von einer Benjamini und Hochberg (BH) Korrektur für multiple Tests (Benjamini und Hochberg 1995) durchgeführt. Die Schwellenwerte der False Discovery Rate (FDR) und der log₂-Fold-Change (FC) wurden auf der Grundlage von Datensatz- und Kontrastpaaren zur Bestimmung der Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene festgelegt. Die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene in jedem Kontrastpaar und deren Wechselwirkung wurden in ein überschneidendes Venn-Diagramm exportiert.

2.3.3 Alternative Splicing Analyse

Über die verwendeten Mikroarray-Chip, die für die mRNA-Expression verwendet wurden, können Exon Information generiert werden. Dieser Vorteil wurde genutzt, um die alternativen Spleißereignisse mit dem 'Limma' Paket (Smyth 2005) zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden die RMA-normalisierten Daten für die nachgeschaltete Analyse verwendet.

2.3.4 Bioinformatische Auswertung der Microarraydaten

Gefolgt von statistischen Analysen, erfolgte mit der Liste der interessanten Transkripte (differenziell exprimierte (DE) mRNA und miRNAs) mehrere funktionelle in-Silico Analysen unter Verwendung von mehreren frei verfügbaren bioinformatischen Online-Tools für die Synthese einer sinnvollen biologischen Interpretationen.

2.3.4.1 Gen Set Enrichment Analyse

Die Gen Set Enrichment Analyse (GSEA) ist eine Berechnungsmethode, die bestimmt, ob ein priori definierter Satz von Genen übereinstimmende Unterschiede zwischen zwei biologischen Zuständen (z.B. Phänotypen) eine statistische Signifikanz zeigen. Die aktuelle Studie erzeugte globale mRNA-, und miRNA-Profile von PBMCs aus geimpften Deutsche Landrasse und Piétrain Schweinen im Vergleich mit altersangepassten, nicht geimpften Schweinen. Der GSEA-Algorithmus wurde zur Charakterisierung der Phänotyp-Gruppen eingesetzt (d.h. geimpft und nicht geimpft) durch den genomweiten Vergleich von PBMC Transkriptionsprofile. In der GSEA Analyse werden zunächst alle Gene basierend auf ihrer Korrelation (positiv oder negativ) ihrer Expression mit einem von den zwei Phänotypen getestet, dann wird nach einer signifikanten Überrepräsentation von vordefinierten Gensets

(Pfade) mit der Gen-Liste gesucht (Subramanian et al., 2005). Auf diese Weise konzentriert sich die GSEA auf die Identifizierung von Signalwege nicht auf die einzelnen Gene, die sich zwischen zwei phänotypischen Gruppen unterschiedlich ausdrücken. Das GSEA nutzte hier den Vorteil, biologische Informationen über gut charakterisiert Signalwege aus der Literatur zur Analyse heranzuziehen (Cantu et al. 2013). Weiterhin, nutzt die Software die maximalen Informationen über den Datensatz unter Berücksichtigung der Wirkung von Co-exprimierten Genen und Gene mit niedrigen Expressionsunterschieden zwischen den Kontrastgruppen (Abatangelo et al. 2009). Für diese Analyse wurden die normalisierten und gefilterten Expressionswerte aller exprimierten Gene von PBMCs verwendet, um die Transkriptomantwort zwischen geimpft und nicht geimpften Phänotypen zu differenzieren. Der Immunologic Signature Katalog für Gensets der Molekular Signatures Datenbank (C7:MSigDB v 5.0, Broad Insitute, Cambridge, MA) wurde zum Scannen der Genliste eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde definiert einer $FDR < 0,05$ und ein Normalisierter Enrichment Score (NES) $< 0,05$.

2.3.4.2 Gen Ontologie und Signalweg Analyse

Für eine umfassende biologische Interpretation der Daten, wurde mittels InnateDB-Signalweg Analyse Tool die Gen-Ontologie (GO) Kategorien und biologischen Signalwege identifiziert (Breuer et al. 2013). Die InnateDB ist eine öffentlich verfügbare Datenbank von Genen und Proteinen aus experimentell verifizierten Wechselwirkungen und Signalwegen, die an der angeborenen Immunantwort für die Organismen Mensch, Maus und Rind, beteiligt sind. Die Annotation der unterschiedlich exprimierten Gene aus den Mikroarray-Daten zu ihren Humanen Ensembl-Orthologen erfolgte unter Verwendung des BioDBnet-Tool (<http://biodbnet.abcc.ncifcrf.gov/>). Die annotierten Gene wurden dann in die InnateDB hochgeladen und eine Analyse zur Identifizierung der GOs und Signalwege erfolgte mit der Implementierung des hypergeometrischen Algorithmus und des BH multiple Testkorrekturverfahrens. Die GO und die Signalwege wurden als signifikant betrachtet, wenn sie einen $FDR < 0,05$ hatten.

2.3.4.3 Transkriptionsfaktor Bindungsanalyse

Transkriptionsfaktoren (TFs) sind potentielle Regulatoren der Genexpression. Beim Säugetierengenom, sind Gene in der Regel in einem „Aus“-Zustand und TFs dienen hauptsächlich dazu, um die Genexpression anzuschalten. Transkriptionsfaktoren binden an eine DNA-Promotorsequenz in der Nähe der Transkriptionsstartstelle und erleichtern die Bildung von Transkriptionsinitiationskomplexen. Daher ist es wichtig zu wissen, ob es irgendwelche Transkriptionsfaktor Bindungsstellen (TFBSs) in interessanten Gene gibt. Zu diesem Zweck wurden die deutlich überrepräsentierten TFBSs in den differentiell exprimierte Gene mit dem InnateDB-Tool untersucht (Breuer et al., 2013). Die TFBSs galten mit einer $FDR < 0,05$ als signifikant überrepräsentiert.

2.3.4.4 Zelltypspezifische Analyse

Die zellulären Subpopulationen von PBMCs haben wahrscheinlich eine eigene individuelle Rolle bei der Entwicklung durch Impfstoff vermittelten Immunantwort. Daher würde die Fähigkeit, die Verteilung der zellulären Demographie aus der globalen Genexpression zu differenzieren, das Verständnis verbessern welche Subtypen von PBMCs an der Impfstoff-induzierten differentiellen Genexpression beteiligt sind. Dafür wurden die differentiell exprimierten Gene mit dem CTen Webportal analysiert. Das CTen (Zelltyp Enrichment) ist ein Online-Bioinformatik-Tool zur Identifizierung von angereicherten Zelltypen in heterogenen Mikroarray-Daten (Shoemaker et al., 2012). Dieses Werkzeug implementiert eine hoch ausgeprägte, zellspezifische (HECS) Gen-Datenbank, die 10.058 Gene des Menschen und der Maus umfasst. Für diese Analyse wurden die humanen orthologen Symbole der unterschiedlich exprimierten Gene hochgeladen und mit der humanen HECS-Datenbank verglichen. Die Signifikanz der Zellanreicherung wurde mit einem einseitigen Fisher-Exakt-Test bestimmt und die P-Werte wurden mit der BH-Methode über alle Zelltypen hinweg angepasst. Der Enrichment Score wurde als $-\log_{10}$ des BH-angepassten P-Wertes geschätzt und erzeugte die farblichen Abbildungen mit den passenden Werten.

2.3.4.5 Netzwerkanalyse

Die Genexpression ist ein gut koordiniertes System, bei dem die Expressionsmessung von bestimmten Genen nicht vollständig autark in einem in-vivo Setup ist. Wie bei anderen quantitativen Merkmale, ist die Immunreaktion durch viele Gene geregelt, die miteinander durch eine Wechselwirkung in Netzwerken interagieren. Die potenziellen regulatorischen Gene des Netzwerks fördern oder hemmen die Expression von anderen verbindenden Genen zur Aufrechterhaltung der biologischen Funktionen (Macneil und Walhout 2011). Daher werden Netzwerk-basierte Ansätze als sinnvoll betrachtet, um mittels einer Signalweg/Gen-basierte linearen Modellierung regulatorische Moleküle für Transkriptomänderungen zu finden. Zur Visualisierung des PRRSV-Impfstoff-induzierten Transkriptionsnetzes sowie zur Identifizierung der regulatorischen Gene, erfolgte die Netzwerk-Analyse mit dem NetworkAnalyst Online-Tool (Xia et al., 2014). Dieses Tool verwendet die humane InnateDB (heruntergeladen am 20. Juni 2014) und die Protein-Protein-Interaktion (PPI) Datensätze, bestehend aus 14.755 Proteinen und 145.955 experimentell validierte Wechselwirkungen. NetworkAnalyst implementiert das R-Paket 'Igraph' für die Netzwerkanalyse und 'Gephi Toolkit' für die Fertigstellung des Netzwerklayouts. Die humane orthologe Genliste der unterschiedlich exprimierten Gene wurde in das NetworkAnalyst Programm hochgeladen und das interagierende Netzwerk wurde konstruiert. Für die Erkennung hochvernetzter Hauptgene des Netzwerks wurden zwei topologische Maßeinheiten wie Grad und Verknüpfung berücksichtigt. Schließlich wurde eine gewichtete netzwerk-basierte Modulerkennung

durchgeführt, um die Gene ähnlicher biologischer Funktionen zu gruppieren. Der P-Wert eines gegebenen Netzwerkmoduls wurde mit einem Wilcoxon-Rangsummetest der "internen" und "externen" Grade berechnet. Die funktionale Anreicherung von Modulen wurde mit der REACTOME.db-Signalweg Software durchgeführt.

2.3.4.6 Analyse auf unterschiedlich exprimierte miRNAs

Um die differentiell exprimierten miRNAs zu identifizieren, wurden die normalisierten Transkripte unter Verwendung der linearen Analyse der Mikroarraytechnik aus dem Paket 'limma' (Smyth 2005) mit einer empirischen Bayes Anpassung an die Varianz, gefolgt von einer BH Korrektur für multiple Tests analysiert. Die Grenzwerte der FDR und des FC wurden auf der Grundlage des Datensatzes und der Kontrastpaare zur Bestimmung der Anzahl der DE microRNAs festgelegt. Die Anzahl der DE miRNAs aus jedem Kontrastpaar und ihre Wechselwirkung wurden in einem überschneidenden Venn-Diagramm dargestellt.

2.3.4.7 In Silico Bestimmung von Zielgenen der differenziell exprimierten miRNAs

Die Untersuchung der Veränderung von miRNA-Profilen ist entscheidend für das Verständnis der Genetik von immunologischen Prozessen. MikroRNAs sind jedoch nicht direkt an phänotypischen Veränderungen beteiligt, regeln jedoch die Genexpression auf posttranskriptionellem Niveau. MicroRNAs arbeiten durch Erkennung komplementärer Sequenz-Zielelemente, gefolgt von entweder Hemmung oder Induzierung von der mRNA Translation (Bartel 2004). Daher sind die vorhergesagten mRNA-Targets der interessanten miRNAs für biologische Prozesse erforderlich. Zu diesem Zweck wurde eine In-Silico miRNA Zielvorhersagestudie durchgeführt. Die beiden TargetScan v. 7.1 (Bartel 2004) und miRDB v. 5.0 (Nathan und Wang 2015) Online-Tools wurden verwendet, um die Zielgen-Kandidaten auf der Grundlage der Komplementarität zur miRNA Zielsequenz (Position 2-8 des miRNA-5'-Endes) der Zielbindungsstelle auf dem 5'-UTR, 3'-UTR und Proteinkodierende Region der Schweine-mRNA-Sequenzen (*Sus scrofa* 10.2) vorherzusagen (Lewis et al. 2005). Der miRDB Server nutzt die miRNAs Quelle von der miRBase v. 21 Datenbank und implementiert den MirTarget-Vorhersage-Algorithmus. Die kombinierte Liste der vorhergesagten mRNA-Targets aus beiden Werkzeugen wurde weiter verarbeitet.

2.3.4.8 Integrierte mRNA-miRNA Netzwerkanalyse

Ein mRNA-miRNA-Interaktom-Netzwerk wurden für die PRRSV-Impfstoff-Antwort in PBMCs konstruiert, wie zuvor beschrieben mit kleineren Modifikationen (Coll et al., 2015). Zuerst wurde die Liste der vorhergesagten Zielgene (siehe oben), die für die unterschiedlich exprimierten miRNA gescannt wurden, verfeinert. Um dies zu erreichen, wurden die DEGs, die aus den vorherigen mikroarraybasierten mRNA-Expressionsdaten identifiziert wurden, mit den DE miRNAs verknüpft. Die überlappenden Ergebnisse der vorhergesagten mRNA-

Targets und der unterschiedlich exprimierten Gene in PBMCs wurden als echte differentiell exprimierte Zielgene der unterschiedlich exprimierten miRNAs extrahiert. In einer zweiten Phase des Integrationsverfahrens wurden diese mRNA-miRNA-Zielpaare identifiziert, die eine negative Korrelation zwischen miRNA und mRNAs zeigten. Um dies zu erreichen, wurde eine Pearson-Korrelation der Expression aller möglichen Kombinationen von deregulierten mRNAs gegenüber deregulierten miRNAs berechnet. Es wurde eine multiple Testkorrektur durchgeführt, um die Anzahl der falschen positiven Korrelationen zu reduzieren, und eine endgültige Selektion wurde durch eine $FDR < 0,05$ gesetzt. Schließlich wurden die miRNA-mRNA-Paare mit signifikanter negativer Korrelation ($FDR < 0,05$ und Pearson-Koeffizient < 0) für das funktionelle Co-regulatorische Netzwerk von miRNA-mRNA verwendet. Das miRNA-mRNA-Netzwerk wurde mit dem Cytoscape v. 3.2.1 (Cline et al. 2007) visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 PRRSV spezifische Antikörper Reaktion

Um eine Beeinflussung durch PRRSV maternalen Antikörper auszuschließen und um die körpereigene Immunantwort der Tiere auf das Vaccine zu überprüfen, wurde Plasma von allen Tieren (DL und Pi) von den Zeitpunkten 7 und 28 Tage vor und 42, 56 und 70 Tage nach der Impfung an die Firma Synlab (Labordiagnostik, Leverkusen) geschickt und mittels ELISA ein Antikörperscreening durchgeführt. Der Antikörperlevel im Plasma zeigte, dass die Tiere frei von maternalen Antikörpern zum Startzeitpunkt des Experimentes waren. Die Proben waren alle unter dem von der Firma vorgegebenen Grenzwert, einem ratio (s/p) von 0,4 (40 %) was in Abbildung 4 zu sehen ist. Durch die Ergebnisse konnte beobachtet werden, dass bei säugenden Tieren (Tag 7) der Antikörpertiter noch leicht erhöht war und nach dem Absetzen (Tag 28) fast auf 0 lag und bei den nicht geimpften Tieren auch dort stabil blieb. Bei den geimpften Tieren jedoch konnte bereits nach kurzer Zeit ein Anstieg im Antikörpertiter beobachtet werden, der nach 2 Wochen den Grenzwert überstieg und nach 4 Wochen nach der 1. Impfung ein Plateau erreichte.

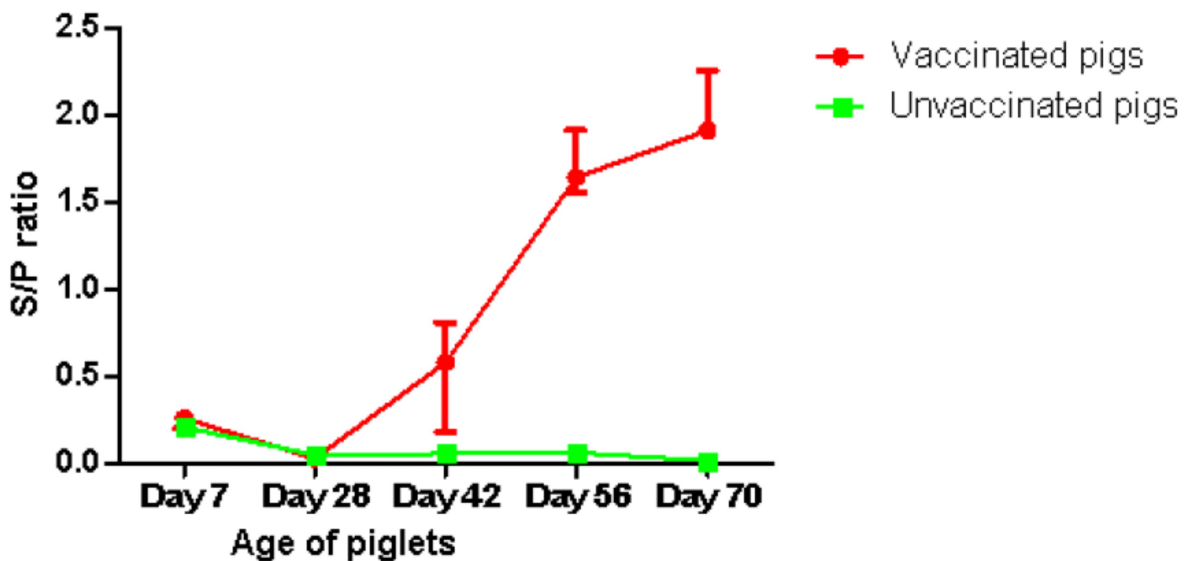


Abbildung 4 Antikörpertiter der geimpften und nicht geimpften Proben von DL Schweinen. Messung mittels ELISA

Dies spiegelt die bisherigen Berichte wider, die besagen, dass PRRSV spezifische Antikörper bereits nach 7-10 Tagen nach der Infektion mit einem niedrigen Virustiter (Loemba et al., 1996) anfangen, gefolgt von einer verzögerten Produktion von neutralisierenden Antikörpern (NAb) zwischen 2 und 4 Wochen nach der Infektion (Loemba et al., 1996). Neben NAb haben Komponenten von angeborenen und zellvermittelten Immunantworten einen wichtigen

Beitrag zur viralen Abwehr bei immunisierten Tieren. Darüber hinaus wird angenommen, dass der Charakter der angeborenen Immunantwort auf Viren die Qualität der nachfolgenden adaptiven Immunantwort diktiert (Miller et al. 2010).

3.2 Transkriptomprofil von PBMCs nach der PRRSV-Impfung

Zur Bestimmung transkriptionaler Modifikationen durch die angeborene Immunantwort auf einen PRRSV lebend-Impfstoff, wurde ein globales Transkriptomprofil von PBMCs von Schweinen kurz vor der Impfung (Kontrolle) und 6, 24 und 72 h nach der Impfung, sowie in einer nicht geimpften Gruppe zu den gleichen Zeitpunkten, erstellt. Dafür kamen die GeneChips Porcine Gene 1.0 ST Array von Affymetrix zum Einsatz. Diese Arrays codieren 394.580 Probes (20-22 Probes pro Gen) was insgesamt 19.212 Genen entspricht. Nach der Normalisierung konnten 27.558 Probes identifiziert werden, die eine höhere Signalintensität aufwiesen wie der Hintergrund. Nach weiteren Filterschritten zeigten, 14.231 Transkripte ein Expressionsniveau in PBMCs. Von diesen konnten 10.217 annotiert und daher in die weiteren Analysen mit einbezogen werden.

3.3 Variationen im PBMC Transkriptomprofil zwischen geimpften und nicht geimpften Schweine

Bei der Gen Set Enrichment Analyse (GSEA) fand ein Vergleich der genomweiten Expressionsunterschiede des impfstoffinduzierten Transkriptom und den altersangepassten nicht geimpften Kontrollschweinen statt. Der GSEA-Algorithmus zeigte, dass insgesamt 42 bzw. 36 Gensets (Signalwege) für den Zeitpunkt 6 und 24 h nach der Impfung im Vergleich zu ihren nicht geimpften Gegenspielern signifikant hochreguliert wurden. Von diesen sind besonders die Chemokin-Signalisierung, die JAK-STAT-Signalisierung und die Zytoskelett-Aktivierung die am stärksten vertretenen Signalwege, die ein Indiz für das Potenzial des Impfstoffs zur Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie in PBMCs zeigen. Dies ist im Einklang mit den Aussagen von Badaoui et al. (2013). Sie entdeckten das die Wirtsspezifische Antwort auf PRRSV mit der Aktivierung von verschiedenen bekannten Signalwegen wie, dem TREM1 Signalweg, der Toll Like Rezeptor und Hyper-Cytokinemia/Hyper-Chemokinemia Signalisierung, assoziiert ist. Der NES der Top-15 hochregulierten Gensets in der geimpften Gruppe reichte von 2,04 bis 2,52 (Tab. 1). Der Enrichment Score der meisten der hochregulierten Gensets in der geimpften Gruppe waren zum Zeitpunkt 24 h im Vergleich zum Zeitpunkt 6 h erhöht, was darauf hinweist, dass die Immunisierung zu Erhöhung der Anzahl von Kerngene in bestimmten Gensets über die Zeit führt.

Tabelle 1 Signifikante Gensets aus der Genset Enrichment Analyse

Gene sets	6h _{hpv_vacc} vs 6h _{hpv_unvacc}		24h _{hpv_vacc} vs 24h _{hpv_unvacc}	
	NES	FDR	NES	FDR
Regulation of actin cytoskeleton	2.51	0.001	2.75	0.001
Chemokine signaling pathway	2.48	0.001	2.56	0.001
JAK-STAT signaling pathway	2.39	0.001	2.55	0.001
Integrin cell surface interactions	2.46	0.001	2.5	0.001
Cell adhesion molecules	2.31	0.001	2.38	0.001
Integrin signaling pathway	2.28	0.001	2.37	0.001
Cell surface interactions at the vascular wall	2.27	0.001	2.33	0.001
Signal transduction by L1	2.24	0.007	2.27	0.007
Cytokine cytokine receptor interaction	2.20	0.008	2.25	0.007
Apoptosis by serum deprivation up	2.17	0.008	2.23	0.007
Immortalized by HPV31 DN	2.16	0.008	2.23	0.008
Signaling by FGFR1 mutants	2.14	0.011	2.21	0.010
TNF signaling up	2.12	0.014	2.19	0.013
ECM receptor interaction	2.10	0.025	2.13	0.021
TRAF trafficking pathway	2.08	0.013	2.12	0.011
Leukocyte transendothelial migration	2.04	0.008	2.14	0.007

NES, Normalized enrichment score; FDR, False discovery rate

3.4 Unterschiedlich exprimierte Gene in PBMCs nach der PRRSV-Impfung

Um die Genvarianz die mit der Immunantwort assoziiert ist zu identifizieren, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei fanden drei Vergleiche Berücksichtigung. Die Zeitpunkte 6, 24 und 72 h nach der Impfung wurden zur Kontrolle (kurz vor der Impfung) verglichen. Im Laufe der Datenauswertung, wurde sich dafür entschieden nur den Zeitpunkt kurz vor der Impfung als Kontrolle einzusetzen. Die Auswertung hat gezeigt, dass die konträren Kontrollen (6 h, 24 h und 27 h ungeimpft) im Zeitverlauf so gut wie keinen Expressionsunterschiede aufwiesen. Lediglich 20 Gene konnten identifiziert werden, die jedoch nicht mit dem Immunsystem assoziiert waren. Auch dies konnte bereits in einer Studie

von Adler et al. (2013a) beobachtet werden. Als Signifikat unterschiedlich exprimiert galten Probe Sets mit einer FDR $< 0,01$ und einem FC $> 1,5$ und $< -1,5$. Nach diesen Kriterien waren 2.453 Transkripte unterschiedlich exprimiert in PBMCs nach einer PRRSV-Impfung. Davon konnten wiederum 1.087 (44,31 %) Gene im Schwein annotiert werden. Die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene, ihre Regulation in den 3 Vergleichen, sind in Abb. 6 dargestellt. Zum Zeitpunkt 6 h nach der Impfung waren insgesamt 542 Gene unterschiedlich exprimiert, davon 423 hoch- und 119 runterreguliert. Die höchste Anzahl an unterschiedlich regulierten Genen zeigte sich zum Zeitpunkt 24 h nach der Impfung mit 2.263 Genen. Davon waren 2.060 hoch- und eine kleine Zahl von 203 runterreguliert. 72 h nach der Impfung waren noch 357 Gene unterschiedlich reguliert, wovon 188 hoch- und 169 runterreguliert waren. Der FC lag dabei bei -3,76 bis 3,94 für Zeitpunkt 6 h, bei -3,7 bis 4,45 für Zeitpunkt 24 h und bei -4,15 bis 3,11 für Zeitpunkt 72 h nach der Impfung. Die hohe Anzahl an hochregulierten Genen zu allen drei Zeitpunkten induziert, dass durch die Impfung eine Aktivierung von Genexpressionsprozessen stattgefunden hat, welche mit der Entwicklung der angeborenen Immunantwort assoziiert sein könnte.

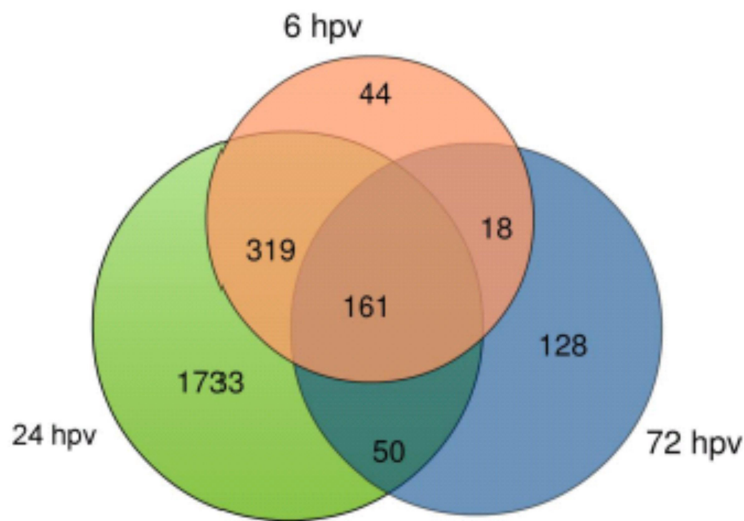


Abbildung 5 Venn-Diagramm der unterschiedlich exprimierten Gene in der Deutschen Landrasse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen mit der Kontrollgruppe

Anhand des Venn-Diagramms (Abb. 5) kann beobachtet werden, dass zum Zeitpunkt 6 h nach Impfung ausschließlich 44, zum Zeitpunkt 24 h nach Impfung 1.733 und zum Zeitpunkt 72 h nach Impfung 128 Gene unterschiedlich exprimiert waren. Von diesen Zeitpunktspezifischen Genen waren 32, 1.404 und 88 hochreguliert und 12, 329 und 30 runterreguliert in den Zeitpunkten 6, 24 und 72 h nach der Impfung. Des Weiteren, stimmten 161 Gene über alle drei Zeitpunkte überein. Zwischen dem Zeitpunkt 6 h und 24 h nach der Impfung waren 480

gemeinsame Gene exprimiert. Zwischen Zeitpunkt 24 h und 72 h waren 211 Gene und zwischen Zeitpunkt 6 h und 72 h nach der Impfung 179 Gene identisch.

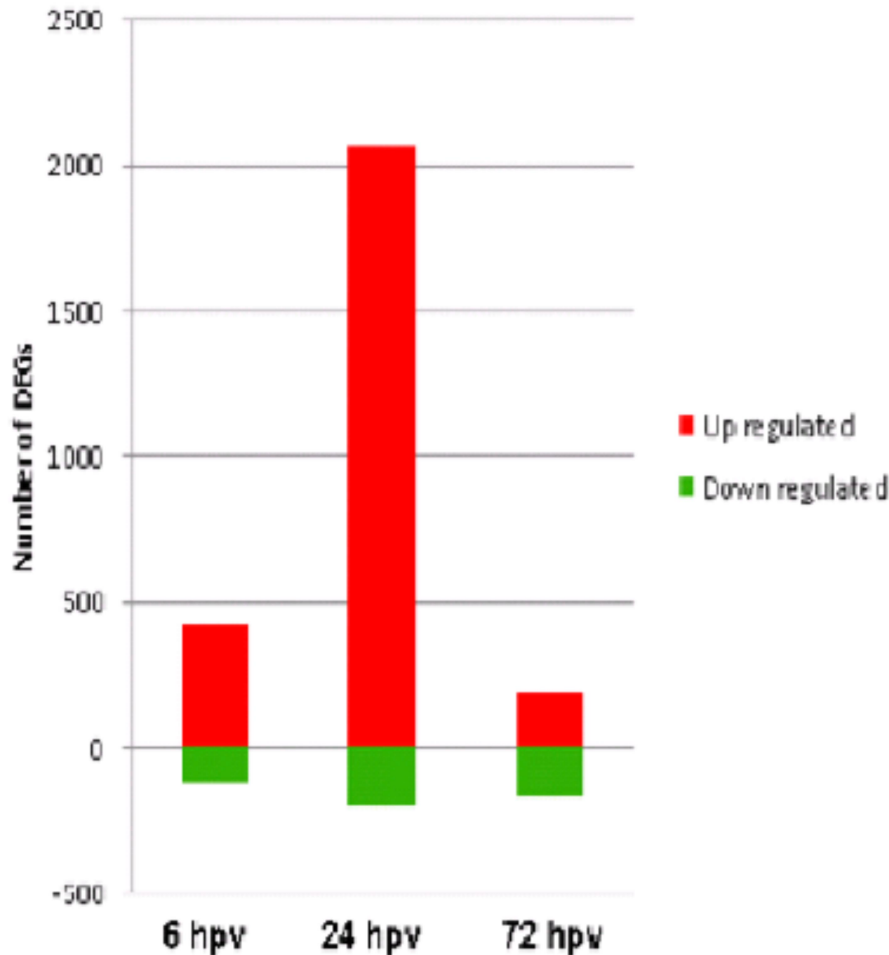


Abbildung 6 Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene nach der PRRSV Impfung. Grün repräsentiert die Anzahl der runterregulierten Gene und rot die Anzahl der hochregulierten Gene

Ein hierarchisches Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene in den PBMCs zeigt die Konstanz in der Expression in den unterschiedlichen Proben (Abb. 7). Es ist eine klare Abgrenzung innerhalb der Zeitpunkte im Hinblick auf die unterschiedlich exprimierten Gene zu beobachten. Ein beeindruckender Unterschied ist gerade zum Zeitpunkt 24 h nach der Impfung zu sehen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Anhand des Clusters ist die sehr gute Wiederholbarkeit in den Tieren klar zu erkennen, was eine Voraussetzung für eine signifikante Interpretation ist.

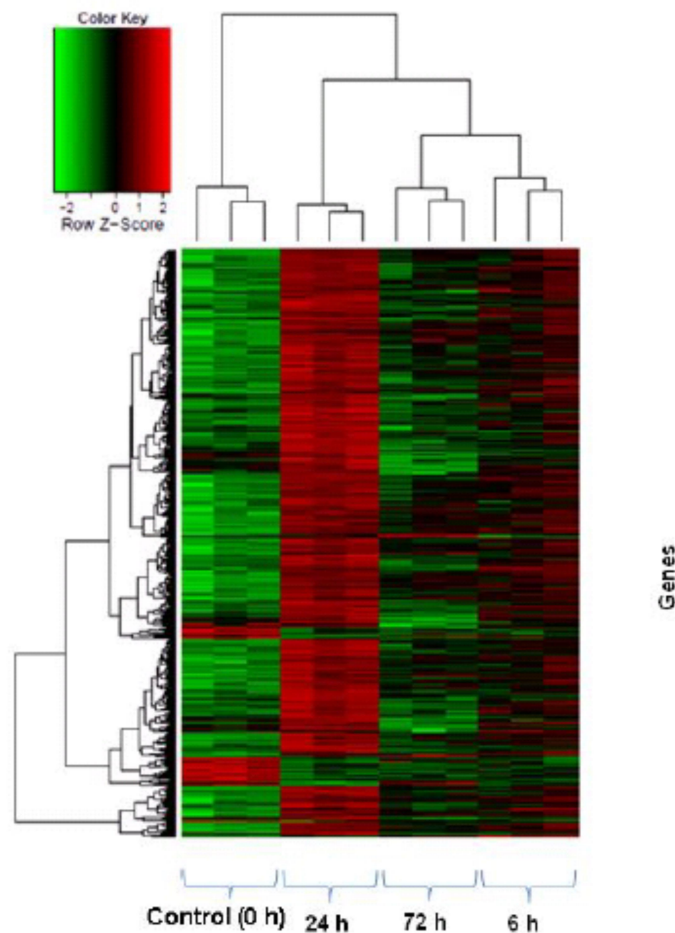


Abbildung 7 Hierarchisches Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene über die Zeitpunkte hinweg

Diese hohe Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen und das es sich bei vielen Genen um bekannte Immungene handelt, berichteten auch bereits andere Autoren (Xiao et al. 2010a, Xiao et al. 2010b, Zhou et al. 2011). So berichteten Xiao et al. (2010b) von 4.520 unterschiedlich exprimierten Genen in Schweinelungen nach 96 h und 168 h in-vivo Infektion mit PRRSV.

3.5 GO- und Signalweganalyse mit unterschiedlich exprimierte Genen nach einer PRRSV Impfung

Eine GO Klassifizierung von biologischen Prozessen die sich aus allen unterschiedlich exprimierten Genen in PBMCs nach einer PRRSV-Impfung ergeben sind in Tab. 2 dargestellt. GO Kategorien mit einen direkten Bezug zur Immunantwort sind: die angeborene Immunantwort, Signalweiterleitung, Virale Prozesse, T-Zellen Differenzierung, Chemotaxis, Zytokin Signalweg, Komplementaktivierung, Zelltod, Zellproliferation und Prozesse des Immunsystems. Die größte Anzahl an Genen die in den biologischen Prozessen involviert sind stammen aus dem Zeitpunkt 24 h nach der Impfung im Vergleich zu 6 und 72 h. Die

Signalweg Analyse zeigt ein identisches Bild. Die statistisch signifikanten biologischen Signalwege in denen die unterschiedlich exprimierten Gene involviert sind, sind in Abb. 8 dargestellt. Die Top Signalwege waren, Zytokin-Zytokin Rezeptor Interaktion, der Chemokine Signalweg, die Signalwegweiterleitung, der JAK-STAT Signalweg und Regulation, TRAF6 induziert durch NF-kB und MAPK, die NLRP3 Inflammasome, Endocytose und der Interferon Signalweg. Es ist bekannt, dass diese Signalwege in den Prozess der Wirtszellenerfassung des viralen Antigens und die anschließende Induktion der angeborenen Immunantwort involviert sind. Eine angeborene Immunität gegen virale Antigene wird nach der Erkennung von viralen PAMPs durch die spezifischen zellzytoplasmatischen PRRs der Zelle wie TLR3, TLR7, TLR8 initiiert. Die Erkennung von viralen PAMPs (ssRNA für PRRSV) durch die TLRs der Wirtszelle führt zu einer Kaskade von intrazelluläre Signalisierung durch verschiedene Adaptormoleküle (z.B. MyD88, MDA5, TRAF6), gefolgt von der Aktivierung der MAP-Kinase-Familie, die wiederum Transkriptionsfaktoren wie Interferon-regulatorische Faktoren (IRFs) und NF-kB einschalten. Unter der IRF-Genfamilie waren IRF2, IRF2BPL, IRF5 und IRF7 hochreguliert, und IRF3 war nach der Impfung in PBMCs runterreguliert. Es ist bekannt, dass die Mitglieder der IRF-Familie wie IRF3, ISGF3, ISG15, IKK α , STAT1/STAT2 an immunsuppressiven Wirkungen von PRRSV-infizierten Zellen beteiligt sind (Patel et al., 2010, Yoo et al., 2010). Das NF-kB induziert mehrere nachgeschaltete Signalisierungen, die zur Aufwärtsregulation von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ-I-Interferon führen, was wiederum den entzündlichen Prozess, die Apoptose und die Phagozytose erleichtert (Hansen et al., 2011).

Tabelle 2 Gen Ontologische Einteilung der unterschiedlich exprimierten Gene

Time points	GO ID	GO term	Nr. of genes	Adjusted p-value
6 hpv	GO:0045087	Innate immune response	18	0.01
	GO:0042493	Response to drug	9	0.05
	GO:0034097	Response to cytokine	5	0.02
	GO:0016567	Protein ubiquitination	8	0.01
	GO:0043687	Post-translational protein modification	7	0.01
	GO:0044281	Small molecules metabolic process	30	0.01
	GO:0015031	Protein transport	10	0.03
	GO:0006355	Regulation of transcription, DNA-template	28	0.03
	GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	15	0.03
	GO:0044267	Cellular protein metabolic process	14	0.03
24 hpv	GO:0045087	Innate immune response	90	0.01
	GO:0007165	Signal transduction	82	0.01
	GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	45	0.02
	GO:0016032	Viral process	37	0.01
	GO:0051607	Defense response to virus	14	0.02
	GO:0043406	Positive regulation of MAPK kinase activity	9	0.05
	GO:0006874	cellular calcium ion homeostasis	11	0.08
	GO:0007265	Ras protein signal transduction	8	0.02
	GO:0030217	T cell differentiation	5	0.05
	GO:0035666	TRIF-dependent toll-like receptor signaling	8	0.05
72 hpv	GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	7	0.04
	GO:0007067	Mitotic nuclear division	6	0.04
	GO:0019221	Cytokine-mediated signaling pathway	5	0.03
	GO:0006935	Chemotaxis	4	0.04
	GO:0007155	Cell adhesion	7	0.05
	GO:0051726	Regulation of cell cycle	9	0.05
	GO:0055085	Transmembrane transport	14	0.03
	GO:0010467	Gene expression	6	0.05
	GO:0006915	Apoptotic process	8	0.04
	GO:0009615	Response to virus	5	0.14

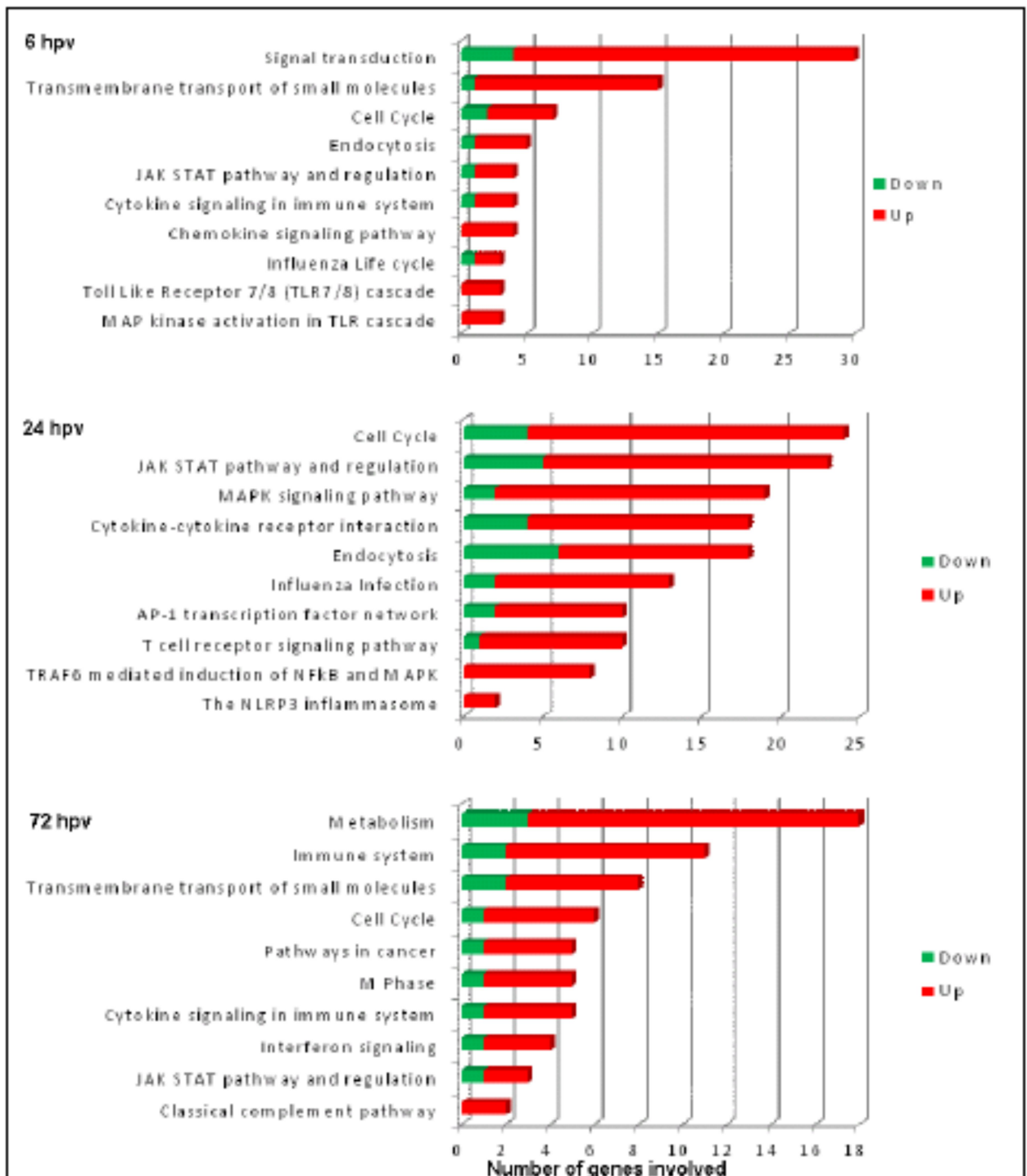


Abbildung 8 Biologische Signalwege der unterschiedlich exprimierten Gene nach der PRRSV-Impfung. In der Abbildung sind die Top 10 Signalwege mit der Anzahl der involvierten Gene und ihrer Regulation (grün/rot) zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 72 h nach der Impfung dargestellt

3.6 Transkriptionale Netzwerke von PRRSV-Impfung induzierten Gene der angeborene Immunantwort in PBMCs

Die Netzwerkanalyse ergab ein großes globales Netzwerk (Abb. 9) und 12 weitere kleinere Netzwerke. Das globale Netzwerk beinhaltet 432 Knotenpunkte (sogenannte Seed Genen oder Nodes) und 850 Verbindungen (Edges oder Connections). Jeder Knotenpunkt entspricht einem Gen. Der Durchmesser jedes Knotenpunktes entspricht dem Wert aus zwei zentralen Messwerten (Grad und Abstand), daher spricht ein hoher Durchmesser für ein hohes Potenzial in dem Netzwerk und gilt als sogenanntes Hauptgen. Basierend auf den beiden Messwerten konnte APP (Amyloid beta (A4) precursor Protein) als Top Hauptgen im globalen Netzwerk, mit einem Grad von 118 und einer Verbindungsstärke von 6.468, identifiziert werden. Weitere Hauptgene sind TRAF6 (TNF Receptor Faktor 6), PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1), FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), CTNNB1 (Catenin (cadherin-associated protein) beta 1), CDKN1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21, Cip1)-A), TNFAIP3 (Tumor necrosis Factor, alpha-induced Protein 3), SIRT1 (Sirtuin 1), ESR 1 (Estrogen Receptor 1) und HDAC5 (Histone deacetylase 5). Von einigen dieser Gene wurde bereits über ihre Funktion im Bereich der Immunantwort berichtet. So z.B. das APP Gen. Dieses Gen ist ein Protein codierendes Gen, welches die Sekretion von einigen Peptiden veranlasst, so auch von zwei Peptiden mit antibakterieller und antifungaler Wirkung (Papareddy et al. 2012). Ein weiteres Hauptgen ist das TRAF6, mit der Funktion als Adapter Molekül für TLRs (TLR7/8) und induziert damit die Signaltransduktion für die Expression von IFNs (Seth et al. 2006).

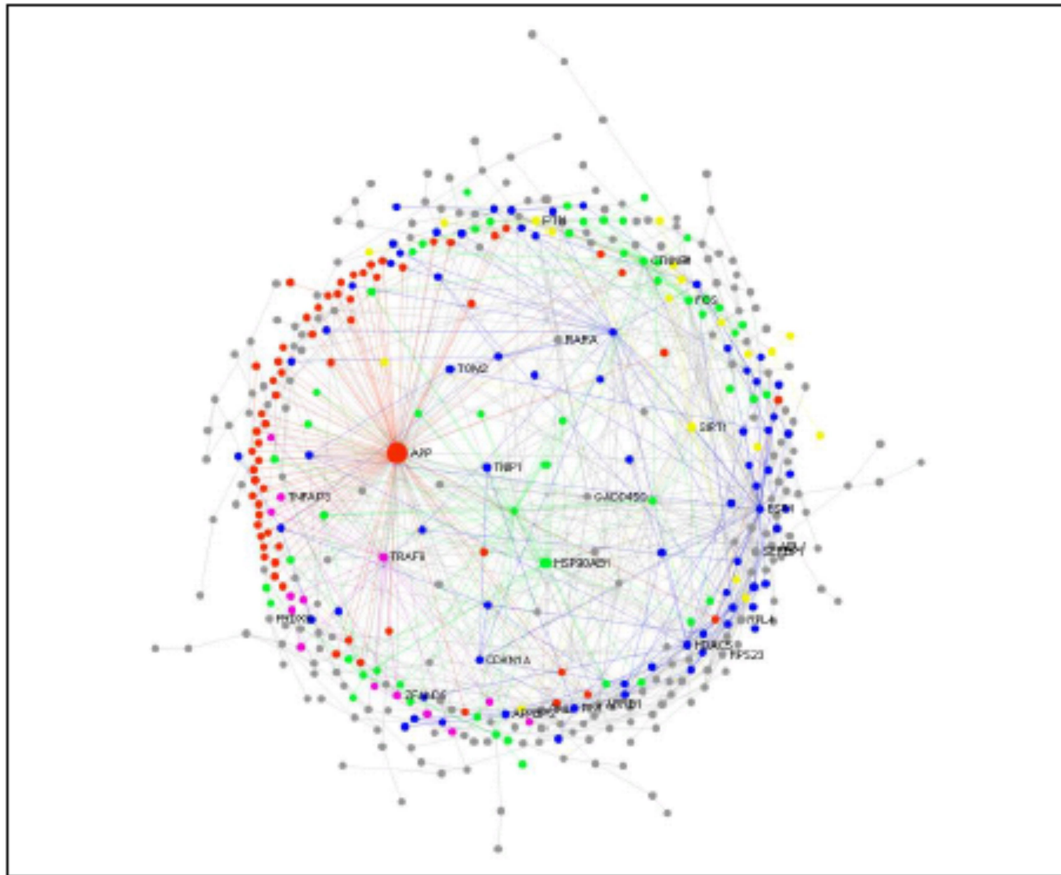


Abbildung 9 Globales Transkriptomnetzwerk der PRRSV Impfreaktion in PBMCs. Hier dargestellt das Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt 24 h nach Impfung. Jeder Kreis symbolisiert ein Gen. Je größer der Durchmesser desto vernetzter das Gen. Die Farben stehen für unterschiedliche Module mit unterschiedlicher biologischer Funktion

Das NetzwerkAnalyst Tool detektierte 5 signifikante ($p < 0,01$) Netzwerk Module innerhalb des globalen Netzwerks, die mit unterschiedlichen Farben in Abb. 9 dargestellt sind. Jedes Modul wird geleitet durch ein oder mehrere Hauptgene mit Verbindung zu mehreren anderen Genen identischer biologischer Funktion. Die 5 Module wurden in ihrer biologischen Funktion der angeborenen Immunantwort, der Entwicklung und Differenzierung von Blutzellen, dem Zelltod, Zellzyklus und Überleben, Ubiquitination und Glycosylation, Protein Metabolismus und Regulation von Genexpression, zugeteilt. Besonders die funktionelle Bereiche des Moduls (rotes Modul) um das Hauptgen APP beinhaltet Gene für den Membrantransport (RAB5C, ARRB1, SEC24C, TBC1D1), die Chemokine Rezeptor Bindung (CXCR2, CXCL16), die Interferon Signalisierung (IFNA8, IFNW1), die posttranslationale Protein Modifikation (PIGO, GALNT12, MPI, SEC24C) und die Asparagin N-linkage Glykosylation (MPI, SEC24C).

Um zu überprüfen, ob die Hauptgene auch das globale Netzwerk koordinieren können, wurde ein zweites Netzwerk aus den 13 Hauptgenen erstellt. Die Interaktion der Hauptgene zeigte eine Verbindung mit 3.764 weiteren Genen mit 5.145 Interaktionen. Eine vereinfachte Form der Interaktion der 13 Hauptgene ist in Abb. 10 dargestellt. Die Analyse spiegelt die Interaktion des globalen Netzwerkes wieder. Von diesen Hauptgenen konnte bei 6 Genen (APP, TRAF6, PIN1, FOS, CDKN1A und TNFAIP3) eine direkte Verbindung zum angeborenen Immunsystem festgestellt werden. Ebenfalls waren diese Gene alle hochreguliert in den immunisierten PBMCs. TRAF6, APP, CTNND1, ESR1 und HDAC5 zusammen sind beteiligt an Signalweiterleitungsprozessen. TRAF6 und FOS wirken zusammen in der Toll-Like Rezeptor Kaskade, an der MAPK Signalisierung, in der MyD88 abhängigen und unabhängigen Kaskade und in entzündungsfördernden Antworten. TRAF6 und PIN sind involviert in Prozessen der RIG-1/MDA5 vermittelten Induktion von Alpha/Beta Interferon.

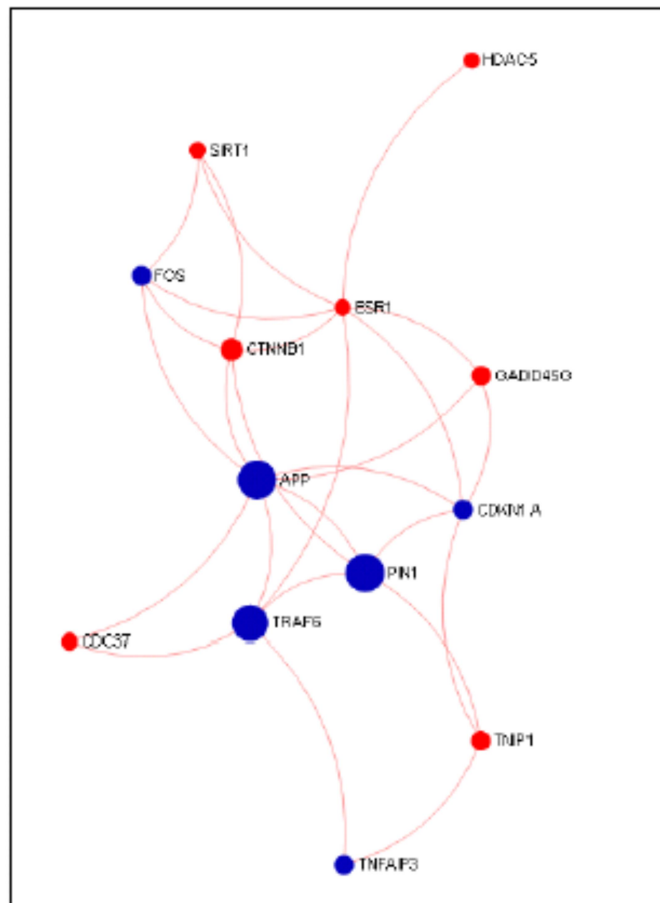


Abbildung 10 Kernnetzwerk der 13 Hauptgene aus dem globalen Netzwerk. Die Abbildung zeigt die Interaktionen zwischen den regulatorischen Genen aus dem globalen Netzwerk. Die blauen Kreise symbolisieren die Gene, die am stärksten an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind

3.7 Validierung der Microarray Daten

Die Validierung der Microarray Daten erfolgte durch die Messung der relativen Expression mittels Real Time PCR von 5 ausgewählten unterschiedlich exprimierten Genen (STAT3, IRF3, CD80, CCL4 und TRAF6). Die Expressionsdaten aus der Array Analyse und der qRT-PCR sind in Abb. 11 dargestellt. Die Expression der 5 Gene aus der qRT-PCR war signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$) und zeigte dieselbe Regulation wie in den Microarray Daten mit einer Korrelation von $r = 0,949$.

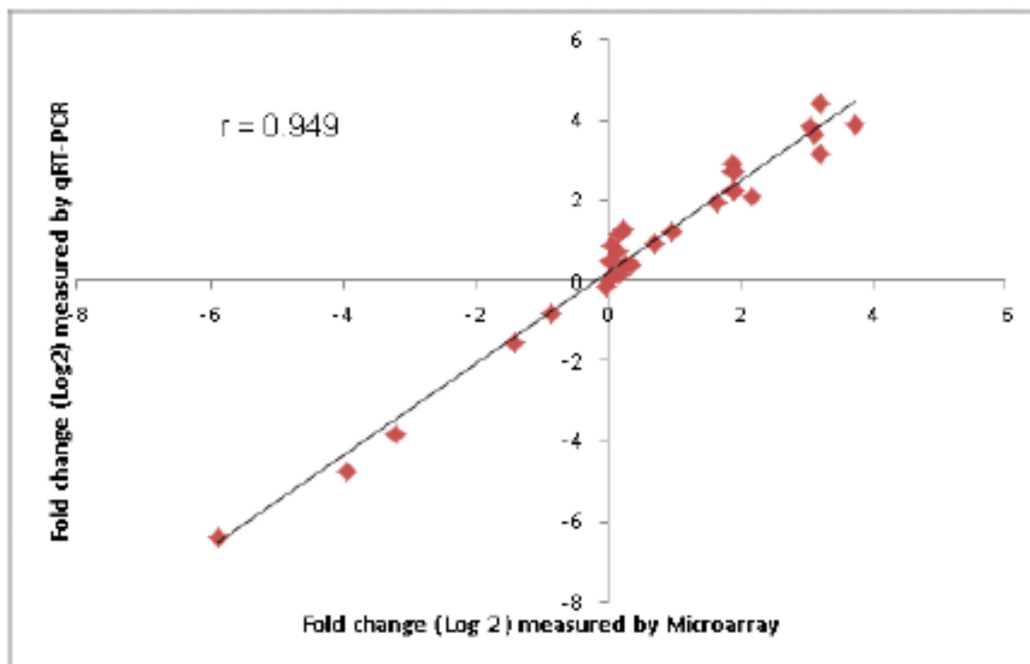


Abbildung 11 qRT-PCR Validierung der Microarray Daten. Hier zu sehen die Korrelation zwischen dem FC der Microarray Daten (X-Achse) und der qRT-PCR Daten (Y-Achse) von 5 selektierten Genen

3.8 Vergleichende Transkriptomstudie zwischen den Rassen Deutsche Landrasse und Piétrain

Um einen Vergleich zwischen zwei Rassen, Deutsche Landrasse und Piétrain, bezüglich der transkriptionellen Immunantwort auf eine PRRSV-Impfung zu untersuchen wurden die Microarray Transkriptionsprofile kurz vor der Impfung (Kontrolle) mit dem Profil 24 h nach der Impfung der beiden Rassen übereinander gelegt. Die Rasse ist eine der potentiellen Determinanten, die die Wirtsimmunantwort auf die PRRS-Virus-Infektion bei Schweinen beeinflussen. Die Aufklärung der Rolle der Wirtsgenetik an der Variation der PRRSV-Impfstoff-Reaktionsfähigkeit kann dazu führen, dass die hostspezifische Immunkompetenz und damit die Resistenz gegenüber PRRSV charakterisiert werden. Um dies zu klären, ist ein vielversprechender Weg die Identifizierung von Wirtsgenotypen, die mit einer verbesserten angeborenen Immunantwort auf PRRSV-Impfung reagieren (Rowland et al., 2012).

3.8.1 Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene in PBMCs nach einer PRRSV-Impfung im Rassenvergleich

Wie bereits in der Transkriptomanalyse der Array mit Proben der Deutschen Landrasse beschrieben, galten auch hier als Grenzwerte für unterschiedlich exprimierte Gene ein FDR < 0,05 und ein FC >1,5 und < -1,5. Es wurden 4 Vergleiche durchgeführt, Deutsche Landrasse vergleich Zeitpunkt 0 (Kontrolle) mit 24 h nach der Impfung (DL-24h vs. DL-0h), Piétrain vergleich Zeitpunkt 0 mit 24 h nach Impfung (Pi-24h vs. Pi-0h), Zeitpunkt 0 Deutsche Landrasse mit Zeitpunkt 0 Piétrain (DL-0h vs. Pi-0h) und Zeitpunkt 24 h nach Impfung Deutsche Landrasse mit Zeitpunkt 24 h nach Impfung Piétrain (DL-24h vs. Pi-24h). Nach der statistischen Analyse wurden 4.269 Transkripte als unterschiedlich exprimiert identifiziert. Davon waren 2.459 im Vergleich DL-24h vs. DL-0h, 291 im Vergleich Pi-24h vs. Pi-0h, 3.255 im Vergleich DL-0h vs. Pi-0h und 1.046 im Vergleich DL-24h vs. Pi-24h unterschiedlich exprimiert (Abb. 12 A). Insgesamt waren 59 identische Gene über alle Vergleiche reguliert.

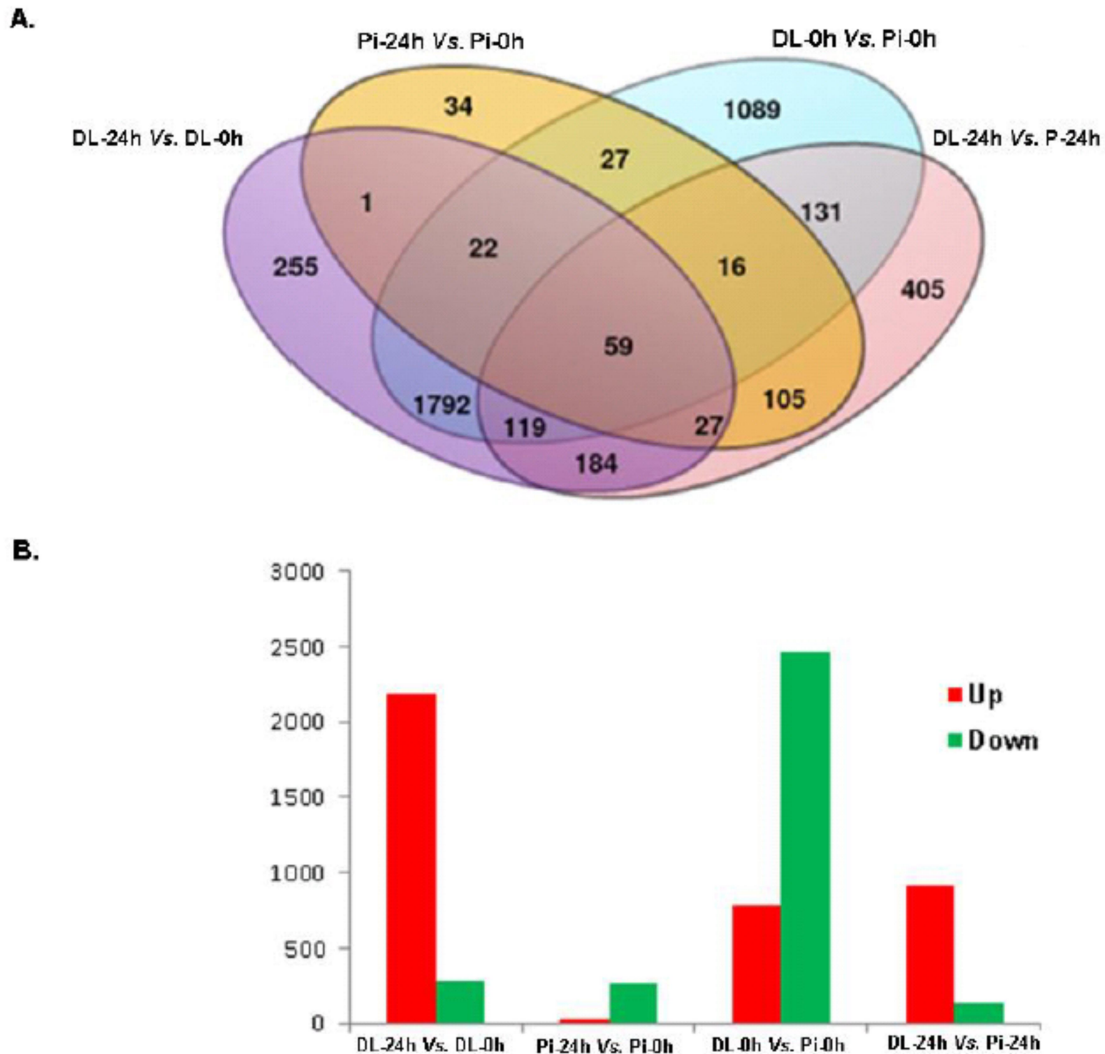


Abbildung 12 Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene im Vergleich der Rassen Deutsche Landrasse und Piétrain. Im Venn-Diagramm (A) sind die Gene aus den 4 Vergleichen überlappend dargestellt. In Abbildung (B) ist die Regulation der unterschiedlich exprimierten Gene zu sehen (Rot = hoch Regulation, Grün = runter Regulation)

Im Vergleich zwischen 24 h nach der Impfung und der Kontrolle waren mehr Gene (2.350) in der Deutschen Landrasse unterschiedlich exprimiert im Vergleich zu Piétrain mit 182. Von dem Vakzin-induzierten unterschiedlich exprimierten Genen waren 255 nur in der Deutschen Landrasse unterschiedlich reguliert, 34 in Piétrain, während 109 Gene in beiden Rassen identifiziert wurden. Zum Zeitpunkt 24 h nach der Impfung waren 27 Gene in beiden Rassen gemeinsam unterschiedlich reguliert, allerdings war der Grad der Häufigkeit stärker in der Deutschen Landrasse als in Piétrain. Der direkte Vergleich der beiden Rassen, identifizierte 3.255 Gene im Vergleich zu der Kontrollgruppe und 1.046 in der Impfgruppe. Davon waren 325 in beiden Gruppen gemeinsam unterschiedlich reguliert. Insgesamt waren mit 721 Genen mehr in der Deutschen Landrasse exprimiert im Vergleich zu Piétrain, was für eine

rassenspezifische Immunantwort spricht. Auch der Vergleich mit der Kontrollgruppe belegt dieses. Dort waren insgesamt 2.930 Gene mehr Abundant in PBMCs der Deutsche Landrasse im Vergleich zu Piétrain Schweinen. Von den rasseabhängigen unterschiedlich exprimierten Genen, konnte daher die Expression von 405 Genen auf die Immunisierung und von 1.089 Genen auf andere Faktoren zurückgeführt werden.

3.8.2 Globales Expressionsprofil von unterschiedlich exprimierten Genen zwischen DL und Pi Schweinen

In PBMCs der DL Schweine war die Großzahl der Gene, 2.186, hochreguliert und nur 273 runterreguliert (Abb. 12). Im Gegensatz dazu waren die meisten Gene (260) in den PBMCs der Rasse Piétrain runterreguliert und nur 31 Gene hochreguliert. In der Kontrollgruppe waren in der DL Rasse 2.472 Gene hochreguliert und 783 Gene in der Pi Rasse. Die größte Anzahl von hochregulierten Genen (933) konnten in der Impfgruppe der DL Tieren im Vergleich zu den Pi Tieren mit 133 Genen festgestellt werden. Der FC der unterschiedlich exprimierten Gene in den 4 Vergleichen rangierte zwischen -3,87 und 5,12 (DL-24h vs. DL-0h), zwischen -4,71 und 3,63 (Pi-24h vs. Pi-0h), zwischen -5,87 und 6,41 (DL-0h vs. Pi-0h) und zwischen -3,89 und 6,72 (DL-24h vs. Pi-24h) (Abb. 13).

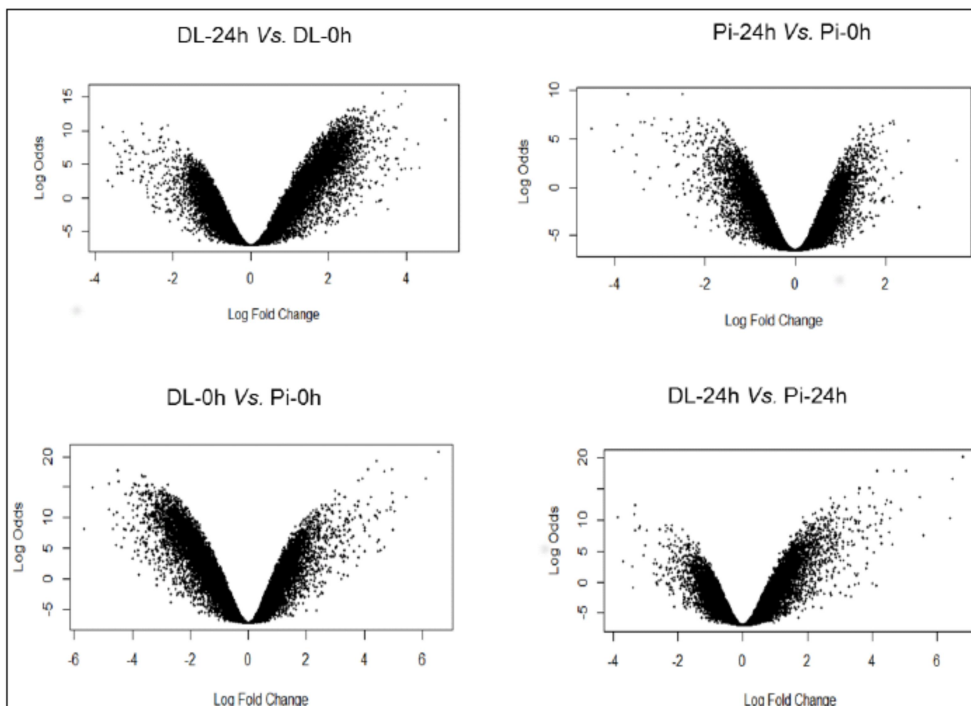


Abbildung 13 Der Volcano-Plot zeigt den FC Bereich der unterschiedlich exprimierten Gene in den 4 Vergleichen

Auch hier zeigt das hierarchische Cluster die klare Verteilung der unterschiedliche Regulation und Homogenität in den Replikaten (Abb. 14). Sowie die klare Verteilung der unterschiedlichen Regulation der Gene in den beiden Rassen.

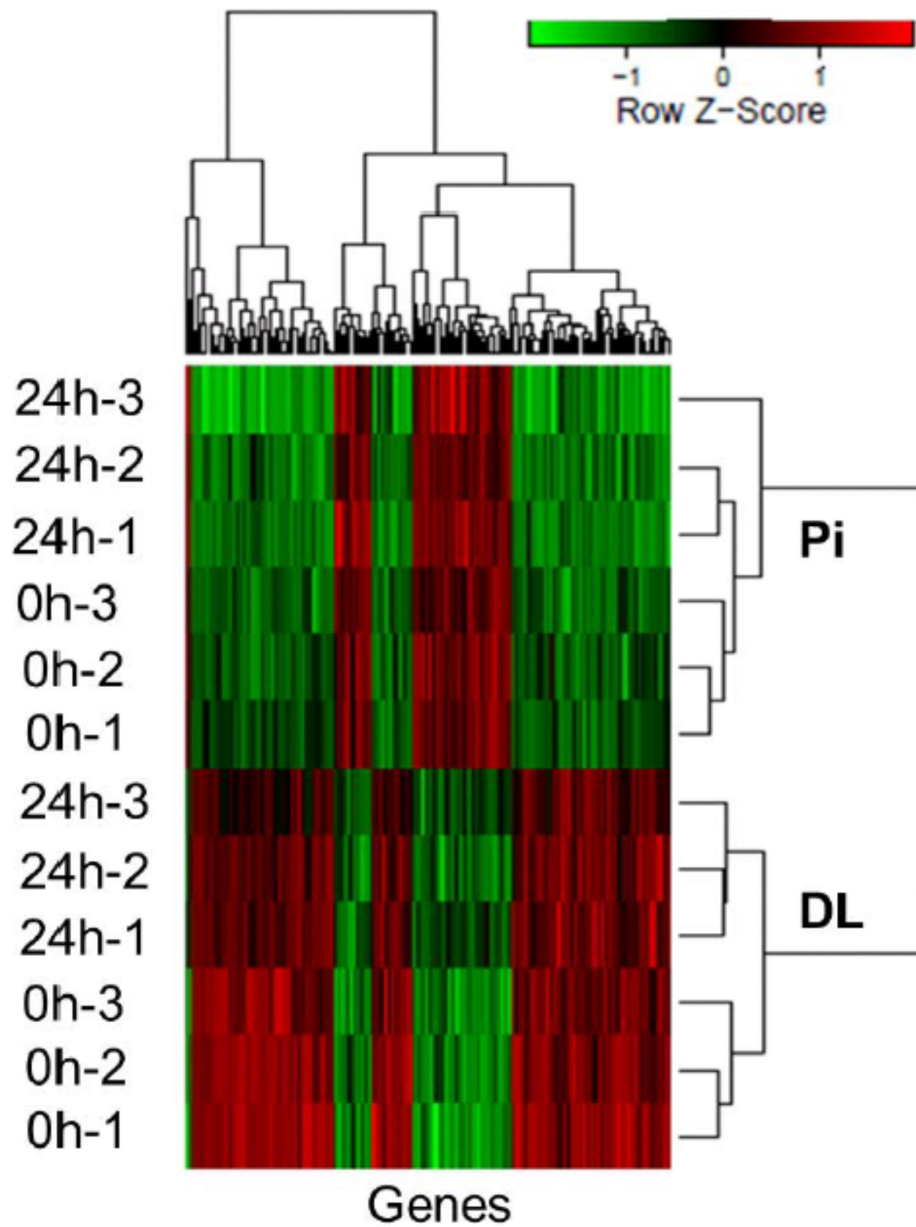


Abbildung 14 Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene in den 4 Vergleichen und in beiden Rassen

3.8.3 Netzwerkanalyse der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den Rassen DL und Pi

Um potenzielle regulatorische Gene aus der großen Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene zu identifizieren, erfolgte auch hier eine Netzwerkanalyse. Diese Analyse wurde mit denselben Kriterien (Grad, Verbindungen) durchgeführt wie die bereits beschriebene Analyse in Kapitel 3.6. Eine Darstellung des Netzwerks ist in Abb. 15 zusehen.

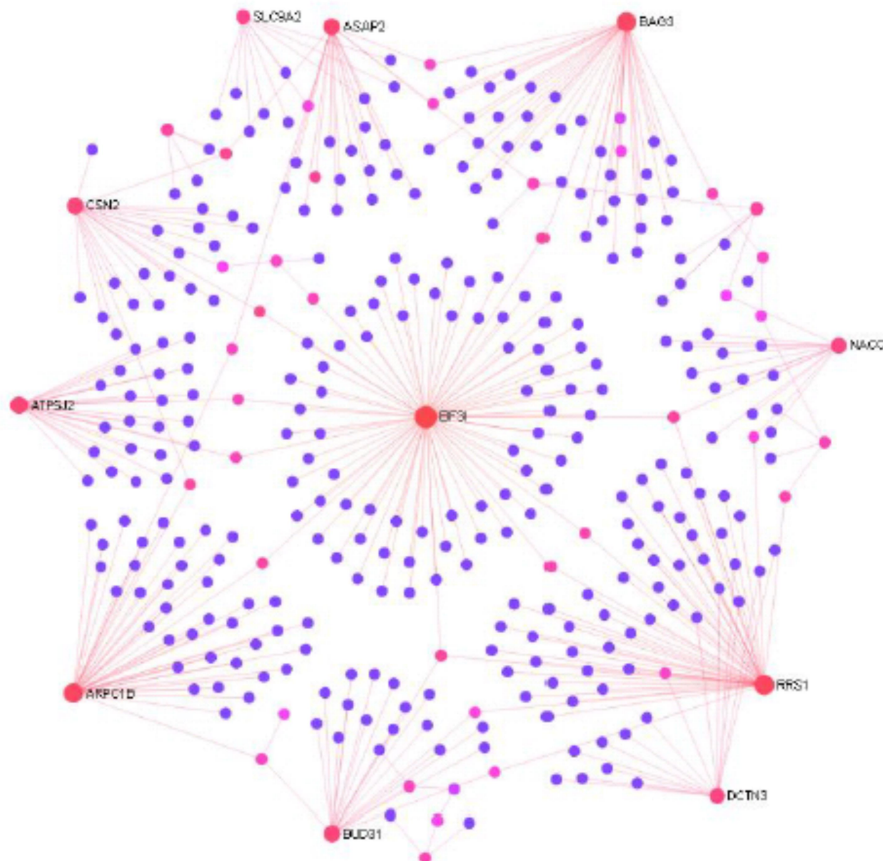


Abbildung 15 Globales Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene beider Rassen. Der Durchmesser steht für die Stärke des Genes im Netzwerk und die Linien für ihre Verbindungen

Durch die eingesetzten Grenzwerte konnten folgende Hauptgene identifiziert werden, EIF3I ((Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I), RRS1 (Ribosome biogenesis regulator homolog (*S. cerevisiae*)), ARPC1B (Actin related protein 2/3complex, subunit 1B, 41kDa), BAG3 (BCL2-associated athanogene 3), ATP5J2 (ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2), CSN2 (Casein beta), ASAP2 (ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2), BUD31 (BUD31 homolog (*S. cerevisiae*)), DCTN3 (Dynactin 3 (p22)), NACC1 (Nucleus accumbens associated 1, BEN und BTB (POZ) domain containing) und SLC9A2 (Solute carrier family 9, subfamily A (NHE2, cation proton

antiporter 2), member 2). Das relative Expressionslevel und die Kenngrößen der Hauptgene des Netzwerks sind in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3 Messwerte des Netzwerkes und der relative Expressionswert der Hauptgene für beide Rassen

Gene name	Centrality estimates		Relative expression (FC)	
	Degree	Between-ness	DL	Pietrain
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I (EIF3I)	79	25387	-1.743	1.771
RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (<i>S. cerevisiae</i>); (RRS1)	50	15702	2.005	-1.619
Actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa (ARPC1B)	42	13702	1.769	-1.764
BCL2-associated athanogene 3 (BAG3)	39	12700	2.594	-1.664
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2 (ATP5J2)	25	7719	2.468	-1.931
Casein beta (CSN2)	22	9427	-3.041	-1.534
ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (ASAP2)	21	6625	2.435	-2.470
BUD31 homolog (<i>S. cerevisiae</i>); (BUD31)	21	6495	2.202	-1.733
Dynactin 3 (p22); (DCTN3)	16	4970	1.780	-1.523
Nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing (NACC1)	16	4539	2.216	-1.607
Solute carrier family 9, subfamily A (NHE2, cation proton antiporter 2), member 2 (SLC9A2)	11	3279	2.340	-2.126

FC, Fold Change; DL, German Landrace, Pi, Pietrain

Überraschender Weise zeigen alle bis auf ein Hauptgen gegenläufige Regulationen in den beiden Rassen. Die relative Expression von SLC9A2, ASAP2, BAG3, NACC1, RRS1, DCTN3, BUD31, ARPC1B und ATP5J2 zeigen daher eine hoch Regulation in DL Schweinen und eine runter Regulation in Pi Schweinen nach der Impfung. Im Gegensatz dazu ist EIF3I in DL runter- und in Pi raufreguliert. Nur CSN2 zeigt in beiden Rassen eine runter Regulation nach der Impfung.

3.8.4 GO- und Signalweganalyse mit rassespezifischen unterschiedlich exprimierten Genen

Für ein besseres Verständnis der biologischen Mechanismen der rassespezifisch Wirtstranskriptionalen Antwort auf eine PRRSV-Impfung, wurde eine Gen Ontologische- und eine Signalweganalyse der Gene, die einzigartig unterschiedlich exprimiert waren in den beiden Rassen, durchgeführt. In der Deutschen Landrasse wurden daher 913 Gene und bei Piétrain 133 Gene in die Analyse mit einbezogen. Die Top GOs der DL beinhalten den

Zelloberflächen Signalweg, metabolische Prozesse von kleinen Molekülen, Zelltod, Prozesse der Apoptose, positive Regulation der Zellproliferation, extrazelluläre Matrix Organisation, Transport, canonicaler Wnt Signalweg, positive Regulation der epithelialen Zellproliferation und Antwort auf Arzneimittel (Abb. 16).

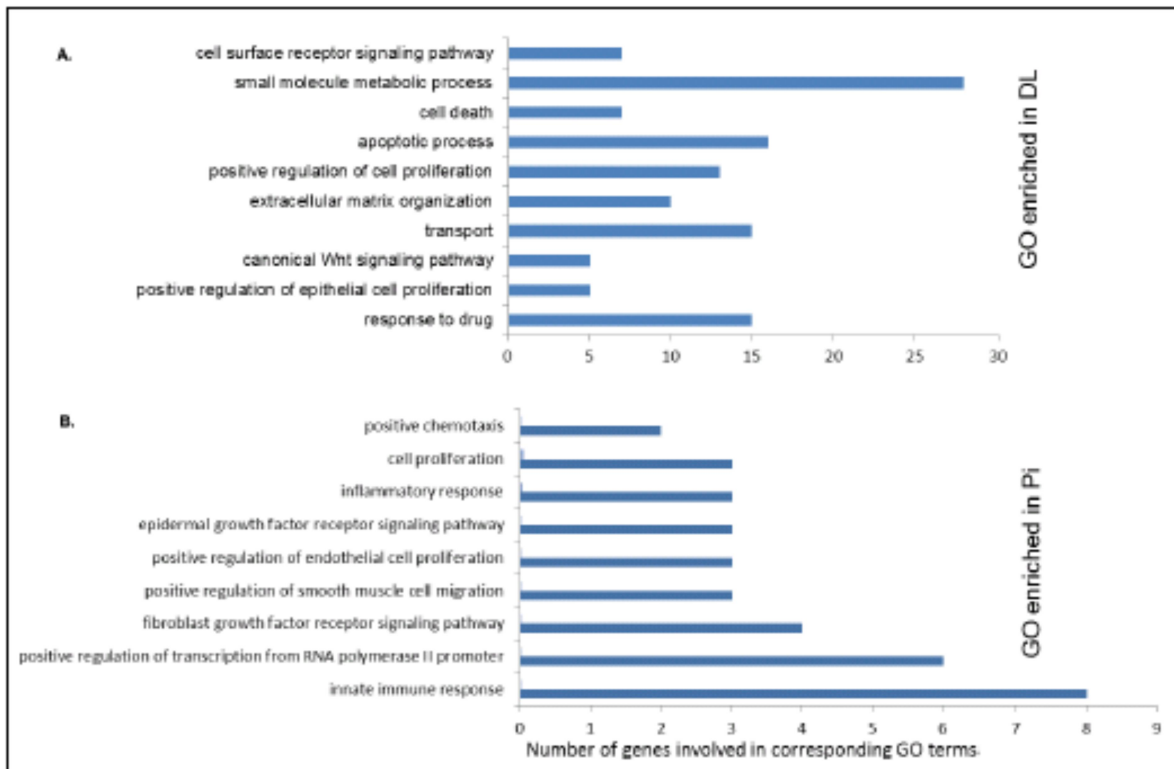


Abbildung 16 Gen Ontologie der unterschiedlich exprimierten Gene. Die Balken spiegeln die Anzahl der Gene in dem jeweiligen GOs für die Rasse DL (A) und Pi (B) wieder

Zu den GOs der hochregulierten Gene der Rasse Piétrain gehören die positive Chemotaxis, die Zellproliferation, Antwort auf Entzündungen, Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktor, positive Regulation der endothelialen Zellproliferation, positive Regulation der glatten Muskelzellmigration, positive Regulation der Transkription des RNA Polymerase II Promotors, Signalweg des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor und Signalweg der angeborenen Immunantwort (Abb. 16). Bei der Signalweganalyse ergaben sich folgende Signalwege aus den unterschiedlich exprimierten Gene der DL Tiere: Signalweiterleitung, Metabolismus, extrazelluläre Matrix Organisation, Zytokine Signalisierung im Immunsystem, Wnt Signalweg, Apoptose, Glykolyse/Glukoneogenese, Interferon Alpha/Beta Signalisierung und der Signalweg des TNF Rezeptor (Tab. 4) und für die Rasse Pi, das angeborene Immunsystem, Signalisierung des FGFR in Krankheiten, TGF Beta Rezeptor, JAK-STAT Signalweg und Regulation, der Chemokine Signalweg, IL2 Signalisierung durch PI3K, Zell-Zell Kommunikation, Glucose Metabolismus und Blutplättchen Homeostase (Tab. 4).

Tabelle 4 Biologische Signalwege der beiden Rassen und ihrer darin vorkommenden Gene

Breed	Pathway name	p-value	Genes involved*
DL	Signal Transduction	0.001	ADAM17, APC, APOE, B4GALT1, BAD, CNGA1, CRHR1, DNAL4, DRD2, DRD3, FLT4, FZD3, GFAP, GHRHR, GLP1R, GPR68, GREM2, LGR6, OR10H3, OR2AE1, OR4C46, OR4K13, OR4N2, OR6J1, OR7C2, OR9K2, PSME3, PTPRU, RDH8, RHOBTB2, SDC3, SDC4, SFRP1, SMO, STAT1, TERT, UCHL5, VIPR2 and YWHAB
	Metabolism	0.05	ACSL6, ALDH2, APOE, ATP5J2, B4GALT1, CA12, CERS3, CYP17A1, DBT, DGUOK, DIO2, FBP1, GLP1R, GPAT2, HK3, IP6K1, KCNJ11, LRPPRC, LYPLA1, MED27, MMS19, MTMR7, NDUFS2, NDUFS3, NME2, PSME3, SDC3, SDC4 and SQLE
	Extracellular matrix organization	0.008	ADAM17, BMP1, SDC3, SDC4, TGFB2, TLL1 and TLL2
	Cytokine Signaling in Immune system	0.08	ADAM17, HLA-C, IFNA6, MX1, STAT1, TNIP2 and YWHAB
	Wnt signaling pathway	0.002	APC, FZD3, SDC3, SDC4, SFRP1 and YWHAB
	Apoptosis	0.007	ADAM17, APC, BAD, PSME3, YWHAB
	Glycolysis / Gluconeogenesis	0.02	ALDH2, ALDH3A1, FBP1 and HK3
	Interferon alpha/beta signaling	0.05	HLA-C, IFNA6 and MX1
	Antigen processing and presentation	0.08	HLA-C, HLA-DMB and PSME3
	TNF receptor signaling pathway	0.09	ADAM17 and STAT1
Pi	Innate Immune System	0.001	ADRBK1, FOXO3, IRF2, MTOR and PPP2CB
	Signaling by FGFR in disease	0.001	ADRBK1, FOXO3, MTOR and PPP2CB
	TGF_beta_Receptor	0.02	EIF3I, FOXO3 and MTOR
	JAK STAT pathway and regulation	0.03	ADRBK1, IL1A and MTOR
	Chemokine signaling pathway	0.07	ADRBK1 and FOXO3
	IL2 signaling events mediated by PI3K	0.003	FOXO3 and MTOR
	Validated targets of C-MYC transcriptional repression	0.01	DKK1 and FOXO3
	Cell-Cell communication	0.004	CDH13, FLNC and KIRREL2
	Glucose metabolism	0.01	GYS1 and PPP2CB
	Platelet homeostasis	0.02	P2RX1 and PPP2CB

*bold symbols indicate the upregulated genes involved with corresponding pathways

3.8.5 Rassespezifische Transkriptomsignatur

Für eine rassespezifische Transkriptomsignatur wurden die unterschiedlich exprimierten Gene der beiden Rassen in eine Netzwerkanalyse einbezogen wie bereits in Kapitel 3.6 beschrieben.

Die rassenspezifischen Netzwerke sind in Abb. 17 dargestellt. Für die Rasse DL konnten die Gene, STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1), MMS19 (MMS19 Homolog, cytosolic iron-sulfur assembly component), RPA2 (Replication protein A2), BAD (BCL2 associated agonist of cell death), UCHL5 (Ubiquitin C-terminal hydrolase L5) and APC (Adenomatous polyposis coli), als Hauptgene identifiziert werden. Während für die Rasse Pi die Gene STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1), MMS19 (MMS19 Homolog, cytosolic iron-sulfur assembly component), RPA2 (Replication protein A2), BAD (BCL2 associated agonist of cell death), UCHL5 (Ubiquitin C-terminal hydrolase L5) and APC (Adenomatous polyposis coli), festgestellt werden konnten.

Die in dieser Studie verwendeten Landrasse-Schweine hatten eine massive Transkriptionsreaktion auf die PRRSV-Impfung, was durch eine differentielle Expression von mehr als einer doppelt so hohen Anzahl an Genen im Vergleich zu den Piétrain-Schweinen belegt wurde. Die höhere Anzahl von Impfstoff induzierten DEGs in PBMCs von DL im Vergleich zu dem von Pi zeigte, dass der PRRSV-Impfstoff in der Lage ist, eine wirksame Immunität in DL-Schweinen anzubringen, bei Pi jedoch eine verzögerte Reaktion zu beobachten ist. Diese Ergebnisse sind mit einem früheren Bericht von Ait-Ali et al (2011), der die Mikroarray-basierte Genexpressionsprofilierung von Lungengewebe nach PRRSV-Infektion zwischen Landrasse und Piétrain-Schweinen verglichen hat, vergleichbar. Die DL-Schweine zeigten eine höhere Anzahl von DEGs innerhalb von 12 Stunden nach der Infektion im Vergleich zu der von Pi. Auch im vorherigen in-vitro Projekt „Untersuchungen zur genetischen Prädisposition von Schweinen gegenüber PRRS“ konnte Pröll (2014) einen eindeutigen Rasseunterschied bei der Untersuchung von dendritischen Lungenzellen auf eine PRRSV Infektion in-vitro feststellen. Auch hier zeigte die Rasse Piétrain eine Verzögerung in der Immunantwort im Vergleich zu Duroc Tieren. Eine globale Hochregulierung von veränderten Transkripten wurde bei geimpften PBMCs von DL-Schweinen beobachtet, dass deutet darauf hin, dass der PRRSV-Impfstoff das Immunsystem der Deutschen Landrasse-Schweine aktiviert und zu einer besseren Immunkompetenz zu führen scheint. Auf der anderen Seite führte die PRRSV-Impfung zu einer globalen Runterregulierung von PBMC-Transkriptomen in Piétrain-Schweinen, die die Unterdrückung von Funktionen des Immunsystems anzeigen. Dieser Unterschied kann auf die rassenspezifische Wirtsimmunantwort auf die PRRSV-Impfung zurückzuführen sein.

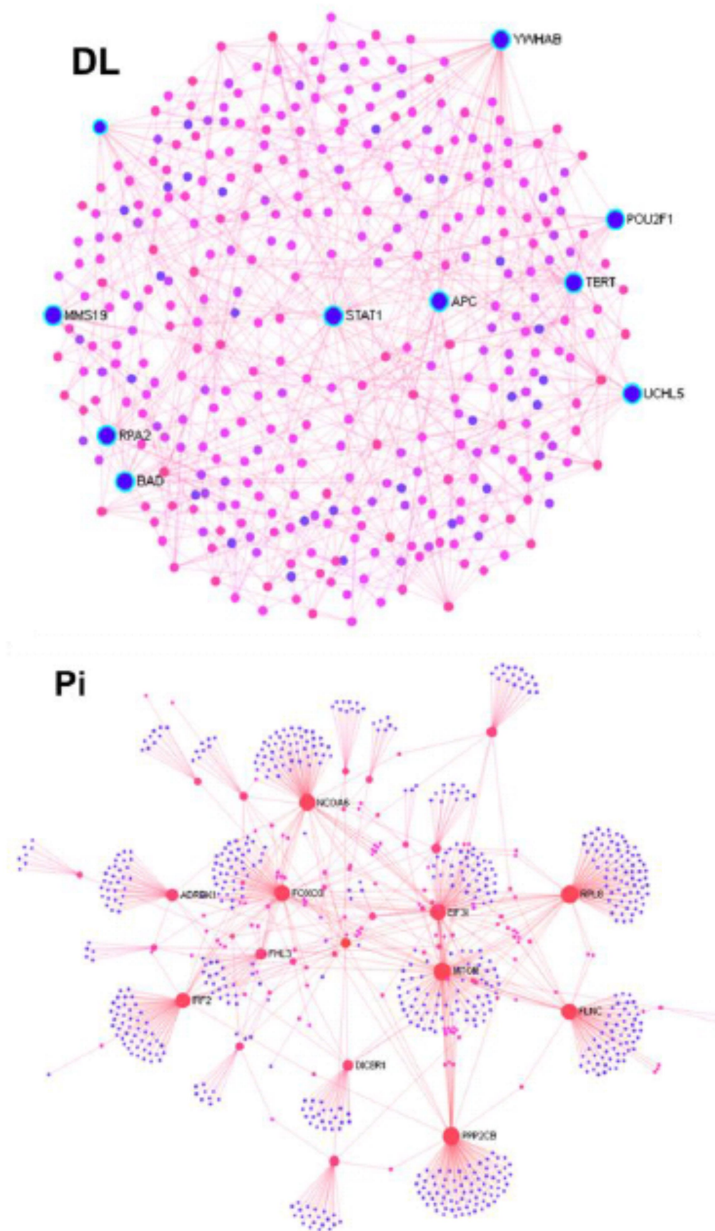


Abbildung 17 Rassenspezifische Netzwerke. (A) Deutsche Landrasse, (B) Piétrain

3.9 Vergleich angeborene und erworbene Immunantwort in Piétrain Schweinen

Eine synergistische Wirkung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems des Wirts ist für die Aufrechterhaltung einer dauerhaften schützenden Immunität durch Impfung unerlässlich. Daher zielte ein weiterer Teil dieser Studie darauf ab, die Transkriptomprofile in PBMCs von geimpften Tieren zu untersuchen, um die angeborene und die adaptive Immunantwort auf die PRRSV-Impfung bei Piétrain-Schweinen zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurde Tag 1 als Nachweis der angeborenen Immunantwort und Tag 28 nach der Impfung für die adaptive Immunantwort ausgewählt. Pancer und Cooper (2006) beschrieben bereits, dass das adaptive Immunsystem sich mit ca. 2-4 Wochen entwickelt.

3.9.1 Antikörper Nachweis

Auch bei den Piétrain Tieren fand ein PRRSV Antikörper Nachweis, wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, statt. Auch hier konnte zu Beginn des Experimentes, also zum Zeitpunkt der ersten Impfung, kein maternaler Effekt nachgewiesen werden. Bei allen Tieren lag der Antikörpertiter unter dem vorgegebenen Grenzwert von 0,4. Ein erster Anstieg des Titers konnte nach 14 Tagen mit einem Alter von 42 Tagen festgestellt werden. Nach 28 Tagen folgte dann ein rasanter Anstieg.

3.9.2 Transkriptomprofil von PBMCs nach einer PRRSV-Impfung

Um die Wirts-Transkriptionsreaktion auf den PRRSV-Impfstoff zu untersuchen, wurde auch hier das Affymetrix GeneChip Porcine Gene 1.0 ST Array verwendet. Proben von PBMCs, unmittelbar vor (D0) der Impfung, ein Tag (D1) und 28 Tagen (D28) nach der Impfung wurden eingesetzt mit drei biologischen Replikaten. Zuerst wurden die normalisierten Gensonden-Sets gefiltert, um diejenigen mit sehr niedrigen Expressionswerten und einer geringen Variabilität über die Proben zu eliminieren. Nach dem Filtern lieferten die normalisierten Expressionsdaten insgesamt 14.212 Gen-Transkripte, die nach der Impfung in PBMCs exprimiert waren.

3.9.3 PBMCs Expressionsausprägung im Zusammenhang mit der angeborenen und adaptierten Immunantwort

Transkripte wurden als differentiell exprimiert betrachtet mit einem FC von $> 1,5$ oder $< -1,5$ und einer FDR von $< 0,05$. Mit diesen Grenzwerten wurden insgesamt 295 Transkripte in PBMCs am Tag 1 nach der Impfung im Vergleich zur Kontrolle differentiell exprimiert. Davon waren 65 Genen einschließlich STAT3, LCK, UBB, VAV1, RSP17, SLC2A2, PTGES2 und MESP1 hochreguliert und 230 Gene einschließlich TGF β 1, RTF1, BIN2, TPST2, SNRK und PRKCQ runterreguliert (Tab. 5). Die FC der differentiell exprimierten Gene lag zwischen -4,461 und 3,46. Die FC der am stärksten signifikanten Gene (FDR der

Top-Ten Hoch- und Runterregulierung), die mit einer angeborenen Immunität assoziiert sind, sind in einem Vulkanoplot Abb. 18 dargestellt.

Tabelle 5 Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene für den Vergleich der angeborenen und erworbenen Immunität

Types	Number of genes	
	Innate immunity (D1 vs. D0)	Adaptive immunity (D28 vs. D0)
Up regulated	65	37
Down regulated	230	79
Total	295	116

Am Tag 28 nach der Impfung wurden insgesamt 116 Gene als differentiell exprimiert identifiziert, wobei 37 hochreguliert und 79 runterreguliert waren (Tab. 5). Der Vulkano-Plot (Abb. 19), der die Top-Ten unterschiedlich exprimierten Gene zeigt, zeigt dass CXCR2, IFNG, SMAD3, VNN1, F2R und GZMB am stärksten hochreguliert und IL10, MYL9, TPM2, GSTA4, CLU und TGFβ1 in PBMCs runterreguliert nach einer PRRSV-Impfung waren. Dabei lag der Bereich der FC zwischen -2,51 und 4,50.

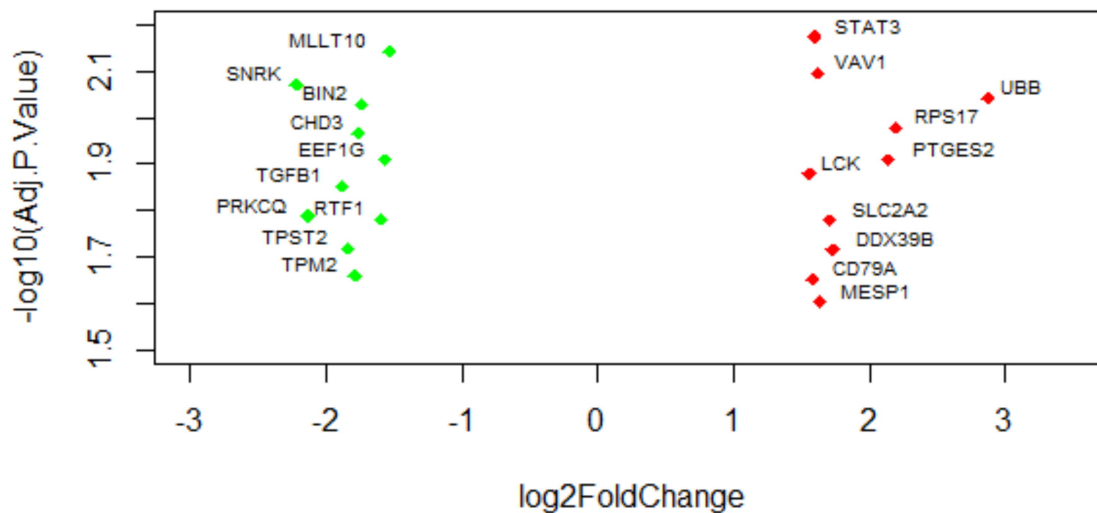


Abbildung 18 Volcano-Plot der am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt kurz nach der Impfung. Dargestellt ist der FC der Top-Ten Transkripte

Ein sehr interessantes Gen ist dabei das IFNG, was am Tag 28 eine Hochregulation aufweist. Dies deutet auf eine verzögerte Induktion der angeborenen antiviralen Immunität gegenüber PRRSV in PBMCs hin. Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Studien, bei denen mehrere Mikroarray-Experimente eine gedämpfte Expression der Typ-I-IFN-Antwort

während der PRRSV-Infektion berichteten, was auf eine unzureichende Stimulation der angeborenen antiviralen Immunantwort hindeutet (Xiao et al., 2010a, Ait-Ali et al. 2011, Garcia-Nicolas et al., 2014).

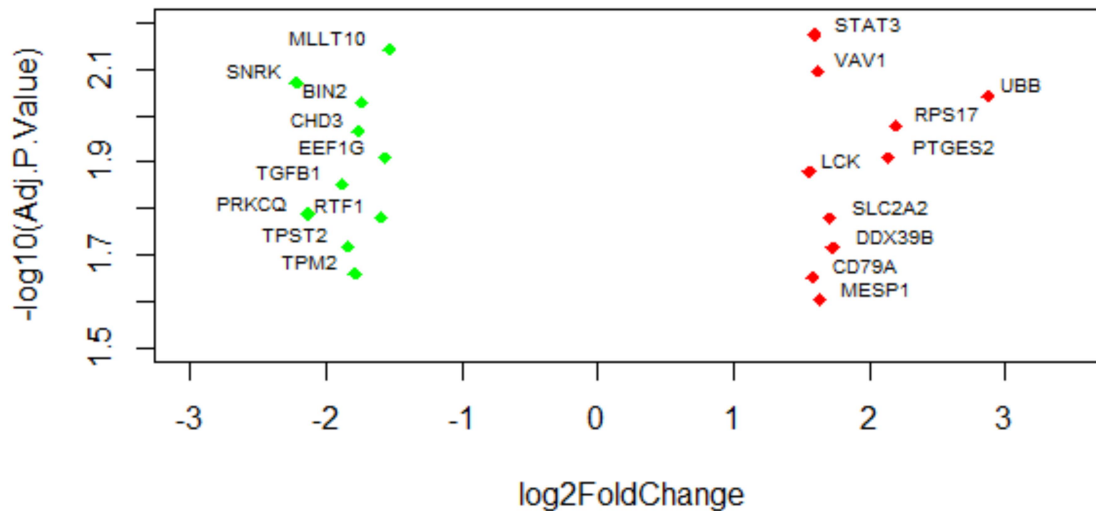


Abbildung 19 Volcano-Plot der am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene zum Zeitpunkt 28 Tage nach der Impfung. Dargestellt ist der FC der Top-Ten Transkripte

Das hierarchische Cluster zeigt die visuelle Zusammenfassung der dynamischen Veränderungen der Transkriptionsreaktion auf den PRRSV-Impfstoff zu den beiden Zeitpunkten mit einer stufenweisen Hochregulierung von differentiellem exprimierten Transkripten in zwei Hauptclustern (Abb. 20). Das Proben-Clustering zeigte zwei überlegene Cluster, eine für vor der Impfung, mit überwiegender Runterregulation, und eine andere nach der Impfung, mit der Änderung in eine Hochregulation der Transkripte. Die Replikate jedes Zeitpunktes, hier als Gruppe dargestellt, zeigt eine geringe individuelle Variation der Impfstoff-induzierten Genexpression je Tier.

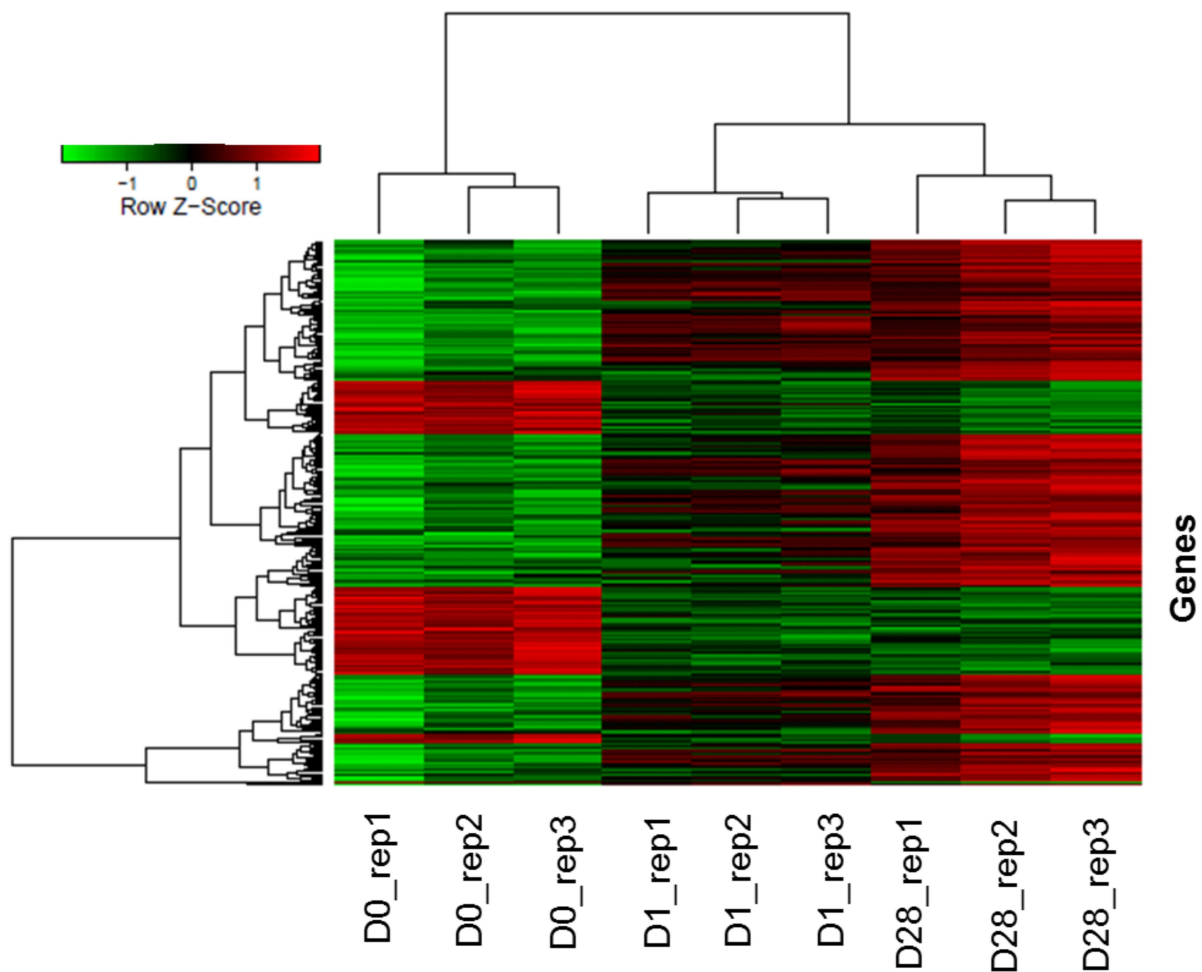


Abbildung 20 Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten Gene kurz nach und 28 Tage nach der Impfung

3.9.4 GO und Signalweganalyse

Die Gene-Ontologie-Analyse ergab, dass Impfstoff-induzierte differentiell exprimierte Gene kurz nach der Impfung an den Prozessen der Zellaktivierung beteiligt sind (Tab. 3), einschließlich T-Zell-Antwort (z. B. GO: 0050852, GO: 0051249, GO: 00190058), zellulärer Proteinmetabolismus (Z.B. GO: 0010467, GO: 0006412, GO: 0050852) und Regulierung der Apoptose (z. B. GO: 0043065). Auf der anderen Seite sind die DEGs die bei 28 Tagen nach der Impfung beobachtet wurden, an der Ausprägung von GOs beteiligt für die B-Zellen Proliferation (z. B. GO: 0042100), entzündliche Reaktion (z. B. GO: 0006954), MHC-Klasse-II-Biosynthese (z. B. GO: 0045348), Genexpression (z. B. GO: 0010628), Antigenverarbeitung und Präsentation (z. B. GO: 0019882). Insgesamt gab es signifikant veränderte Transkripte, die an der zellulären Aktivierung und Differenzierung, dem Proteinstoffwechsel und der Genexpression beteiligt sind (Tabelle 6).

Tabelle 6 Die signifikanten GOs mit der Anzahl der darin enthaltenen Gene

Contrasts	ID	Description	Catego- -ry	Genes ^a	Adj. P
D1 vs. D0	GO:0019058	Viral life cycle	BP	6	0.0067
	GO:0006412	Translation	BP	7	0.0154
	GO:0051249	Regulation of lymphocyte activation	BP	6	0.0259
	GO:0010467	Gene expression	BP	19	0.0269
	GO:0070062	Extracellular vesicular exosome	CC	8	0.0273
	GO:0006200	ATP catabolic process	BP	11	0.0299
	GO:0050852	T cell receptor signaling pathway	BP	6	0.0301
	GO:0030162	Regulation of proteolysis	BP	13	0.0310
	GO:0005840	Ribosome	CC	17	0.0323
	GO:0022857	Transmembrane transporter activity	MF	12	0.0327
	GO:0045747	Positive regulation of Notch signaling pathway	BP	9	0.0336
	GO:0043065	Positive regulation of apoptotic process	BP	6	0.0339
	GO:0044267	Cellular protein metabolic process	BP	16	0.0343
	GO:0001948	Glycoprotein binding	MF	15	0.0343
D28 vs. D0	GO:0005515	Protein binding	MF	19	0.0332
	GO:0005886	Plasma membrane	CC	7	0.0317
	GO:0005576	Extracellular region	CC	8	0.0242
	GO:0006954	Inflammatory response	BP	6	0.0043
	GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	BP	7	0.0143
	GO:0010628	Positive regulation of gene expression	BP	14	0.0198
	GO:0006915	Apoptotic process	BP	6	0.0341
	GO:0042100	B cell proliferation	BP	5	0.0053
	GO:0009615	Response to virus	BP	5	0.0191
	GO:0005125	Cytokine activity	MF	6	0.0224
	GO:0043123	Positive regulation of NFkB signaling	BP	6	0.0240
	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	BP	9	0.0299
	GO:0045348	Positive regulation of MHC class II biosynthesis	BP	5	0.0068
	GO:0009611	Response to wounding	BP	6	0.0256
GO:0019882	Antigen processing and presentation	BP	6	0.0261	

a: Number of genes involved in corresponding GO terms, one gene may appear in multiple terms, BP: Biological process, CC: Cellular component, MF: Molecular function, Adj.P: P values adjusted for multiple test correction method

Die Signalweganalyse ergab die Beteiligung von mehreren Immunantwortwegen auf die PRRSV-Impfstoff induzierte Genexpression in PBMCs einschließlich der Signalisierung durch B-Zellrezeptor, CD28-abhängige VAV1-Signalisierung, Signalisierung durch Interleukine, Influenza-Infektion und TGF β -Signalwege, zum Zeitpunkt kurz nach der Impfung (Abb. 21A). Die Signalisierung durch NOTCH2, der Peptid-Ligand-Bindungsrezeptor, der Granzyme-vermittelte Apoptoseweg, das AP-1-Transkriptionsfaktor-Netzwerk und die TGF β -Signalwege wurden als signifikante Signalwege 28 Tage nach der Impfung identifiziert (Abb. 21B).

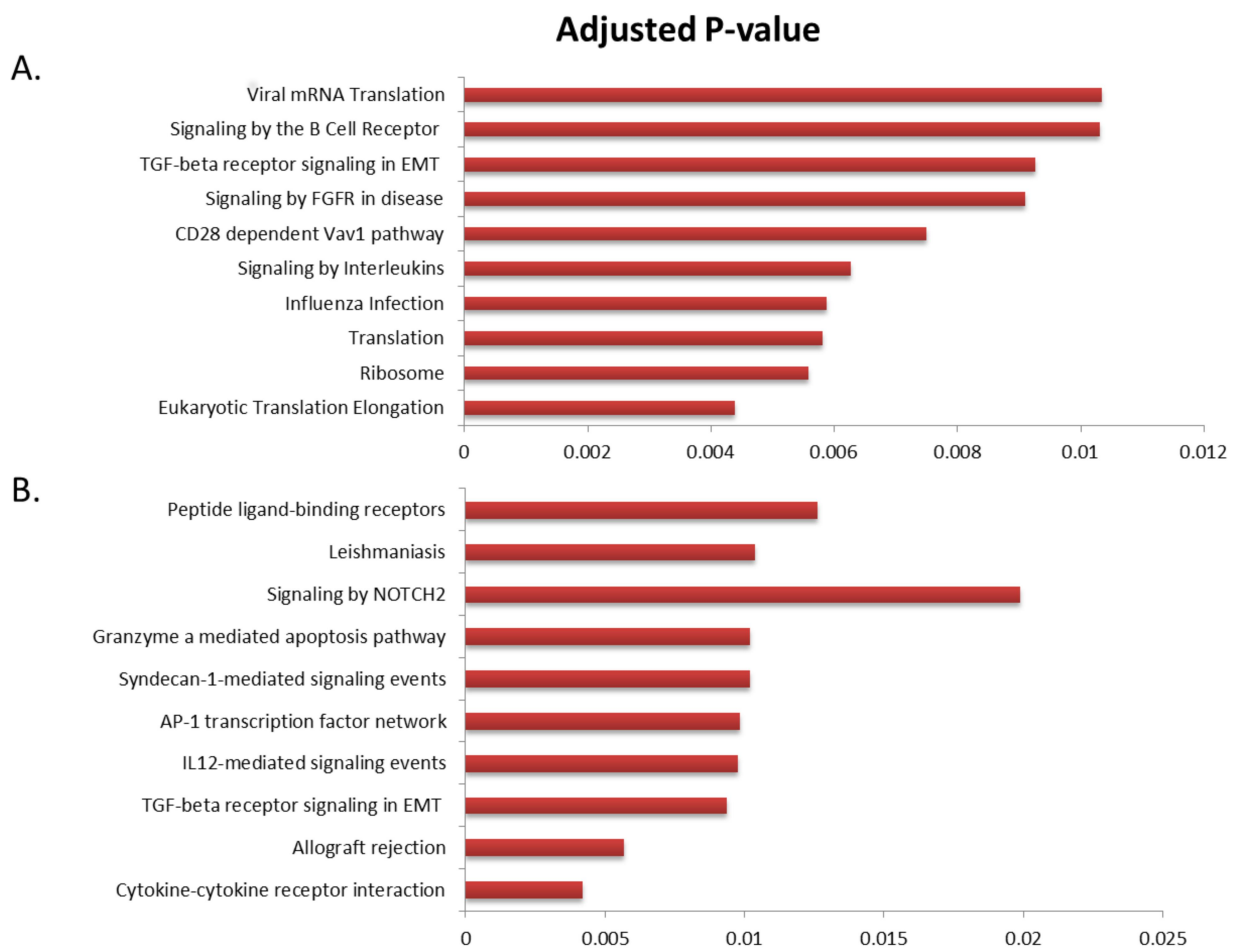


Abbildung 21 Die Top signifikanten Signalwege für (A) kurz nach der Impfung und (B) 28 Tage nach der Impfung

3.9.5 Transkriptionsfaktoren

Weiterhin wurde die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der differentiellen Genexpression in geimpften PBMCs an der angeborenen und erworbenen Immunität mit Hilfe der InnateDB Datenbank untersucht. Die Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen ergab, dass die Gene 120-kDa-CRA-bindende Protein, E4F10, NF1, Tel-2a, HEB und NRF-2

Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aufweisen, die wahrscheinlich im Frühstadium der Immunantwort zur Änderung des Transkriptoms von PBMCs beitragen (Abb. 22 A). Die Analyse zeigte auch, dass ONECUT1, SMAD1 und MYC Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind, die die Transkription zur Induktion der adaptiven Immunantwort in PBMCs regulieren (Abb. 22 B). Die PRRSV-Impfstoff induzierten differenziell exprimierte Gene sind in Tabelle 4 dargestellt.

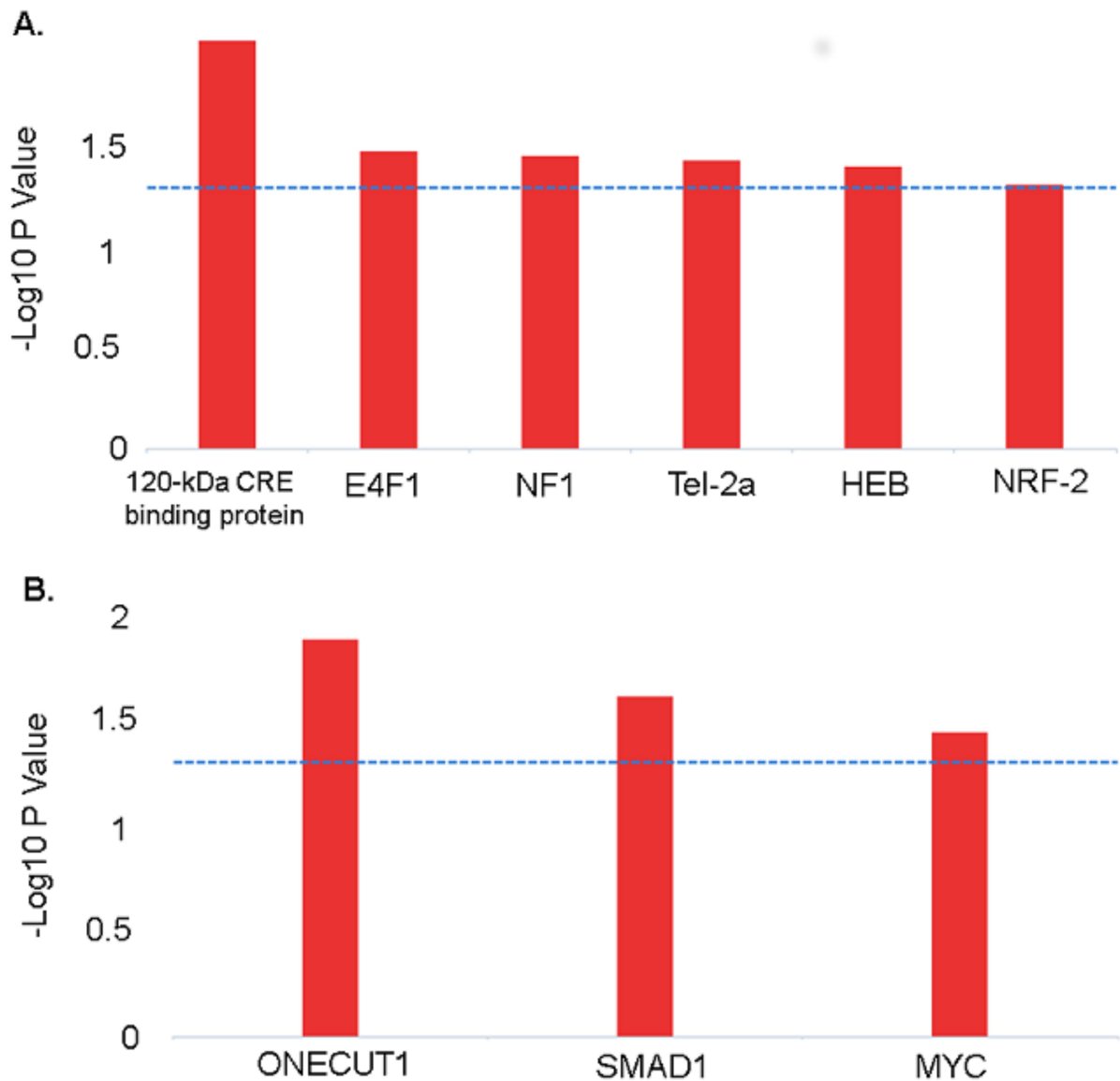


Abbildung 22 Die identifizierten Transkriptionsfaktoren der unterschiedlich exprimierten Gene für (A) kurz nach der Impfung und (B) 28 Tage nach der Impfung. Die blaue Linie gilt als Grenzwert für das Signifikanzniveau

Tabelle 7 Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene aus den unterschiedlich exprimierten Genen

Transcription factors	Potential target genes	P-value
120-kDa CRE-binding protein	DDX39B, RAP2A, RPS11, SERPINC1, STAT3 and TRPC4AP	0.00928
E4F1	DUSP1, RAP2A, RPS11, STAT3 and UBL5	0.03250
NF-1	DAPL1, DDX39B, EN2, LCK, RAP2A, SERPINC1, STAT3, TRPC4AP, UBB and UQCRH	0.03421
Tel-2a	LCK, RPS11, TRPC4AP and UBL5	0.03611
HEB	DAPL1 and TRPC4AP	0.03872
NRF-2	LCK, RPS13, TRPC4AP and UBL5	0.04773
ONECUT1	ANGPT2, DGKA, F2R, GZMB and TGFB1	0.01281
SMAD1	GZMB, IL7R, RSAD2, SMAD3, SCL37A1 and VNN1	0.02389
MYC	ANGPT2, IFNG, PLAC8 and TGFB1	0.03546

Insgesamt waren 27 unterschiedlich exprimierte Gene unter der Regulation dieser 7 Transkriptionsfaktoren. Unter den in dieser Studie identifizierten TFs wurde bereits über MYC als beteiligtes Gen an der Reaktion des Schweinewirte auf die PRRSV-Infektion berichtet (Badaoui et al. 2013). Es konnten ANGPT2, IFNG, PLAC8 und TGFB1 als potentielle Zielgene des MYC-Transkriptionsfaktors identifiziert werden. Der MYC regelt die Expression von zwei Immun-Checkpoint-Proteinen auf der Tumorzelloberfläche, dem angeborenen Immunregler, CD47 (Cluster der Differenzierung 47) und dem adaptiven Immunkontrollpunkt PD-L1 (programmierter Todesligand 1) (Casey et al., 2016) und initiiert und unterhält die Tumorentstehung.

3.9.6 Zelltyp Charakterisierung

Um die spezifischen Zelltypen, die an der Regelung der Impfstoff-induzierten differentiellen Genexpression in PBMCs beteiligt sind hervorzusagen, wurde die Liste der DEGs mit einem im CTen Webportal implementiert Enrichment Algorithmus getestet. Die zelluläre Subpopulation von PBMCs kann ebenfalls eine vereinzelte Rolle bei der Entwicklung der Impfstoffimmunität haben. Es zeigt sich, dass die differentielle Expression von Transkripten zum frühen Zeitpunkt nach der Impfung signifikant beeinflusst wurde durch angeborene Immunzelltypen einschließlich CD56 + NK-Zellen, BDCA4 + dendritischen Zellen, CD4 + T-Zellen und CD8 + T-Zellen (23A). Während differentiell exprimierte Gene 28 Tage nach der Impfung von mehreren Zelltypen wie CD14 + Monozyten, BDCA4 + dendritischen Zellen, Thymus, CD8 + T-Zellen, CD4 + T-Zellen, Lymphknoten und Vollblut beeinflusst wurden (Abb. 23 B). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Expressionsmuster der Gene nicht allein auf Transkriptionsänderungen zurückzuführen sind, sondern möglicherweise auch auf einen Unterschied in der Demographie von PBMCs, die in das Blut rekrutiert wurden. Einige Zelltypen trugen gegenseitig zur differentiellen Genexpression in beiden Zeitpunkten

bei. Die NK-Zellen waren nur mit der angeborenen Immunität assoziiert nicht mit der adaptiven Immunität in PBMCs. Auf der anderen Seite standen Thymus-, CD14 + - und Vollblutzellen im Zusammenhang mit der adaptiven Immunantwort, nicht aber während des Stadiums der angeborenen Immunität gegen die PRRSV-Impfung bei Schweinen.

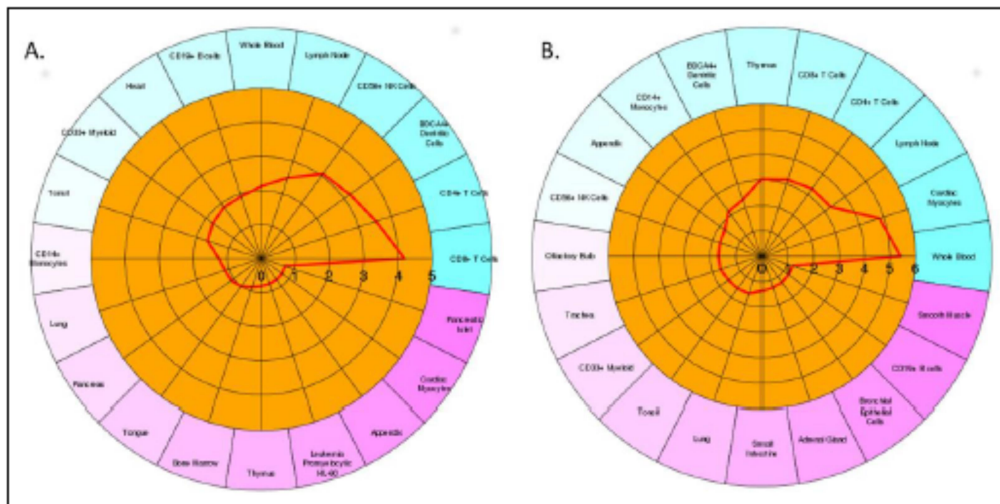


Abbildung 23 Kreisplot der Zelltypisierung aus den unterschiedlich exprimierten Genen. (A) angeborene Immunität, (B) erworbene Immunität

Shimizu et al. (1996) beobachtete eine bemerkenswerte Abnahme der CD4 + T-Zellen nach 3 Tagen PRRSV-Infektion bei Schweinen. Diese Studie berichtete auch über eine leichte Abnahmen der CD8 + T-Zellen nach 3 Tagen, gefolgt von deutlich erhöhten Werten, während gleichzeitig die Verhältnisse von CD4 +/CD8 + T-Zellen zwischen Tag 3 und 28 post Infektion signifikant niedriger waren im Vergleich mit dem von Tag 0 (Shimizu et al., 1996). Allerdings wurde auch festgestellt, dass der Anteil an CD4 + und CD8 + T-Zellen für einige Tage kurz nach PRRSV-Infektion signifikant abnahm, aber bei 8-10 Tagen nach der Infektion auf Prä-Infektionsniveaus zurückkehrte (Nielsen und Botner 1997). Daher könnte diese Information über den zelltypspezifischen Beitrag zur Impfstoffimmunität ein wichtiges Add-on für die PRRS-Forschung sein.

3.9.7 Funktionale Netzwerkanalyse für das angeborene Immuntranskriptom

Die Angeborene Immunantwort, wie andere quantitative Merkmale, wird nicht durch einfache lineare Wege, sondern durch Netzwerke komplexer molekularer Wechselwirkungen reguliert (Gardy et al., 2009). Dabei erwiesen sich Netzwerkanalysen auf der Basis einer größeren immunspezifischen Gen-Datenbank (Shoemaker et al. 2012) als eine effektivere Strategie zur Identifizierung von Genen, die die Immunantwort auf PRRSV-Impfstoff in PBMCs regulieren. Das vereinfachte Netzwerk von PRRSV-Impfstoff induzierte angeborene Immun-Transkripten in PBMCs ist in Abb. 24 dargestellt. Eine Netzwerk topologische Analyse

zeigte, dass UBD, LCK, STAT3, ATP5B, RPS11, RPS13, RPS17 und EEF1G die hochvernetzten Hauptgene des Netzwerks sind. Die Mehrheit der Hauptgene des Netzwerks waren in PBMCs nach PRRSV-Impfung überexprimiert, was eine Hochregulierung ihrer zugrunde liegenden Funktion darstellt. Die Netzwerkmodulanalyse ergab, dass differentiell exprimierte Gene in vier Modulen (IM0, IM1, IM2 und IM3) gruppiert werden konnten, die durch vier verschiedene Farben (Abb. 24) gekennzeichnet sind. Das lila Modul (IM0) enthält die Gene LCK, SKAP1, MyD88, MAPK14, VAV1, JAK2, SRC, CD79A, PTPRC, AMBP, DOCK8, PTK2B, SMAD3, CSNK2B, UBE3A, KHDRBS1 und ist funktionell mit verschiedenen Signalwegen des angeborenen Immunsystems verknüpft, wie Signalisierung durch Interleukine, Zytokin-Signalisierung im Immunsystem, CD28-Co-Stimulation, Antigen aktiviert B-Zell-Rezeptor, Signalisierung durch SCF-KIT, Fc-Gamma-Rezeptor (FCGR) abhängige Phagozytose, Interleukin-1-Signalisierung, Integrin Zelloberflächen-Wechselwirkungen, angeborenes Immunsystem, Signaltransduktion, TRAF6-vermittelte Induktion von NFκB- und MAP-Kinasen nach TLR7/8 oder 9 Aktivierung. Das blaue Modul (IM1), das Gene wie STAT3, TGFβ1, APP, DUSP1, ELAVL1DDX39B, MYL12A, EP300, IKBKB, IKBKG, RBM8A, SP1, EGFR, TRPC4A und CEBPB enthält, ist beteiligt an biologischen Funktionen wie MyD88, Toll Like Rezeptor Kaskaden, Signalisierung durch Interleukine, NF-κB-Aktivierung durch Phosphorylierung und Aktivierung von IKKs-Komplex, Zytokin-Signalisierung im Immunsystem, Signalisierung durch den B-Zellrezeptor und Aktivierung von NF-κB in B-Zellen. Das rosa Modul (IM2), das Gene wie ATP5B, RPS11, RPS13, RPS17, UTP14A, EEF1G, EEF1A1, SUMO2, ITGA4, TRAF6, FN1, RPN2, RPL4, RPL10L, COPS5, HNRNPU, NRNPA3, UBL4A, UBD, UBL5, RTF1, ILF3 und NKKB2 enthält, ist funktionell beteiligt am Prozess der Translation, Metabolismus von Proteinen, intrinsischer Signalweg für die Apoptose, virale mRNA-Translation, Membran-Trafficking, Zellzyklus und Apoptose. Das grüne Modul (IM3), das Gene wie UBC, CHD3, HTT, RAD21 und PTGES2 enthält, beschäftigt sich mit der biologischen Funktion der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen, der Meiose, der Chromosomenpflege und der extrazellulären Matrixorganisation.

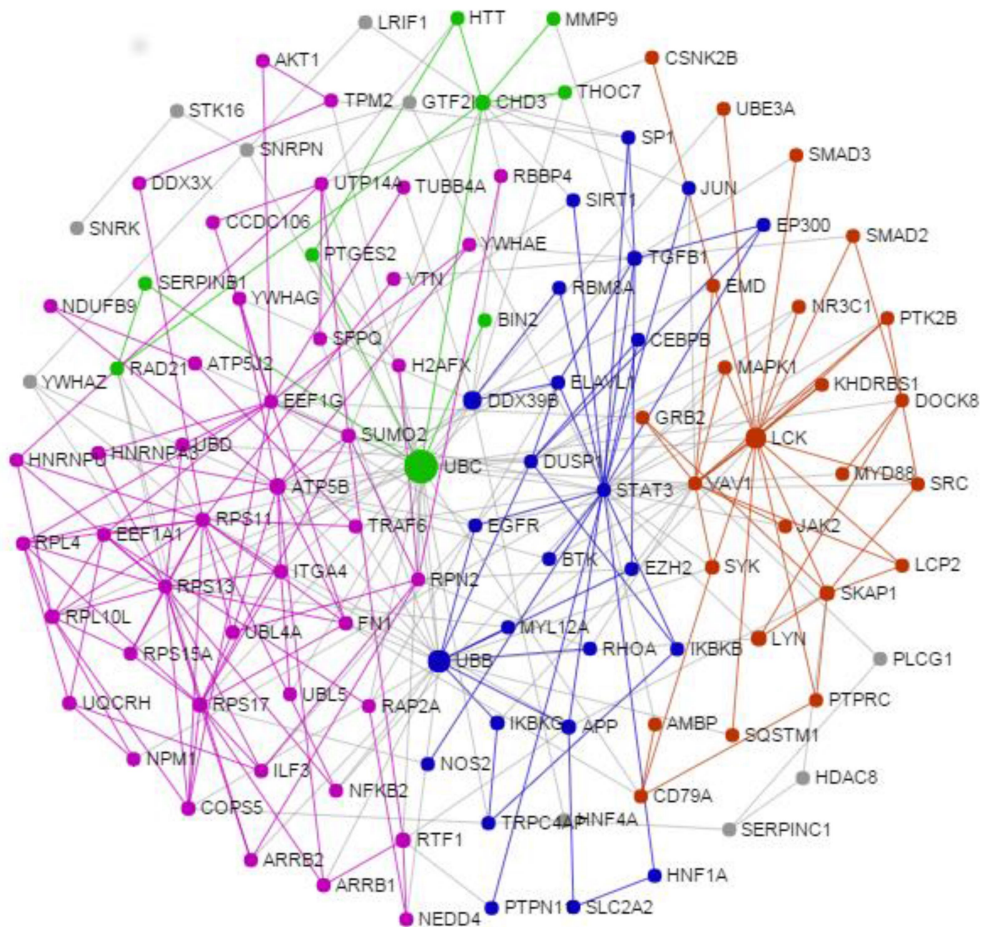


Abbildung 24 Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene der angeborenen Immunantwort. Die Kreise stehen für einzelne Gene des Netzwerks, die Linien für ihre Interaktion, die durch die Farben in Module eingeteilt sind

3.9.8 Funktionelle Netzwerkanalyse für das adaptive Immuntranskriptom

Die Netzwerkanalyse der Transkripte von PRRSV-Impfstoff induzierte Tieren zum Zeitpunkt der Aktivierung der adaptiven Immunität (Abb. 25) identifizierte TGF β 1, IL7R, RAD21 und GZMB als stark miteinander verbundene Gene und sind wahrscheinlich die potentiellen Hauptgene des funktionalen Netzwerks. Das lila Modul (AM0), das die Gene IL7, TGF β 1, SP1, IL-10, EP300, IFNG, EGR1, STAT3, TPM2, LEF1, IRF1 enthielt, ist biologisch mit der Zytokin-Signalisierung im Immunsystem, der Signalisierung durch TGF-beta-Rezeptorkomplex, Influenza-Virus induzierte Apoptose und signalisierte STAT3, verknüpft. Das blaue Modul (AM1), das die Gene GZMA, GZMB, HIST2H2BE, XRCC6, XRCC6 und JUN enthielt, wurde mit der biologischen Funktion der HIV-Infektion, Erkrankungen, der DNA-Reparatur, der Integration von Provirus- und Nukleosomen-Assemblierung, verknüpft. Das rosa Modul (AM2), das Gene wie RAD21, RPS11, ESR1, CLU und HNRNPU enthielt, war mit dem biologischen Prozess wie der Kohäsinsbeladung auf Chromatin, M-Phase und

mitotischer Prometaphase beteiligt. Das grüne Modul (AM3), das Gene wie UBC, CTSH, DGKA, STEAP4 und AMIGO enthielt, war in biologische Funktion wie Glutathion Konjugation, MHC Klasse II Antigen Präsentation und adaptive Immunsystem engagiert. Das Gelbe Modul (AM4), das die Gene enthielt GPRASP1, UBA52, ARRB1, CXCR2 und YWHAG war funktionell an der NF- κ B-Aktivierung und Signalüberleben, Assemblierung von HIV-Virion, STING-vermittelter Induktion von Typ 1 IFN, Signalisierung durch NOTCH und Apoptose, beteiligt.



Abbildung Netzwerk der unterschiedlich exprimierten Gene der erworbenen Immunantwort. Die Kreise stehen für einzelne Gene des Netzwerks die Linien für ihre Interaktion, die durch die Farben in Module eingeteilt sind

3.10 Integrierte Analyse der mRNA und der miRNA Microarray Daten

Um die Rolle der porcinen zellulären miRNAs in der Immunantwort auf die PRRSV-Impfung besser zu verstehen, wurde ein globales Expressionsprofil von miRNAs in PBMCs der Deutschen Landrasse- und Piétrain-Schweinen zum Zeitpunkt kurz vor der Impfung (Kontrolle) und 6 h, 24 h und 72 h nach der Impfung erstellt. Für die Microarray Analyse dienten die GeneChips miRNA v. 4.0 der Firma Affymetrix, welche 30.424 maturierte miRNA Probe Sets codiert, davon 2.578 humane miRNAs sowie miRNAs von 202 andere Organismen (miRBase v. 20).

3.10.1 Zeitliche Expressionsdynamik von miRNAs nach einer PRRSV-Impfung

Die Zeitpunkt abhängige Expression der DE miRNAs sind in Abb. 26 dargestellt. Die Grenzwerte zur Identifizierung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene lag bei einer FDR von $< 0,5$ und einem FC höher $\pm 1,0$. Insgesamt wurden in der Rasse DL (Abb. 26 A) 12, 259 und 14 unterschiedlich exprimierte miRNAs für die Zeitpunkte 6 h, 24 h und 72 h nach der Impfung identifiziert. Hingegen, zeigten sich in der Rasse Piétrain (Abb. 26 B) 0, 222 und 13 miRNA zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 72 h nach der Impfung eine unterschiedliche Regulation.

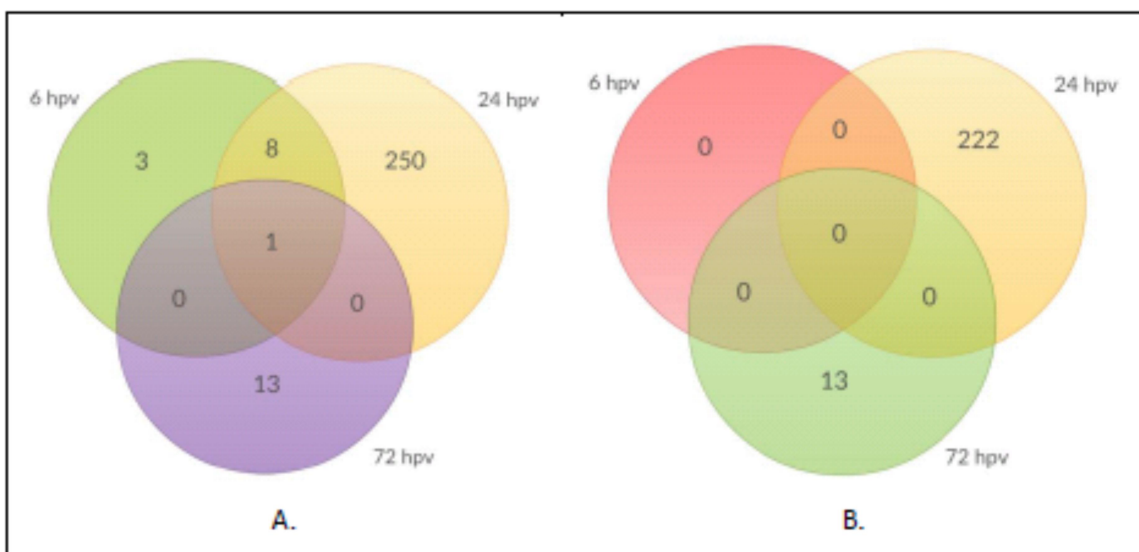


Abbildung 25 Venn-Diagramm der unterschiedlich exprimierten miRNAs für (A) Deutsche Landrasse und (B) Piétrain. Die Abbildung zeigt die Anzahl der Gene und ihre Überlappung

Die signifikantesten deregulierten miRNAs in den beiden Rassen sind in den hierarchischen Cluster zu entnehmen (Abb. 27). Der FC der unterschiedlich regulierten miRNAs in den drei Zeitpunkten ist in Tab. 8 abzulesen.

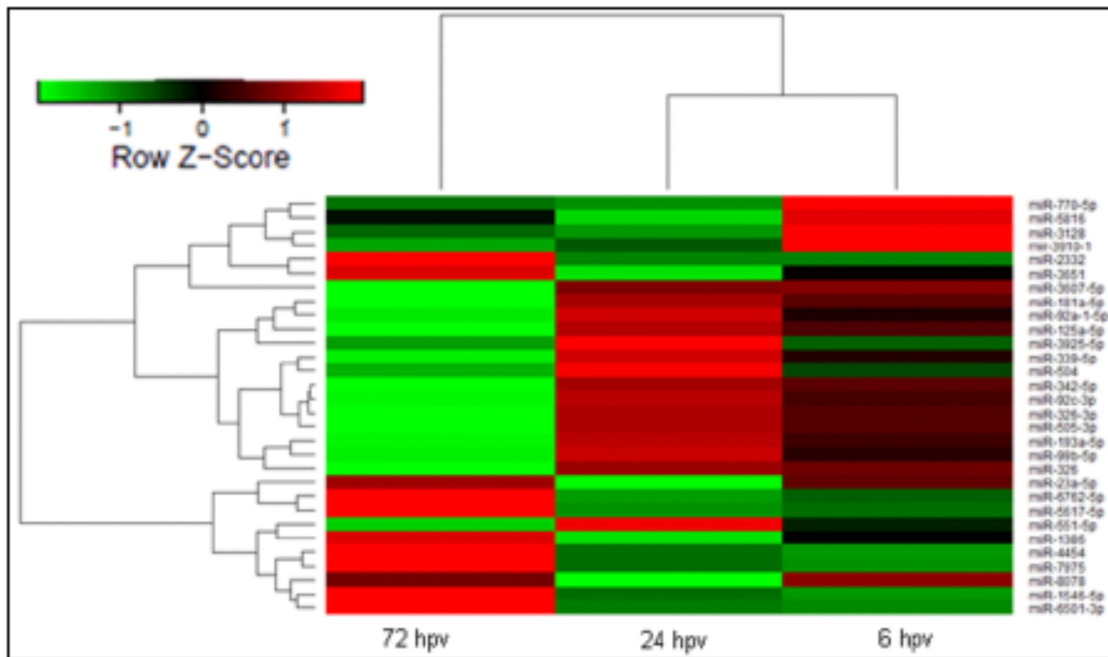


Abbildung 26 Hierarchische Cluster der unterschiedlich exprimierten miRNAs der Deutschen Landrasse über die unterschiedlichen Zeitpunkte hinweg

Tabelle 8 Signifikant unterschiedlich regulierten miRNAs und ihre Familien mit dem False Change für die unterschiedlichen Zeitpunkte

miRNA family	DE miRNAs	FC at 6 hpv	FC at 24 hpv	FC at 72 hpv	Adj. p-value
miR-99-100-5p	miR-99b-5p	0.323	1.877	-2.414	0.025603
miR-92a-1-5p	miR-92c-3p	0.536	1.0620	-0.901	0.047613
	miR-92a-1-5p	1.267	2.386	-0.366	0.047512
	miR-92a	0.310	0.912	-1.643	0.0452
miR-8078	miR-8078	-0.987	-2.149	-1.038	0.030413
miR-7975	miR-7975	-2.174	-2.033	-0.350	0.041625
miR-770-5p	miR-770-5p	2.952	0.857	0.992	0.047512
miR-6762	miR-6762-5p	-3.071	-3.263	-1.878	0.001859
miR-6501	miR-6501-3p	-1.744	-1.724	-1.176	0.026445
miR-5816	miR-5816	2.294	0.1419	1.117	0.037284
miR-5617/6845-5p	miR-5617-5p	-3.564	-3.714	-2.016	0.013784
miR-551b-5p	miR-551b-5p	-1.817	-1.257	-2.165	0.04174
miR-505	miR-505-3p	0.3188	0.660	-1.001	0.0452
	miR-4454	miR-4454	-1.978	-1.778	0.015
miR-3925-5p	miR-3925-5p	0.406	2.894	-0.032	0.007915
miR-3651	miR-3651	1.012	-0.156	2.054	0.003625
mir-3607	miR-3607-5p	3.764	3.730	2.139	0.001859
	mir-3607	1.617	1.231	0.611	0.047512
miR-342-5p	miR-342-5p	0.731	1.083	-0.878	0.018467
miR-339-5p	miR-339-5p	0.855	1.523	-0.218	0.0452
miR-326	miR-326	0.282	0.635	-2.946	0.001859
	miR-326-3p	0.650	1.140	-1.146	0.039885
miR-3128	miR-3128	2.266	-0.284	0.018	0.034879
miR-23-5p	miR-23a-5p	-1.939	-5.071	-1.421	0.015001
miR-2332	miR-2332	0.394	0.4054	2.603	0.026445
miR-193-5p	miR-193a-5p	0.919	1.982	-1.712	0.054896
miR-181-5p	miR-181b-5p	0.449	0.585	-1.127	0.0452
	miR-181a-5p	1.927	2.485	-0.783	0.0452
miR-181-5p	miR-181a-2-3p	0.073	1.755	-1.231	0.039851
	miR-181a	1.247	1.766	-0.091	0.026445
	miR-1546-5p	miR-1546-5p	-1.298	-1.263	-0.939
miR-1386	miR-1386	-2.122	-2.595	-1.670	0.004003
miR-125-5p	miR-125a-5p	2.037	3.120	-1.537	0.001859
	miR-125a-3p	-2.372	-3.452	-1.224	0.025603
	miR-125a	2.544	3.465	-0.763	0.007306

FC, Fold change; hpv, hours post vaccination; Adj. p-value, adjusted p-value after multiple test correction

3.10.2 Rassenspezifische miRNA Expression zwischen DL und Pi Schweinen

Die zeitliche Expressionsdynamik von PBMC miRNAs zeigte, dass die stärksten Veränderungen der miRNA Expression zum Zeitpunkt 24 h nach PRRSV-Impfung im Vergleich zur Kontrolle in beiden Rassen am ausgeprägtesten waren (Abb. 26). Daher wurde der Zeitpunkt 24 h nach der Impfung für den Rassenvergleich verwendet. Unter Berücksichtigung eines FDR $< 0,05$ und einem FC von $> 1,0$ und $< -1,0$, zeigten insgesamt 512 miRNAs eine ausgeprägtere differentielle Expression in DL und 79 in Pi Schweinen. Insgesamt waren 177 miRNAs in beide Rassen nach PRRSV-Impfung gemeinsam unterschiedlich reguliert (Tab. 9).

Tabelle 9 Rassenvergleich der durch Impfung induzierten unterschiedlich exprimierten miRNAs. Anzahl und Regulation der miRNAs.

Fold change	Number of DE miRNAs		
	More abundant in DL	More abundant in Pi	Shared in both breed
More than ± 1.0 to < 2.0	259	41	76
More than ± 2.0 to < 3.0	158	21	49
More than ± 3.0 to < 4.0	70	10	39
More than ± 4.0	25	7	12
Total	512 (Up: 376, Down: 136)	79 (Up: 51, Down: 28)	177 (Up: 102, Down: 75)

The number generated from two pairwise comparisons (24h.DL vs 0h. DL and 24h.Pi vs 0h.Pi) and their overlapping. The FDR value of < 0.05 was considered for statistical significance for all pairwise comparisons.

3.10.3 Vorhersage von mRNA-Targets für die DE miRNAs in PRRSV-geimpften PBMCs

Die Zielgenvorhersage für die unterschiedlich exprimierten miRNAs erfolgte mit dem TargetScan- und miRDB-Tool. Die Suche ergab insgesamt 2.909 mRNAs die als Zielgene für 20 der unterschiedlich exprimierten miRNAs prognostiziert wurden. Um die wahren Zielgene zu den unterschiedlich exprimierten miRNAs zu identifizieren, wurde die vorhergesagte Zielgenliste mit der tatsächlichen Genlisten (Gene aus der Microarrayanalyse) übereinander gelegt, diese bestand aus 2.453 mRNAs. Nach der Überlappung der zwei Listen wurden insgesamt 1.397 übereinstimmende mRNAs gefunden, die nach der PRRSV-Impfung als potentielle Zielgene der miRNAs in PBMCs angesehen wurden. Die wahren differentiell

exprimierten Zielgene die aus den überlappenden Ergebnissen generiert wurden, sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Top 10 der runterregulierten miRNAs und ihre unterschiedlich regulierten Zielgene

DE miRNAs	TDETGs
miR-6762-5p	MAF1, CYP17A1, PRSS8, KCNC1, AGER, TSPAN4, GPR123, ADAMTS14, SOHLH1, PHACTR1, IGLON5, TGFB1, CDCA3, KDR, ARRB1, CSPG4, FGR, CHAC1, XYLB, RAB17, KLHL25, RASSF7, RNF121, CDKN1A, FAM73B, AGPAT1, ZBTB47, TGFB3 & ITGA3
miR-551b-5p	DCTN3, SRC, DIS3L, PPAR, UNC119B, RNF208, WNT7A, MYL3, MRPL38, DIO3, LMO2, SLC25A45, P2RX6, UBAP1, WSCD2, TFEB, SBK1, KLHL31, GLYR1, NFIB, GRK1, BCKDHB, EFHD1, SEC24C, RAB3A, LMF2, PKM & NCS1
miR-125a-5p	ABCG8, PGF, EMP2, RASGRF1, EMILIN3, DIAPH1, PLA2G2D, EPS15L1, ASCC2, ESRRA, RAX2, NOVA2, PIANP, GTPBP2, NAIF1, PRRG4, ROR1, ASB13, SLCO3A1, CSNK1G2, CRLF1, CCDC113, EPN3, TMEM55B, ZNF335 & KAT8
miR-23a-5p	TMEM110, GJA9, COL4A2, EDC3, OXNAD1, TSGA13, SLC35B3, MICAL3, HDAC5, FBXW8, DNAJB13, GMPPB, PPP1R16B, UBL7, MED12L, SETX, PTPN21, BLCAP, SEMA5A, MEA1 & ACADSB
miR-181b	TSTD2, NTRK2, CLYBL, PHLDA1, ARMC8, TBCD, OTUB2, BTBD9, SF3A1, CHSY1, CEP78, KIF1B, MRPL13, NAP1L1, THUMPD3, MALT1, POLR3G, FOXRED2, MINPP1, ACAD11, ATP2B2, PIGN, MAPK14 & FAS
miR-4454	ZNF394, EBPL, RMND5B, CALCOCO2, SEL1L, TROAP, NECAP2, RPS23, RBP4, PIN1, SLC29A3, PDK1, CPE, NLRP6, ALG10, RAD51, ENPP5, JAKMIP2, NKX2-8, TRIM44, ICA1L, TIFA & TREM2
miR-8078	MYLK4, CEP250, SEMA4F, SOX9, POMT1, POLR3D, ATXN1, TRIM25, PIKFYVE, BAZ1B, MUC20, HEYL, RBM8A, MEGF9, GAS2L2, SMAD5, TRIM62, DNMBP, EPHA4 & ACACA
miR-7975	RNF150, PIGO, SLC9A2, SLC44A2, SFRP1, C2CD2, SYNGAP1, CD248, PPAPDC3, SLC35E1, PCGF5, EPAS1, PRKAB1, SHPK, TRPC4, LRIG2, POU2F1, CLSTN2, DPP8, CCDC93, SIN3B, TSHZ2, MAP3K9, STX17, RIPK4, N4BP3, ITPK1, ABHD2 & FBXL19
miR-5617-5p	TMTC4, KIF24, URGCP, DLX2, KRT5, SGCG, IVD, VPS39, CD8B, CERS3, FUZ, PML, SLC30A8, CDH23, NACC1, CUX1, PRR5, DNAJC11, TRPV6, GEMIN4, GAL3ST3, PPP3CB, S1PR2, TSPAN9, OTUB1, TBC1D10C & PLB1
miR-99b-5p	HS3ST2, LRRC8B & PI15

3.10.4 Integriertes miRNA-mRNA-Netzwerk für PRRSV-Impfstoffreaktionen in PBMCs

Das Netzwerk wurde auf Basis der runterregulierten miRNA und ihrer hochregulierten mRNA-Targets konstruiert (Abb. 28). Die anfängliche miRNA-mRNA-Interaktionsanalyse wurde zwischen Expressionsprofilen von 1.397 mRNA und 8 miRNAs erzeugt. Nach einer Korrelationsanalyse mit diesen Interaktionen konnten 289 Interaktionen mit inverser Korrelation in den Expressionswerte von miRNA und mRNAs identifiziert werden (Pearson-Korrelation < 0 und FDR $< 0,05$). Die Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von miRNAs und ihren vorhergesagten Zielgenen war relativ hoch und umgekehrt im Expressionsmuster, was darauf hindeutet, dass die verwendeten Vorhersagealgorithmen zuverlässig waren (Ahanda et al., 2012). Schließlich wurden diese 289 funktionalen Integrationen für die Netzwerkvisualisierung eingesetzt. Das kombinierte miRNA-mRNA-Netzwerk zeigte, dass miR-6762, miR-23a-5p, miR-181b-5p, miR-4454 und miR-125-5p hochvernetzte Knotenpunkte sind. Die am nächsten benachbarten Hauptgene dieser miRNAs umfassen u.a. SIRT1, FOS, ARNTL, PKM, CD9, WNT1, CDKN1A, ABCG2, VEGFA und TNFAIP3, die auch bereits aus den vorherigen Analysen bekannt sind. Diese Knoten-miRNAs können als mutmaßliche Regulatoren von zumindest teilweise von PRRSV-Impfstoff-induzierten Genexpressionsänderungen in PBMCs angesehen werden. Im Vergleich dazu identifizierte Cong et al. (2014) in einem miRNA-mRNA-interaktive Netzwerk, dass in H- und N-PRRSV infizierten PAMs profiliert wurde, eine differentielle Expression einiger zellulärer miRNAs, einschließlich ssc-miR-10a, 10b, 125a, 99b, 4332, 320, 1285, 210, 503. Eine gewebespezifische Expression und regulatorische Netzwerkanalyse von Schweine-miRNAome, identifizierten unterschiedliche miRNA-Familien in weißen Blutzellen einschließlich miR-15, miR-17, miR-181, miR-23, mir-27 und miR-29 Familien (Martini et al., 2014). Unter ihnen zeigte die miR-17-Familie, einschließlich der miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 und miR-92-1; und die miR-29-Familie, einschließlich der miR-29a, miR-29b und miR-29, die stärkste Expressionsausprägung in weißen Blutzellen von Schweinen (Martini et al., 2014). Unter den funktionellen miRNA-mRNA-Paaren in dieser Studie, zeigte miR-23a-5p die signifikanteste Runterregulation in PBMCs zu allen drei Zeitpunkten nach der PRRSV-Impfung. miR-23 ist eine konservierte miRNA-Familie, die in der antiviralen angeborenen Immunität verwickelt ist und die PRRSV-Replikation in PAMs beschränkt (Zhang et al., 2014). Ein anderes Mitglied (miR-23b) der miR-23-Familie ist bekannt für seine Aktivierung durch IL-17, TNF α , und IL-1 β , -vermittelte proinflammatorische Antwort durch die Auslösung von TAB2, TAB3 und IKK α (Zhu et al., 2012). Unser Ergebnis unterstreicht die Relevanz der miR-23-Familie in der Immunantwort auf den PRRSV-Impfstoff in PBMCs. Weiterhin, ist bekannt das die Mitglieder der miR-23-Familie als Wirtszellen-miRNA die PRRSV-Replikation, durch gezielte PRRSV-RNA

Modifikation und möglicherweise durch Hochregulierung der Typ-I-Interferon, hemmt (Zhang et al., 2014).

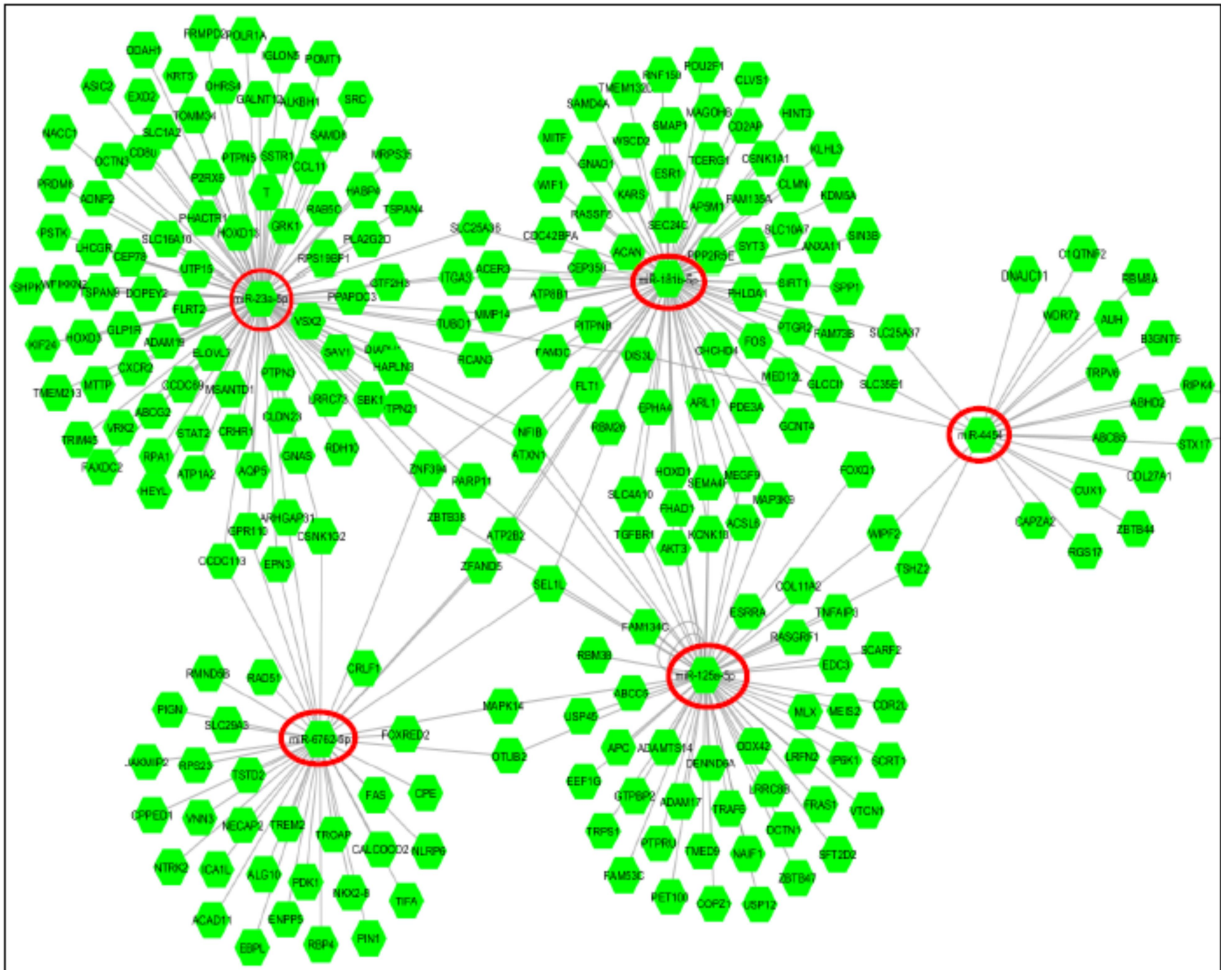


Abbildung 27 Integriertes Netzwerk von herunterregulierten miRNAs und ihren hochregulierten mRNAs in DL Tieren nach der Impfung. Die roten Kreise stehen für die miRNAs und ihre Verbindungen zu den Genen

3.10.5 Funktionelle Annotation des miRNA-mRNA-Netzwerks

Die Liste der 289 hochregulierten mRNAs, die in dem kombinierten Netzwerk aktiv waren, wurde für die funktionelle Annotation einer GO- und Signalweganalyse unter Verwendung des InnateDB-Pathway-Analyse-Tools (Breuer et al., 2013) unterzogen. Die signifikanten GOs und Signalwege umfassen die Proteinkinase-Bindung, die Reaktion auf toxische Substanzen und die Regulation der MAPK-Kinase-Aktivität, die TGF-beta-Signalisierung, die Signaltransduktion, das Ap1-Transkriptionsfaktor-Netzwerk und der Toll Like Rezeptor-Weg (Abb. 29). Dies ist ein Indiz für die Beteiligung von miRNA-mRNA-Paaren an der Entwicklung der Immunantwort in PBMCs nach PRRSV-Impfung bei Schweinen.

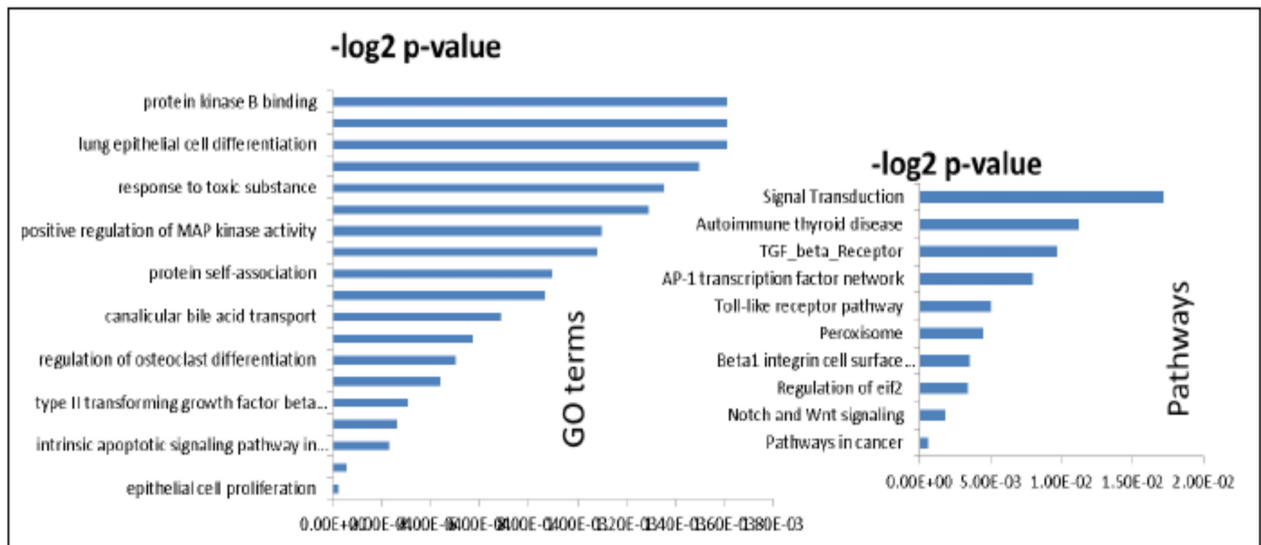


Abbildung 28 Signifikante Signalwege und GOs der Zielgene der unterschiedlich exprimierten miRNAs für DL Tiere

Es konnten wesentliche Veränderungen in den miRNA-Expressionsprofilen nach einer PRRSV-Impfung beobachtet werden. Die zeitlichen Veränderungen der miRNAs-Expressionsprofile von PBMCs innerhalb der ersten drei Tage zeigten das Potential der Impfung zur Beeinflussung des Transkriptionsmechanismus der angeborenen Immunantwort. Darüber hinaus erlaubte die integrative Analyse der gepaarten miRNAs und der mRNAs, die in den identischen Proben profiliert wurden, robustere miRNA-mRNA-Co-regulatorische Netzwerke zu erforschen, die potentiell mit der Immunantwort auf den PRRSV-Impfstoff in PBMCs beteiligt sind. Im Vergleich haben ähnliche Studien berichtet, dass Schweine-miRNA in Wirts-PRRSV-Interaktionsnetzwerken in PAMs aktiv sind (Cong et al., 2014, Li et al., 2015).

4 Zusammenfassung

Das Porcine Reproductive und Respiratorische Syndrom (PRRS) ist eine der wichtigsten Krankheitskomplexe weltweit und verursacht enorme Verluste und Schäden in der Schweineproduktion. Viele Faktoren spielen bei der Krankheitsentstehung eine entscheidende Rolle wie, die Managementleistungen, die Betriebsgröße und -struktur, die Stallhygiene, das Alter und die genetische Herkunft der Tiere. Die Kontrolle dieser Krankheit bleibt problematisch, so lange keine effizienteren Impfstoffe entwickelt worden sind und der Virus durch die hohe Mutationsrate ständig im Wandel ist. Eine weitere Möglichkeit, PRRS zu kontrollieren, bieten Zuchtprogramme, die die Krankheitsresistenz und -toleranz steigern. Das Verständnis der Einflussnahme von genetischen Elementen und Funktionen auf die Immunreaktion post PRRSV ist daher von großer Wichtigkeit. Daher zielte dieses Projekt darauf ab Kandidatengene des funktionellen Netzwerks der wirtsspezifischen Immunantwort auf den PRRS-Virus (PRRSV) Impfstoff bei Schweinen zu identifizieren; um transkriptionale Unterschiede durch den induzierten Impfstoff in den zwei Schweinerassen Deutschen Landrasse (DL) und *Piétrain* (Pi) zu erkunden; und die von Post-transkriptionellen Mechanismen bedingt durch den Impfstoff in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aufzuklären.

Für das in vivo Immunisierungsmodell wurden reinrassigen DL und Pi Schweinen nach dem Absetzen (28 Tage) verwendet. Die Tiere wurden 2-fach geimpft, kurz nach dem Absetzen und im Alter von 56 Tagen zur Auffrischung. Zur Erstellung der Transkriptomprofile der Boten-RNA (mRNA) sowie der microRNA (miRNA) ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 6, 24, 27 h) nach der PRRSV Impfung Blut gezogen worden und mittels der Affymetrix GeneChip-Microarray-Technik konnten unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert werden. Zusätzlich wurden die Microarray Ergebnisse mittels qRT-PCR validiert und die PRRSV-spezifischen Plasma Antikörpertiter durch ELISA bestimmt.

Der PRRSV-spezifischen Plasma Antikörpertiter ergab, dass die Ferkel frei von mütterlichen Antikörpern zum Zeitpunkt der Erstimpfung waren, dann nach der ersten Impfung, innerhalb von 2 Wochen, stieg der Titer über dem Grenzwert, und erreichte sein Plateau vier Wochen später. Der Vergleich der globalen mRNA Transkriptomprofile von PBMCs von PRRSV geimpft und nicht geimpften DL Schweinen unmittelbar vor 0 und mit 6, 24 und 72 h nach der Impfung ergab eine deutlich angeborene transkriptionelle Wirts Immunreaktion. Insgesamt zeigten 14.231 Transkripte in PBMCs von geimpften und nicht geimpften Schweine eine unterschiedliche Expression. Es konnten mit einer FDR < 0,01 und FC > ± 1,5 542, 2.263 und 357 differentiell exprimierte Gene 6, 24 und 72 h nach der Impfung identifiziert werden. Netzwerkanalysen ergaben eine genauere Darstellung der Interaktionen dieser vielen Gene und identifizierten einige Hauptgene als Regulatoren. Als potenzielle

Kandidatengene für das frühe Stadium der Impfreaktion konnten daher APP, TRAF6, PIN1, FOS, CDKN1A und TNFAIP3 identifiziert werden.

In Piétrain Schweinen waren 295 und 116 Transkripte in PBMCs an Tag 1 und 28 nach der Impfung unterschiedlich exprimiert. Auch hier zeigen die Netzwerkanalysen einige Hauptgene auf. Das angeborene Immunnetzwerk wird wahrscheinlich durch LCK, STAT3, ATP5B, UBB und RSP17 geregelt; während sich TGF β 1, IL7R, Rad21, SP1 und GZMB für die adaptive Immunreaktion auf den PRRSV-Impfstoff in PBMCs von Pi-Schweinen als prädiktiv erwiesen.

Die microRNA-Profile von PBMCs identifiziert 12, 259 und 14 unterschiedlich exprimiert miRNAs in DL; und 0, 222 und 13 miRNAs in Pi, 6, 24 und 72 h nach der Impfung. Es gab deutliche Unterschiede bei der Expressionsdynamik sowohl bei der mRNAs als auch miRNAs zwischen DL und Pi Schweine, was für eine rassenspezifische Immunantwort spricht. Pi Schweine reagieren langsamer in ihrer Genregulation auf das Eindringen eines Virus wie DL Schweine. Integrierte mRNA-miRNA-Netzwerke zeigen eine inverse Korrelation zwischen der durch den Impfstoff induzierten veränderten mRNAs und miRNAs Expression in PBMCs. Die Ergebnisse dieser immunogenomischen Studie erweitert unser Verständnis über die genetische Kontrolle von PRRS.

5 Anhang

6 Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Wir konnten in diesem Projekt ein PBMCs-Transkriptom-Modell für die Bewertung der Immun-Reaktion auf PRRSV-Impfung bei Schweinen etablieren. Da PBMCs eine der am leichtesten zugänglichen biologischen Proben sind, könnte dieses Modell für eine Aufdeckung von geeigneten Biomarkern in größeren Schweinepopulationen umgesetzt werden. Diese Studie identifizierte einige potenzielle Kandidatengene, die voraussichtlich für die PRRSV-Impfstoffreaktionen im peripheren Blut prädiktiv sind, jedoch ist eine weitere Validierung erforderlich, um ihre Assoziation mit der Wirtsimmunantwort auf den PRRS-Impfstoff zu bestätigen. PRRSV-Impfstoff infizierte DL PBMCs reagierten effektiver in ihrer exprimierten Immunantwort als Piétrain PBMCs. Die langsamere Reaktion der Piétrain Rasse konnte auch bereits in unserem vorherigen in-vitro Projekt in den dendritischen Zellen der Lungen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis sollte in einer Modifizierung der Zuchtstrategien berücksichtigt werden. Genauso sollten die identifizierten Schlüssel-Cluster, Schlüssel-Signalwege und Gene ebenfalls für die Prävention und in der Impfstoffentwicklung genutzt werden. Epigenetische Mechanismen spielen eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Immunreaktion. miRNAs könnten in der Zukunft geeignete Biomarker sein, die an Hand einer

Blutprobe bestimmt werden könnten und so einfach in der Selektion mit einbezogen werden können.

7 Referenzen

- Abatangelo L, Maglietta R, Distaso A, D'Addabbo A, Creanza TM, Mukherjee S, Ancona N (2009): Comparative study of gene set enrichment methods. *BMC Bioinformatics* 10, 1471-2105
- Adler M, Murani E, Brunner R, Ponsuksili S, Wimmers K (2013a): Transcriptomic response of porcine PBMCs to vaccination with tetanus toxoid as a model antigen. *PLoS ONE* 8(3), e58306
- Adler M, Murani E, Ponsuksili S, Wimmers K (2013b): PBMC transcription profiles of pigs with divergent humoral and immune responses and lean growth performance. *Int J Biol Sci.* 9(9), 907-916
- Albina E (1997): Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55, 309-316
- 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
- Badaoui B, Tuggle CK, Hu Z, Reecy JM, Ait-Ali T, Anselmo A, Botti S (2013): Pig immune response to general stimulus and to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection: a meta-analysis approach. *BMC Genomics* 14, 1471-2164
- 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.
- Bartel DP (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995): Controlling the false discovery rate: A typical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 57, 289-300
- Breuer K, Foroushani AK, Laird MR, Chen C, Sribnaia A, Lo R, Winsor GL, Hancock RE, Brinkman FS, Lynn DJ (2013): InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res* 41 (Database), D1228-D1233
- 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/>
- Cantu E, Lederer DJ, Meyer K, Milewski K, Suzuki Y, Shah RJ, Diamond JM, Meyer NJ, Tobias JW, Baldwin DA, Van Deerlin VM, Olthoff KM, Shaked A, Christie JD (2013): Gene set enrichment analysis identifies key innate immune pathways in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant* 13, 1898-1904
- Carvalho BS, Irizarry RA (2010): A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 26, 2363-2367
- Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahrm M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR (2002): Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* 32, 509-514
- Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcovne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailva A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowsky B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD (2007): Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2, 2366-82
- Coll M, El Taghdouini A, Perea L, Mannaerts I, Vila-Casadesus M, Blaya D, Rodrigo-Torres D, Affo S, Morales-Ibanez O, Graupera I, Lozano JJ, Najimi M, Sokal E, Lambrecht J, Gines P, van Grunsven

- LA, Sancho-Bru P (2015): Integrative miRNA and Gene Expression Profiling Analysis of Human Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep* 5:11549, doi:10.1038/srep11549
- 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
- Cong P, Xiao S, Chen Y, Wang L, Gao J, Li M, He Z, Guo Y, Zhao G, Zhang X, Chen L, Mo D, Liu X (2014): Integrated miRNA and mRNA transcriptomes of porcine alveolar macrophages (PAM cells) identifies strain-specific miRNA molecular signatures associated with H-PRRSV and N-PRRSV infection. *Mol Biol Rep* 41, 5863-5875
- 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.
- Ebert BL, Golub TR (2004): Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood* 104, 923-932
- Eklund AC, Turner LR, Chen P, Jensen RV, deFeo G, Kopf-Sill AR, Szallasi Z (2006): Replacing cRNA targets with cDNA reduces microarray cross-hybridization. *Nat Biotechnol* 24(9), 1071-83
- Endale Ahanda ML, Fritz ER, Estelle J, Hu ZL, Madsen O, Groenen MA, Beraldi D, Kapetanovic R, Hume DA, Rowland RR, Lunney JK, Rogel-Gaillard C, Reecy JM, Giuffra E (2012): Prediction of altered 3'-UTR miRNA-binding sites from RNA-Seq data: the swine leukocyte antigen complex (SLA) as a model region. *PLoS ONE* 7(11), e48607
- Gao Y, Flori L, Lecardonnell J, Esquerre D, Hu ZL, Teillaud A, Lemonnier G, Lefevre F, Oswald IP, Rogel-Gaillard C (2010): Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomics* 11, 1471-2164
- Garcia-Nicolas O, Quereda JJ, Gomez-Laguna J, Salguero FJ, Carrasco L, Ramis G, Pallares FJ (2014): Cytokines transcript levels in lung and lymphoid organs during genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* 160, 26-40
- Gardy JL, Lynn DJ, Brinkman FS, Hancock RE (2009): Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. *Trends Immunol* 30, 249-262
- 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
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004): Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, 15
- Hansen JD, Vojtech LN, Laing KJ (2011): Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol* 35, 886-897
- Huang TH, Uthe JJ, Bearson SM, Demirkale CY, Nettleton D, Knetter S, Christian C, Ramer-Tait AE, Wannemuehler MJ, Tuggle CK (2011): Distinct peripheral blood RNA responses to Salmonella in pigs differing in Salmonella shedding levels: intersection of IFNG, TLR and miRNA pathways. *PLoS ONE* 6(12), e28768
- Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Olsen C, Irwin C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A, Main R, Johnson J, Rademacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J (2012): Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a

- commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 24, 262-269
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20
- Li J, Yu YJ, Feng L, Cai XB, Tang HB, Sun SK, Zhang HY, Liang JJ, Luo TR (2010): Global transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cell during classical swine fever virus infection. *Virus Res* 148, 60-70
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408
- Liu G, Loraine AE, Shigeta R, Cline M, Cheng J, Valmeekam V, Sun S, Kulp D, Siani-Rose MA (2003): NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res* 31, 82-86
- Li J, Chen Z, Zhao J, Fang L, Fang R, Xiao J, Chen X, Zhou A, Zhang Y, Ren L, Hu X, Zhao Y, Zhang S, Li N (2015): Difference in microRNA expression and editing profile of lung tissues from different pig breeds related to immune responses to HP-PRRSV. *Sci Rep* 5:9549, doi: 10.1038/srep09549
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ (2016): Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci* 4, 129-154
- Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, Archambault D, Dea S (1996): Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 141, 751-761
- Macneil LT, Walhout AJ (2011): Gene regulatory networks and the role of robustness and stochasticity in the control of gene expression. *Genome Res* 21: 645-657.
- Martini P, Sales G, Brugiolo M, Gandaglia A, Naso F, De Pitta C, Spina M, Gerosa G, Chemello F, Romualdi C, Cagnin S, Lanfranchi G (2014): Tissue-specific expression and regulatory networks of pig microRNAome. *PLoS One* 9(4), e89755
- 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* 864181, doi: 10.1155/2010/864181
- 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
- Nathan W, Xiaowei W (2015): miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 43(D1), D146-152
- 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*
- Nielsen J, Botner A (1997): Hematological and immunological parameters of 4 1/2-month old pigs infected with PRRS virus. *Vet Microbiol* 55, 289-294
- Ojha S, Kostrzynska M (2008): Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Vet Res* 39, 25
- Pancer Z, Cooper MD (2006): The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24, 497-518

- Papareddy P, Morgelin M, Walse B, Schmidtchen A, Malmsten M (2012): Antimicrobial activity of peptides derived from human ss-amyloid precursor protein. *J Pept Sci* 18, 183-191
- Patel D, Nan Y, Shen M, Ritthipichai K, Zhu X, Zhang YJ (2010): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol* 84, 11045-11055
- 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
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45
- 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
- Rossow KD (1998): Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* 35, 1-20
- Rowland RR, Lunney J, Dekkers J (2012): Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) through genetic improvements in disease resistance and tolerance. *Front Genet* 3, doi: 10.3389/fgene.2012.00260
- Rozen S, Skaletsky H (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386
- Schena M (1996): Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 18, 427-431
- Seth RB, Sun L, Chen ZJ (2006): Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* 16, 141-147
- Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T (1996): Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol* 50, 19-27
- Shoemaker JE, Lopes TJ, Ghosh S, Matsuoka Y, Kawaoka Y, Kitano H (2012): CTen: a webbased platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC Genomics* 13, 1471-2164
- Smyth GK (2005): Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, editors. *Bioinformatics and computational biology solutions using r and bioconductor*. Springer USA pp. 397-342
- 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
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005): Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550
- Suradhat S, Thanawongnuwech R and Poovorawan Y (2003): Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 84:453-459.
- 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 Q* 13(3), 121-130 *Assoc* 227, 385-392
- Wilkinson JM, Dyck MK, Dixon WT, Foxcroft GR, Dhakal S, Harding JC (2012): Transcriptomic analysis identifies candidate genes and functional networks controlling the response of porcine peripheral blood mononuclear cells to mitogenic stimulation. *J Anim Sci* 90, 3337-3352

- Xia J, Benner MJ, Hancock RE (2014): NetworkAnalyst--integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration. *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue), W167-74
- 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 genomewide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS ONE* 5(6), 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, 1471-2164
- Yoo D, Song C, Sun Y, Du Y, Kim O, Liu HC (2010): Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154, 48-60
- Zhang Q, Guo XK, Gao L, Huang C, Li N, Jia X, Liu W, Feng WH (2014): MicroRNA-23 inhibits PRRSV replication by directly targeting PRRSV RNA and possibly by upregulating type I interferons. *Virology* 451, 182-195
- Zhu S, Pan W, Song X, Liu Y, Shao X, Tang Y, Liang D, He D, Wang H, Liu W, Shi Y, Harley JB, Shen N, Qian Y (2012): The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha. *Nat Med* 18 (7), 1077-86
- 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

8 Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten

Deutschland einer der größten Schweineproduzenten weltweit und PRRS ist von großer Bedeutung in Bezug auf schlechte Wachstumsleistung, Fortpflanzungsbeeinträchtigung und Tierschutz. Die Landrace und Piétrain sind zwei führende Rassen für die kommerzielle Schweineproduktion in der Welt einschließlich Deutschland. Daher könnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine Bereicherung für die Schweinezuchtstrategie durch genetische Kontrolle von PRRS sein. Für eine verbesserte genetische Resistenz gegen Erkrankungen, die für die Marker-unterstützte Selektion oder die genomweite Auswahl nützlich sind, ist jedoch eine sorgfältigere Planung erforderlich. In nächsten Schritten sollte nun eine tiefere Sondierung von Allelen und Haplotypen, die an der Bekämpfung spezifischer antiviraler Reaktionen beteiligt sind, sowie eine Bestimmung spezifischer Gene und ihrer SNPs, die mit antiviralen angeborenen Immunität und Impfstoffreaktionen assoziiert sind, in größeren Populationen untersucht werden. Des Weiteren, sollte die Ergebnisse der epigenetischer Untersuchung tiefergehend betrachtet werden, da miRNAs als mögliche Biomarker in der Zucht eingesetzt werden könnten. Ein weiteres Ziel, sollte die Ausdehnung der Analyse auf weitere Erkrankungen sein (viral, bakteriell) um, gemeinsame regulatorische Mechanismen für einen robusteren Phänotyp zu identifizieren.

9 Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte

10 Liste über Veröffentlichungen

Islam, Md. Aminul (2017): Global mRNA and miRNA transcriptome profiling of peripheral blood mononuclear cells to investigate the host immunogenetic responses to PRRSV vaccination in pigs (Erstellung von globalen mRNA und miRNA Transkriptomprofilen in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zur Untersuchung der Wirts immunogenetischen Reaktion auf eine PRRSV Impfung bei Schweinen) URN: urn:nbn:de:hbz:5n-46218

Islam M A, Uddin M J, Rony S A, Pröll M, Grosse-Brinkhaus C, Yang Q, Zhang R, Tholen E, Looft C, Tesfaye D, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2015): Analyses of PBMC transcriptome profiles after porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination in German landrace pigs. Vortragstagung der DGfZ und GfT, 16./17.9.2015, Berlin, Germany, Tagungsband: D13 (Abstr)

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Comparative analyses of PBMC transcriptome profiles between German Landrace and Pietrain pigs following PRRSV vaccination. Vortragstagung der DGfZ und GfT, 20./21.9.2016, Hannover, Germany, Tagungsband: B03 (Abstr)

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hölker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Deciphering transcriptome profiles of peripheral blood mononuclear cells in response to PRRSV vaccination in pigs. BMC Genomics 17, 1: 641

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Aqter Rony S, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2017): PBMC transcriptome profiles identifies potential candidate genes and functional networks controlling the innate and the adaptive immune response to PRRSV vaccine in Pietrain pig. PLoS One 12, 3: e0171828

11 Liste über Vorträge

Islam M A, Uddin M J, Rony S A, Pröll M, Grosse-Brinkhaus C, Yang Q, Zhang R, Tholen E, Looft C, Tesfaye D, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2015): Analyses of PBMC transcriptome profiles after porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination in German landrace pigs. Vortragstagung der DGfZ und GfT, 16./17.9.2015, Berlin, Germany, Tagungsband: D13 (Abstr)

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Comparative analyses of PBMC transcriptome

profiles between German Landrace and Pietrain pigs following PRRSV vaccination. Vortragstagung der DGfZ und GfT, 20./21.9.2016, Hannover, Germany, Tagungsband: B03 (Abstr)

12 Liste über Pressemitteilungen

13 Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen, Demonstrationen

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Transcriptome profiling of the peripheral blood mononuclear cells following PRRSV vaccination in Pietrain pig. 35th International Society for Animal Genetics Conference, 22.-27.7.2016, Salt Lake City, Utah, USA, Book of Abstracts: 121 (Abstr)

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Comparative analyses of PBMC transcriptome profiles between German Landrace and Pietrain pigs following PRRSV vaccination. 36th International Society for Animal Genetics Conference, 16.-21.7.2017, Dublin, Irland, Book of Abstracts (Abstr)

Islam M A, Grosse-Brinkhaus C, Pröll M, Uddin M J, Rony S A, Tesfaye D, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Neuhoff C (2016): Integrated network analysis for mRNAs and miRNAs expressed in PRRSV vaccinated peripheral blood mononuclear cells of pigs. 36th International Society for Animal Genetics Conference, 16.-21.7.2017, Dublin, Irland, Book of Abstracts (Abstr)

14 Kurzfassung Deutsch

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, Kandidatengene des funktionellen Netzwerks der wirtsspezifischen Immunantwort auf den PRRS-Virus (PRRSV) Impfstoff bei Schweinen zu identifizieren; um transkriptionale Unterschiede durch den induzierten Impfstoff in den zwei Schweinerassen Deutschen Landrasse (DL) und *Piétrain* (Pi) zu erkunden; und die Aufklärung von Post-transkriptionellen Mechanismen bedingt durch den Impfstoff in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Zur Erstellung der Transkriptomprofile der Boten-RNA (mRNA) sowie der microRNA (miRNA) in reinrassigen DL und Pi Schweinen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der PRRSV Impfung wurde die Affymetrix Gen-Chip-Microarray-Technik eingesetzt. Zusätzlich wurden die Microarray Ergebnisse mittels qRT-PCR validiert und die PRRSV-spezifischen Plasma Antikörpertiter durch ELISA bestimmt. Durch den PRRSV-spezifischen Plasma Antikörpertiter zeigte sich, dass die Ferkel frei von mütterlichen Antikörpern zum Zeitpunkt der Erstimpfung waren. Nach der ersten Impfung stieg der Titer in den folgenden zwei Wochen über dem Grenzwert, und erreichte sein Plateau vier Wochen nach der Impfung. Die Betrachtung der globalen mRNA Profile von PBMCs von PRRSV geimpft und ungeimpften DL Schweinen unmittelbar vor 0 und mit 6, 24 und 72 h nach der Impfung ergab eine deutlich angeborene transkriptionelle Wirts Immunreaktion. Insgesamt waren 14.231 Transkripte in PBMCs von geimpften und nicht geimpften Schweine exprimiert. Die Expressionsanalyse (FDR <0,01 und FC > ± 1,5) identifiziert 542, 2263 und 357 differentiell exprimierte Gene 6, 24 und 72 h nach der Impfung. Als potenzielle Kandidatengene für das frühe Stadium der Impfreaktion konnten APP, TRAF6, PIN1, FOS, CDKN1A und TNFAIP3 identifiziert werden. In *Piétrain* Schweinen waren 295 und 116 Transkripte in PBMCs an Tag 1 und 28 nach der Impfung unterschiedlich exprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das angeborene Immunnetzwerk wahrscheinlich durch LCK, STAT3, ATP5B, UBB und RSP17 geregelt wird; während sich TGFβ1, IL7R, Rad21, SP1 und GZMB für die adaptive Immunreaktion auf den PRRSV-Impfstoff in PBMCs von Pi-Schweinen als prädiktiv erwiesen. Die microRNA-Profile von PBMCs identifiziert 12, 259 und 14 unterschiedlich exprimiert miRNAs in DL; und 0, 222 und 13 miRNAs in Pi, 6, 24 und 72 h nach der Impfung. Es gab deutliche Unterschiede bei der Expressionsdynamik sowohl bei der mRNAs als auch miRNAs zwischen DL und Pi Schweine. Integrierte mRNA-miRNA-Netzwerke zeigen eine inverse Korrelation zwischen der durch den Impfstoff induzierten veränderten mRNAs und miRNAs Expression in PBMCs. Die Ergebnisse dieser immunogenomischen Studie erweitert unser Verständnis über die genetische Kontrolle von PRRS.

15 Kurzfassung Englisch

This dissertation aims to identify the candidate genes of the functional network of host immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs; to explore the breed differences on vaccine induced transcriptional response between German Landrace (DL) and Piétrain (Pi) pigs; and to elucidate the post transcriptional regulatory mechanism of vaccine induced gene expression in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The Affymetrix gene chip microarray technique was employed for global expression profiling of messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) in PBMCs collected in a time series manner following PRRSV vaccination in purebred DL and Pi pigs. Additionally, microarray expression results were validated by qRT-PCR and the PRRSV-specific plasma antibody titre was monitored by ELISA. The PRRSV-specific plasma antibody titre indicated the piglets free from maternal antibody at the time of primary vaccination and rose above the threshold following two weeks of the primary vaccination that subsequently reached a plateau at four weeks post vaccination. The global mRNA profiling of PBMCs from PRRSV vaccinated and age-matched unvaccinated Landrace pigs at immediately before (0 h), and at 6, 24 and 72 h after PRRSV vaccination revealed a distinct host innate immune transcriptional response. A total of 14,231 transcripts were found to be expressed in PBMCs of vaccinated and unvaccinated pigs. Differential expression analysis ($FDR < 0.01$ and $FC > \pm 1.5$) identified 542, 2,263 and 357 differentially expressed genes at 6, 24 and 72 h post vaccination. APP, TRAF6, PIN1, FOS, CDKN1A and TNFAIP3 identified to be potential candidate genes for early stage PRRSV vaccine response in Landrace pigs. In Pietrain pigs, 295 and 116 transcripts were found to be differentially expressed in PBMCs at 1 and 28 days post vaccination, respectively. This study suggested that the innate immune transcriptional network is likely to be regulated by LCK, STAT3, ATP5B, UBB and RSP17; while TGF β 1, IL7R, RAD21, SP1 and GZMB were found to be predictive for the adaptive immune transcriptional response to PRRSV vaccine in PBMCs of Pi pigs. The global microRNA profiles of PBMCs identified 12, 259 and 14 differentially expressed (DE) miRNAs in DL; and 0, 222 and 13 DE miRNAs in Pietrain at 6, 24 and 72 h post vaccination, respectively. There were remarkable differences on expression dynamics of both mRNAs and miRNAs between DL and Pi pigs. Integrated mRNA-miRNA network revealed the inverse correlation between vaccine induced altered mRNAs and miRNAs in PBMCs. Results of this immunogenomics study advances our understanding on the genetic control of PRRS.