

# ***In vitro* und *in vivo* Expressionsprofile von Zytokinen nach Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Anastasia Lange  
geboren am 25.10.1981 in Lipezk/Russland

2010

Referentin: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Irene Greiser-Wilke

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 21.07.2010

meiner Mutter



### Zusammenfassung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine virale Erkrankung, die durch das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) verursacht wird und bei Haus- und Wildschweinen auftritt. Die anzeigepflichtige Erkrankung gehört zu den weltweit bedeutendsten Tierseuchen. Sie wird durch ein einzelsträngiges RNA-Virus aus dem Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* verursacht.

Die akut-letale Verlaufsform der KSP ist ein hämorrhagisches Fieber, das u. a. durch eine Leukopenie, eine erhöhte vaskuläre Permeabilität sowie Petechien und Hämorrhagien gekennzeichnet ist. Besonders hoch virulente KSPV-Stämme sind vor allem bei jungen Tieren für die Ausbildung hämorrhagischer Symptome verantwortlich. Bisher ist die Pathogenese trotz langjähriger Forschung ungeklärt. Es gibt Hinweise, dass wie bei anderen hämorrhagischen Fiebern die erhöhte / reprimierte Expression von Zytokinen u. a. die Entstehung der Hämorrhagien bewirken könnten.

Um erste Hinweise der hoch- bzw. runterregulierten Zytokine und anderer Mediatoren zu erhalten, wurde die Genexpression in nicht-infizierten und infizierten Zellen, die mit einem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert waren, in der Seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) untersucht. Ein Vergleich der SAGE-Bibliotheken von nicht-infizierten und infizierten Zellen ergab, dass bis auf das hochregulierte Interleukin 8 (IL-8) die Expression keiner weiteren Zytokine verändert war.

In einem weiteren Ansatz wurden Genexpressionsprofile (mRNA Level) der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) in der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) untersucht. Von diesen Zytokinen ist bekannt, dass sie in unterschiedlichen Zellpopulationen Apoptose auslösen sowie zu einer vaskulären Fehlfunktion beitragen können, aber auch bei viralen Infektionen aktiviert werden. Sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Infektionsversuchen wurde der Einfluss dreier KSPV-Stämme unterschiedlicher Virulenz im Hinblick auf Zytokininduktion bzw. Inhibition untersucht. Außerdem wurden die Zytokin-Genexpressionen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von Schweinen unterschiedlicher Altersstufen analysiert. Die Zellen stammten sowohl aus *in vivo* infizierten als auch aus klinisch gesunden Tieren. Hier wurden die isolierten PBMCs

*in vitro* infiziert. Zusätzlich wurde die Zytokinexpression in zwei verschiedenen nicht-infizierten und infizierten Zellkulturen analysiert.

Die Analyse der Zytokinexpressionen in den Zellkulturen, in denen der Einfluss eines hoch, eines moderat und eines avirulenten KSPV-Isolats untersucht wurde, zeigten keine signifikanten Veränderungen, wobei IL-1 $\beta$  in diesen Zellen weder in den nicht-infizierten noch in den infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte.

Da in den Zellkulturen der moderat und der avirulente KSPV-Stamm keine Veränderungen der Zytokin-Genexpression zeigten, wurden PBMCs aus Schweinen unterschiedlicher Rassen und Altersstufen in *in vitro* Versuchen nur mit dem hoch virulenten KSPV-Isolat infiziert. Ein Vergleich nicht-infizierter und infizierter Zellen zeigte, dass in infizierten Zellen die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  einen Anstieg aufwiesen, wohingegen die IFN- $\beta$  Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten unverändert blieb. Die Zytokin mRNA-Level, die in PBMCs junger Schweine untersucht wurden, variierten stärker als bei PBMCs älterer Tiere.

In den PBMCs *in vivo* infizierter Tiere war die mRNA Konzentration des IL-8 in infizierten Zellen als einziges der untersuchten Zytokine am Anfang der Infektion stark reprimiert. Die anderen Zytokine wiesen keine Veränderungen auf.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Ergebnisse aus der *in vitro* Studie nicht ohne Weiteres auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden können, da zumindest die Expression der hier untersuchten Zytokine von vielen Faktoren, wie z. B. dem Alter und dem Immunstatus der Schweine, beeinflusst werden.

Schlagworte: Klassische Schweinepest, Genexpressionsanalyse, mRNA, Zytokine

## Abstract

Classical swine fever (CSF) is a notifiable disease, being one of the most important diseases of pigs worldwide. CSF is caused by the Classical swine fever virus (CSFV) which is a single-stranded RNA virus of the genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae*.

CSF caused by highly virulent strains of CSFV is a haemorrhagic fever especially of young pigs characterized by leukopenia, increased vascular permeability, petechial bleedings and haemorrhages. So far, little is known about the molecular mechanisms behind the pathogenesis of CSF. It is believed that changes in cytokine gene expression could contribute to the haemorrhagic form of the disease.

For the analysis of gene expression in non-infected and infected cells Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) was used, as this method allows screening of up- or down-regulated genes, and could give an overview of altered expression of affected cytokines and other mediators. For this, libraries of cells of non-infected and infected cultures were prepared. A highly virulent CSFV strain was used for the infection. The only cytokine affected was the up-regulated interleukin 8 (IL-8).

In a second step the cytokine mRNA expression profiles of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) were analysed by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). For this, *in vivo* as well as *in vitro* infection studies were performed to analyse the influence of three CSFV strains of different virulence on the induction or inhibition of cytokines. These cytokines were chosen as it is known that they can induce apoptosis in different cell populations, lead to vascular dysfunction and are activated during viral infection. In addition, cytokine gene expression profiles were studied in pigs of different ages. For that, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from infected as well as from healthy pigs. These last ones were infected *in vitro*. Gene expression levels in two different non-infected and infected cell cultures were also analysed.

Analysis of cytokine gene expression in cell cultures, in which the influence of a highly, a moderate and a non virulent CSFV strain was studied, did not show any significant changes. Neither in the non-infected nor in the infected cell cultures IL-1 $\beta$  was detected.

Because the non virulent and the moderate virulent CSFV strain did not show changes in the mRNA levels compared to the cell cultures, further studies were

## Abstract

---

performed using a highly virulent strain only. For that, PBMCs from healthy pigs were isolated and infected *in vitro*. The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  showed an increase whereas IFN- $\beta$  did not change. The cytokine gene expression analysed in infected cells from young pigs had higher variations than those from older animals. In PBMCs of *in vivo* infected pigs IL-8 was the only cytokine which showed a significant decrease at the beginning of the infection. The other cytokines analysed did not show any changes.

In this project we could show that the results of *in vitro* infection studies can not be transferred to *in vivo* conditions because many factors e. g. the age or the immunological status of the pigs influence the cytokine gene expression.

Key words: Classical swine fever, gene expression analysis, mRNA, cytokines



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1	DAS VIRUS DER KLASSISCHEN SCHWEINEPEST .....	3
2.1.1	<i>Taxonomie .....</i>	3
2.1.2	<i>Morphologie und Genomorganisation .....</i>	3
2.1.3	<i>Virale Proteine .....</i>	4
2.1.4	<i>Die Klassische Schweinepest.....</i>	5
2.1.5	<i>Bekämpfung.....</i>	6
2.1.6	<i>Übertragungswege und Epidemiologie.....</i>	7
2.1.7	<i>Virulenz des Virus der Klassischen Schweinepest.....</i>	7
2.1.8	<i>Verlaufsformen der Klassischen Schweinepest .....</i>	8
2.1.8.1	<i>Akute Verlaufsform.....</i>	8
2.1.8.2	<i>Chronische Verlaufsform.....</i>	9
2.1.8.3	<i>Pränatale Verlaufsform.....</i>	10
2.1.9	<i>Pathogenese.....</i>	10
2.2	EINFLUSS DER KSPV-INFEKTION AUF VERSCHIEDENE ZELLPOPULATIONEN .....	11
2.2.1	<i>Einfluss der KSPV-Infektion auf Makrophagen .....</i>	11
2.2.2	<i>Einfluss der KSPV-Infektion auf Lymphozyten .....</i>	12
2.2.3	<i>Einfluss der KSPV-Infektion auf Granulozyten .....</i>	13
2.2.4	<i>Einfluss der KSPV-Infektion auf Thrombozyten .....</i>	13
2.2.5	<i>Einfluss hämorrhagischer Fieber auf verschiedene Zellpopulationen.....</i>	14
2.3	RELEVANTE ZYTOKINE BEI HÄMORRHAGISCHEN FIEBERN.....	16
2.4	GENEXPRESSIONSANALYSE .....	18
2.4.1	<i>Serielle Analyse der Genexpression .....</i>	19
2.4.2	<i>Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....</i>	21
2.4.3	<i>Genexpressionsanalyse bei hämorrhagischen Fiebern .....</i>	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
3.1	TIERE UND MATERIAL .....	23
3.1.1	<i>Tiere und Versuchsaufbau.....</i>	23
3.1.2	<i>Zellen .....</i>	24
3.1.3	<i>Virusisolate .....</i>	24
3.1.4	<i>Sonstige Materialien .....</i>	24
3.2	METHODEN .....	25
3.2.1	<i>Klinische Parameter.....</i>	25
3.2.1.1	<i>Bestimmung des <i>Clinical Score</i> nach Mittelholzer et al., 2000 .....</i>	25
3.2.1.2	<i>Bestimmung der Körpertemperatur .....</i>	25
3.2.2	<i>Zellkulturtechnik .....</i>	25
3.2.3	<i>Virusanzucht.....</i>	26
3.2.4	<i>Virustitration.....</i>	26
3.2.5	<i>Indirekte Immunfärbung (Peroxidase-linked Antibody Assay).....</i>	27
3.2.6	<i>Gewinnung der Blutproben.....</i>	27
3.2.7	<i>Isolierung von PBMCs .....</i>	27
3.2.8	<i>Nukleinsäure-Isolierung.....</i>	28
3.2.9	<i>Reverse Transkription.....</i>	28
3.2.10	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	29
3.2.10.1	<i>Konventionelle PCR .....</i>	29
3.2.10.2	<i>Herstellung positiver Kontrollen.....</i>	31
3.2.10.3	<i>SYBR Green real-time PCR .....</i>	31
3.2.10.3.1	<i>Auswertung nach <math>2^{\Delta\Delta Ct}</math> .....</i>	32
3.2.11	<i>Agarose-Gelelektrophorese .....</i>	32
3.2.12	<i>Serielle Analyse der Genexpression .....</i>	33
3.2.12.1	<i>Präparation der mRNA aus der Gesamt-RNA.....</i>	33
3.2.12.2	<i>cDNA-Synthese.....</i>	33
3.2.12.3	<i>Restriktionsverdau mit NlaIII .....</i>	34
3.2.12.4	<i>Ligation der Linker an die cDNA-Fragmente .....</i>	35
3.2.12.5	<i>Restriktionsverdau mit BsmFI und <i>Blunt Ending Release</i> .....</i>	36
3.2.12.6	<i>Herstellung von Ditags .....</i>	37
3.2.12.7	<i>Amplifikation der Ditags mittels PCR.....</i>	37

3.2.12.8	Entfernung der Linker.....	39
3.2.12.9	Herstellung von Concatameren.....	39
3.2.12.10	Klonierung.....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
4.1	SERIELLE ANALYSE DER GENEXPRESSION.....	41
4.1.1	<i>Erstellung der Bibliotheken</i> .....	41
4.1.2	<i>Analyse der Bibliotheken</i> .....	41
4.2	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	43
4.2.1	<i>Auswahl der internen Kontrollen</i> .....	43
4.2.2	<i>Auswertung der in vitro Infektion in der Zellkultur</i> .....	43
4.2.3	<i>Auswertung der in vitro Infektion in PBMCs</i> .....	45
4.2.3.1	IL-1 $\beta$ .....	46
4.2.3.2	IL-6.....	48
4.2.3.3	IL-8 und TNF- $\alpha$ .....	49
4.2.3.4	IFN- $\beta$ .....	50
4.2.4	<i>Auswertung des Tierversuchs V2009/3</i> .....	51
4.2.4.1	Verlauf der Körpertemperatur.....	51
4.2.4.2	Erfassung der pathologisch-anatomischen Befunde.....	52
4.2.4.3	Untersuchung der Zytokinexpression.....	53
4.2.4.3.1	IL-1 $\beta$ .....	53
4.2.4.3.2	IL-6.....	53
4.2.4.3.3	IL-8 und TNF- $\alpha$ .....	54
4.2.4.3.4	IFN- $\beta$ .....	55
4.2.5	<i>Auswertung des Tierversuchs V2009/2</i> .....	55
4.2.5.1	Verlauf der Körpertemperatur.....	55
4.2.5.2	Erfassung der pathologisch-anatomischen Befunde.....	56
4.2.5.3	Erfassung der Leukozytenzahl des hoch virulenten KSPV-Stamms.....	56
4.2.5.4	Untersuchung der Zytokinexpression.....	57
4.2.5.4.1	IL-1 $\beta$ .....	57
4.2.5.4.2	IL-6.....	57
4.2.5.4.3	IL-8.....	57
4.2.5.4.4	TNF- $\alpha$ und IFN- $\beta$ .....	58
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>59</b>
5.1	SERIELLE ANALYSE DER GENEXPRESSION.....	60
5.2	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	61
5.2.1	<i>Zytokinexpressionsanalyse in der Zellkultur</i> .....	62
5.2.2	<i>Zytokinexpressionsanalyse bei PBMCs</i> .....	62
5.2.3	<i>Zytokinexpressionsanalyse in vivo</i> .....	63
5.2.3.1	Einfluss verschiedener KSPV-Isolate auf die Zytokinexpression junger Schweine.....	63
5.2.3.2	Einfluss des hoch virulenten KSPV-Isolats auf die Zytokinexpression im Tier.....	64
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG.....	66
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>83</b>
7.1	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	83
7.2	SONSTIGE PUFFER UND LÖSUNGEN.....	84
7.3	SONSTIGE REAGENZIEN.....	85
7.4	REAGENZIEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN ARBEITEN.....	85
7.5	KOMMERZIELL ERHÄLTICHE KITS UND ANTIKÖRPER.....	86
7.6	MARKER.....	86
7.7	GERÄTE UND VERBRAUCHSMITTEL.....	86
7.8	PRIMERSEQUENZEN.....	90
7.9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	92
7.10	TABELLENVERZEICHNIS.....	93
<b>8</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
APS	Ammoniumpersulfat
BDV	Border Disease Virus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CS	<i>Clinical Score</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIVA	<i>diffentiation of infected from vaccinated animals</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	<i>days post infection</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDulb	EMEM modifiziert nach Dulbecco und Freeman
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EU	Europäische Union
EURL	Europäisches Referenzlabor
FKS	Fetales Kälberserum

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Erdanziehungskonstante
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hpi	<i>hours post infection</i>
ICTV	<i>Committee for Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferon
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID <sub>50</sub>	Kulturinfektiöse Dosis zur Basis 50
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
l	Liter
log <sub>10</sub>	Logarithmus zur Basis 10
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität
μF	Mikrofarad; SI-Einheit für elektrische Kapazität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i> (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffoxid
NS	Nichtstrukturprotein

## Abkürzungsverzeichnis

---

NTR	nicht-translatierte Region
OD	Extinktion (Optische Dichte)
OIE	<i>Office International des Epizooties</i> ; Internationales Tierseuchenamt
ORF	<i>open reading frame</i>
p. i.	<i>post infection</i>
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBSM	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCV-2	Porzines Circovirus 2
PK15(A)	porzine Nierenzelllinie, <i>porcine kidney 15</i> (Amsterdam)
PLA	<i>Peroxidase linked Antibody Assay</i>
pmol	Pikomol
PO	Peroxidase
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RQ	relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SIV	<i>Swine influenza virus</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Carbon catabolite repression</i> , Nährmedium für Bakterien
ST	porzine Hodenzelllinie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TNF	Tumornekrose Faktor
U	<i>Units</i>
u. a.	unter anderem

## Abkürzungsverzeichnis

---

V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial cell growth factor</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WAHID	<i>World Animal Health Information Database</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP), die unter natürlichen Bedingungen ausschließlich bei Haus- und Wildschweinen auftritt, wird durch ein behülltes RNA-Virus aus dem Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* verursacht und gehört zu den weltweit bedeutendsten Tierseuchen. In der Europäischen Union (EU) ist sie anzeigepflichtig. Die Bekämpfungsmaßnahmen sind in der EU einheitlich geregelt und basieren auf der Richtlinie 2001/89/EG.

Bei der Erkrankung handelt es sich um eine schwere Allgemeininfektion mit sehr variablen und unspezifischen Symptomen. Die akut-letale Verlaufsform der KSP ist ein hämorrhagisches Fieber, das unter anderem durch eine Leukopenie, eine Thrombozytopenie, eine erhöhte vaskuläre Permeabilität sowie Petechien und Hämorrhagien gekennzeichnet ist. Wie bei anderen hämorrhagischen Fiebern ist auch die Pathogenese der KSP trotz langjähriger Forschung immer noch ungeklärt. Die Läsionen scheinen weniger die Folge direkter Zellschädigungen zu sein, sondern sind eher das Ergebnis zytokinvermittelter Vorgänge. Die unkontrollierte Aktivierung u. a. von Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 und Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) scheint die Symptome der Erkrankung zu verstärken, so dass Hämorrhagien in zahlreichen Organen entstehen. Obwohl der Einfluss einiger Zytokine auf die Wirtszelle nach der Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) untersucht wurde, sind die Mechanismen weitgehend ungeklärt.

Um Einblicke in die Pathogenese der KSP zu bekommen, wurden in dieser Arbeit Genexpressionsprofile der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$  und Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) untersucht. Vor allem IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  scheinen in KSPV-infizierten Zellen Apoptose zu induzieren und somit hämorrhagische Erscheinungsformen beim Tier auszulösen. IL-8 ist eines der wichtigsten inflammatorischen Zytokine und wird u. a. durch TNF- $\alpha$  induziert. Das IFN- $\beta$  ist für seine antivirale Wirkung bekannt und ist eines der ersten Zytokine, welche nach einer Infektion aktiviert werden. Da hoch, moderat und avirulente KSPV-Isolate zu unterschiedlichen klinischen Erscheinungen führen, sollte der Effekt verschiedener Isolate auf die Zytokin-Genexpression *in vitro* und *in vivo* ermittelt werden. Für die Analyse der Genexpression von nicht-infizierten und infizierten Zellen wurde eine sequenzbasierte Methode (Serielle Analyse der Genexpression, SAGE) verwendet, die es erlaubt, Änderungen in der Genexpression

auf mRNA Ebene zu ermitteln und vor allem die betroffenen Gene zu identifizieren. Anschließend sollten die Ergebnisse mithilfe der qRT-PCR bestätigt werden.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Virus der Klassischen Schweinepest

#### 2.1.1 Taxonomie

Der derzeit gültigen Nomenklatur durch das *International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV) folgend, wurde das KSPV zusammen mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) und dem Border Disease Virus der Schafe (BDV) in das Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* eingeordnet (Pringle, 1999).

Die Familie *Flaviviridae* umfasst außerdem die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* (Pringle, 1999). Der einzige Vertreter des Genus *Hepacivirus* ist das Hepatitis-C-Virus (HCV) (Bartenschlager & Lohmann, 2000). Zum Genus *Flavivirus* gehören sowohl humanpathogene als auch tierpathogene Erreger. Zu letzterer Gruppe gehören das *Wesselsbron disease virus* der Schafe und das *Louping ill virus*. Wichtige humanpathogene Erreger sind das Gelbfiebervirus, das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis und das Dengue-Virus (Wengler et al., 1995).

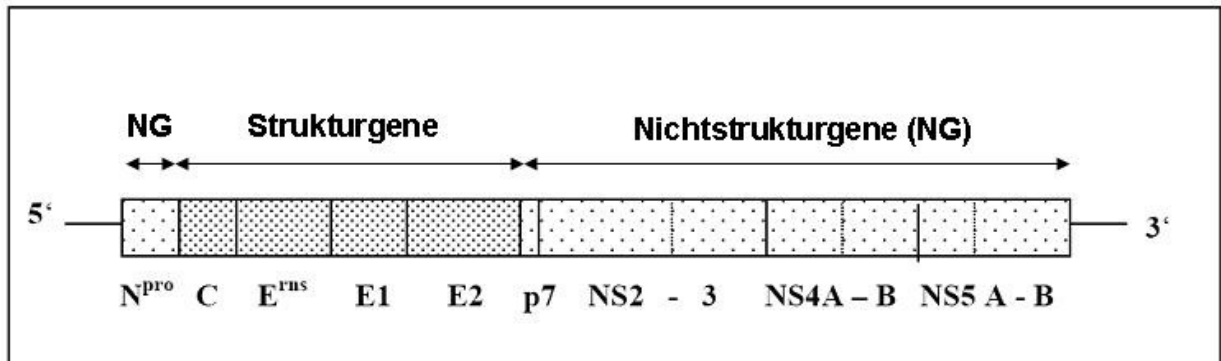
#### 2.1.2 Morphologie und Genomorganisation

Das KSPV ist ein behülltes RNA-Virus mit einem Durchmesser von 40 bis 60 nm (Moennig & Plagemann, 1992).

Das Genom mit einer Länge von 12,5 kb besteht aus einer einzelsträngigen, linearen RNA, welche in Plusstrangorientierung vorliegt. Das Genom ist nicht polyadenyliert (Collett, 1992) (Abb. 2-1). Es kodiert in einem einzelnen offenen Leserahmen (ORF) für ein hypothetisches Polyprotein von ca. 449 kDa (Collett, 1992). Das Polyprotein wird post- und kotranslational prozessiert. Die Prozessierung des Vorläuferproteins in die elf Struktur- und Nichtstrukturproteine erfolgt sowohl durch wirtsspezifische als auch durch viruseigene Proteasen (Meyers & Thiel, 1996). Der ORF wird am 5'- und am 3'-Ende von nicht-translatierten Regionen (5'-NTR und 3'-NTR) flankiert (Collett, 1992; Meyers & Thiel, 1996).

Die 5'-NTR besteht aus ca. 361 bis 386 Basen und bildet die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), welche die Initiation der CAP-unabhängigen Translation des Virus-Polyproteins ermöglicht (Martínez-Salas et al., 2008). Die 3'-NTR ist in entscheidende Prozesse des Replikationszyklus involviert, u. a. in die korrekte Termination der Translation, um eine effiziente Replikation der viralen RNA zu

gewährleisten (Isken et al., 2004; Pankraz et al., 2005). Die 5'-NTR der Pestiviren wird aufgrund der hoch konservierten Bereiche zur Differenzierung der einzelnen Spezies innerhalb des Genus verwendet (Ridpath & Bolin, 1997; Becher et al., 1999; Paton et al., 2000; Vilcek et al., 2001).



**Abb. 2-1:** Genomorganisation von Pestiviren (nach Collett, 1992).

### 2.1.3 Virale Proteine

Der N-terminale Bereich des Pestivirusgenoms kodiert für das Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup>, welches für Pestiviren charakteristisch ist (Wiskerchen & Collett, 1991). Es hat ein Molekulargewicht von etwa 20 kDa und kann sich autokatalytisch vom Vorläuferprotein abspalten.

Auf das N<sup>pro</sup>-Gen folgen vom 5'- zum 3'-Ende zunächst die Genombereiche für die Strukturproteine C, E<sup>ns</sup>, E1 und E2. Der folgende C-terminale Bereich kodiert für die Nichtstrukturproteine (Collett, 1992). Während das C-Protein als Nukleokapsid die RNA umschließt, bilden die Glykoproteine E<sup>ns</sup>, E1 und E2 die Membranproteine.

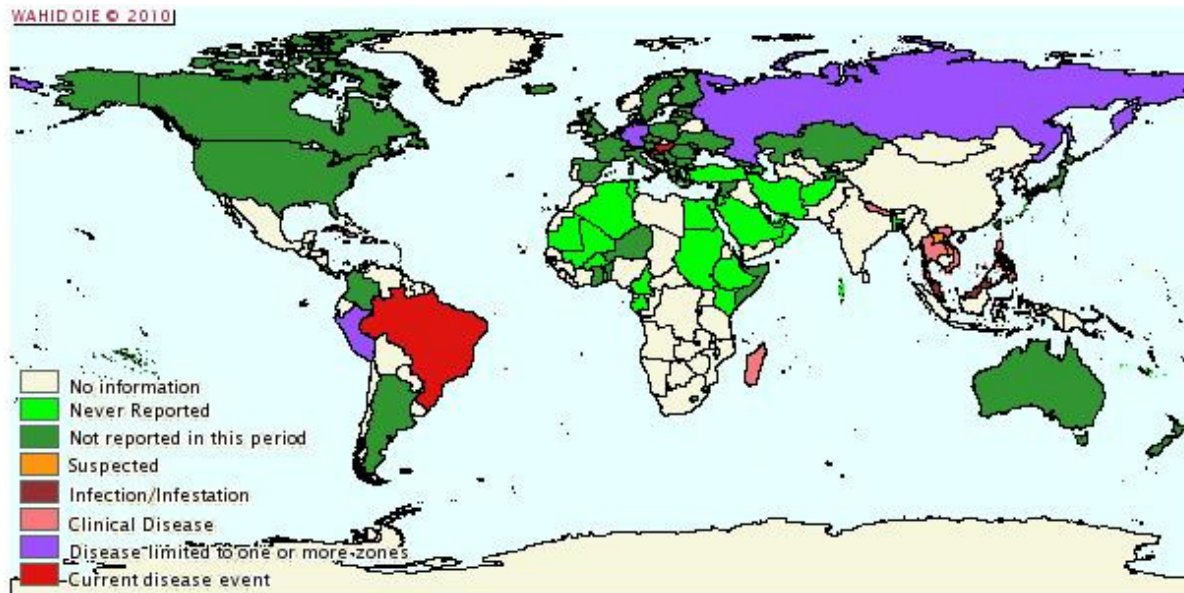
Das E2-Protein bildet Heterodimere mit E1, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, oder kommt auch in homodimerer Form vor. Es vermittelt die Adsorption an die Wirtszelle und gilt als Hauptimmunogen, gegen welches neutralisierende Antikörper gebildet werden (Greiser-Wilke et al., 1990). Gegen E1 konnten *in vivo* bisher keine Antikörper nachgewiesen werden. Das E<sup>ns</sup> (*envelope protein, RNase secreted*) wird von infizierten Zellen sezerniert und induziert die Bildung schwach neutralisierender Antikörper (Rümenapf et al., 1991; Weiland et al., 1992). Mit Ausnahme der Autoprotease N<sup>pro</sup> befinden sich die Nichtstrukturproteine im C-terminalen Abschnitt des Genoms in folgender Reihenfolge: p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Collett, 1992). Einige Funktionen der Nichtstrukturproteine sind aufgeklärt. So besitzt das NS3 eine Proteasefunktion, welche die Spaltung zwischen NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B katalysiert (Tautz et al., 1997, 2000).

Während für das BVDV gezeigt werden konnte, dass das NS2-3 für die Bildung infektiöser Partikel zuständig und das gespaltene NS3 essentiell für die Genomreplikation ist, konnten diese Funktionen für das KSPV nicht nachgewiesen werden (Moulin et al., 2007). Das NS4A stellt einen Kofaktor für die NS3-Protease dar (Tautz et al., 2000), während das NS4B eine Rolle in der Zytogenität (zumindest bei BVDV) spielen soll (Qu et al., 2001). Das NS5B ist eine virale RNA-abhängige Polymerase (Meyers et al., 1989). Die genauen Funktionen des NS5A und p7 sind noch nicht vollständig geklärt.

### **2.1.4 Die Klassische Schweinepest**

Die KSP ist eine der bedeutendsten Tierseuchen weltweit und kommt ausschließlich bei Haus- und Wildschweinen vor (Laddomada, 2000). Sie ist in der EU und bei der OIE anzeigepflichtig.

Erstmals wurde die Infektionskrankheit 1833 in Ohio, USA, offiziell beschrieben (Liess, 1981). Kurze Zeit danach konnte sie auch in Großbritannien (1864) und in ganz Europa (bis 1878) nachgewiesen werden, während versucht wurde, die Krankheit zu kontrollieren. Binnen kurzer Zeit wurde das Virus weltweit nachgewiesen. 1903 wurde der Erreger der Klassischen Schweinepest als filtrierbares Virus identifiziert (de Schweinitz & Dorset, 1904). In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte Großbritannien die KSP ausrotten und auch in weiten Teilen Europas wurden Erfolge erzielt. Australien, Kanada, Nordamerika, Neuseeland und einige Staaten der EU konnten mithilfe strikter Eradikationsprogramme das Virus eliminieren (Edwards et al., 2000). Allerdings ist das Virus in vielen Teilen Asiens, in einigen karibischen Staaten, in Teilen von Afrika und vor allem in Zentral- und Südamerika noch immer präsent und richtet einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden an (Abb. 2-2). In Europa entsteht der größte finanzielle Schaden bei Keulungen von Schweinen in befallenen Beständen und in Kontaktbetrieben (Moennig, 2000; Greiser-Wilke et al., 2000).



**Abb. 2-2:** Aktuelle Ausbrüche der KSP aus dem Zeitraum Januar bis Juli 2009 (OIE *World Organization of Animal Health – World Animal Health Information Database* (WAHID)): hellgrün markiert = KSP-Ausbruch nie gemeldet; dunkelgrün markiert = KSP-Ausbruch nicht in dem genannten Zeitraum gemeldet; orange markiert = Verdacht auf KSP-Ausbruch; dunkelrot markiert = KSPV Infektion gemeldet; rosé markiert = klinisch kranke Tiere gemeldet; lila markiert = Krankheit auf einige Bereiche limitiert; rot markiert = aktueller KSP-Ausbruch.

### 2.1.5 Bekämpfung

Die Klassische Schweinepest ist eine international anzeigepflichtige Infektionskrankheit. Die Bekämpfungsmaßnahmen in der EU sind in der Richtlinie 2001/89/EG festgehalten und stellen sicher, dass bei Verdacht bzw. Ausbruch die zuständige Behörde informiert wird (Anonym, 2001). Außerdem wird gewährleistet, dass amtliche Untersuchungsmaßnahmen eingeleitet werden und Überwachungs- und Sperrzonen mit besonderen Sicherheitsmaßnahmen eingerichtet werden (Anonym, 2001).

Die Erkrankung konnte in den USA und in Kanada und auch in einigen Teilen Europas erfolgreich ausgerottet bzw. kontrolliert werden. In vielen Ländern Asiens und Lateinamerikas treten Fälle von Klassischer Schweinepest häufig auf. Auch in Afrika kam es zu Ausbrüchen (Anonym, 2005). Die Bekämpfung der Erkrankung erfolgt in erster Linie, um den freien Handel mit Schweinen und Schweinefleisch ungehindert führen zu können. Um dies zu ermöglichen, wurde 1980 eine Strategie in der EU eingeführt, die das Impfen als Prävention konsequent verbietet und das Keulen als Hauptbekämpfungsmaßnahme vorsieht. Da die Eradikationsbestrebungen noch nicht den erhofften Erfolg zeigten und es wiederholt zu massiven

KSP Ausbrüchen in den Mitgliedsstaaten kam, einigte man sich darauf, eine Notimpfung auf Antrag zur Verhinderung der Weiterverbreitung von der EU genehmigen zu lassen (Anonym, 2005). Prinzipiell muss ein solcher Impfstoff eine Markerkomponente enthalten und sehr schnell einen wirksamen Schutz erzielen. Ein gut wirksamer Lebendimpfstoff auf der Basis des attenuierten Chinese Stammes (C-Stamm) ist schon lange vorhanden. Für die EU sollte nur ein Markerimpfstoff in Verbindung mit einem Nachweistest verwendet werden, der die Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren erlaubt (DIVA = *differentiation of infected from vaccinated animals*) (van Oirschot, 2003; Dong & Chen, 2007). Dies hat zur Entwicklung zahlreicher neuer Vakzinearten geführt (Wehrle et al., 2007; Holinka et al., 2009; Liu et al., 2009; Reimann et al., 2010), wobei eine genetische Differenzierung mittels Sequenzvergleich eine vielversprechende Methode ist, infizierte von nicht-infizierten Tieren zu unterscheiden (Leifer et al., 2009).

### **2.1.6 Übertragungswege und Epidemiologie**

Die Übertragung der Klassischen Schweinepest erfolgt in der Regel oronasal (Paton & Greiser-Wilke, 2003). Das Virus wird über Sekrete und Exkrete wie Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin oder Kot ausgeschieden (van Oirschot, 1999). Eine Übertragung durch den Deckakt oder die künstliche Besamung ist ebenfalls möglich, da das Virus im Sperma von infizierten Ebern nachweisbar ist (de Smit et al., 1999; Floegel et al., 2000). Das Virus kann in tragenden Sauen, die selbst oft nur subklinisch erkranken, die Plazentaschranke überschreiten und die Feten infizieren. Diese können abortiert werden, als persistent infizierte Virämiker geboren werden und stellen somit eine beachtenswerte Infektionsquelle für nicht infizierte Tiere dar (Plateau et al., 1980; Dahle & Liess, 1992).

Das Virus wird durch direkten Kontakt zwischen infizierten und empfänglichen Schweinen übertragen. Infizierte Wildschweine dienen als Erregerreservoir und stellen somit eine Infektionsgefahr für die Hausschweinpopulation dar (Moennig, 2000). Weitere wichtige Quellen sind die illegale Verfütterung von virushaltigen, nicht ausreichend erhitzten Speiseabfällen oder mechanische Vektoren wie z. B. Transportfahrzeuge, Stallgeräte oder Personen (van Oirschot, 1999).

### **2.1.7 Virulenz des Virus der Klassischen Schweinepest**

Als Virulenz bezeichnet man die Summe aller Eigenschaften eines Erregers, die eine Krankheit auslösen. Das KSPV zeigt in dieser Hinsicht eine große Variationsbreite,

die sowohl avirulente als auch virulente Stämme umfasst. Zu den avirulenten Stämmen zählen solche, die z. B. durch Attenuierung als Impfstämme verwendet werden (Moennig & Plagemann, 1992). Die virulenten KSPV-Stämme sind in hoch, moderat und schwach virulent eingeteilt, wobei die Einteilung auf experimentellen Erfahrungen basiert. Die Virulenz der KSPV-Stämme wird u. a. für die unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung verantwortlich gemacht. Allerdings wird die Verlaufsform auch vom Alter, der Rasse und dem Immunstatus der Tiere bestimmt (Dahle & Liess, 1992; Moennig et al., 2003; Floegel-Niesmann et al., 2003). Deshalb ist es für die Beurteilung der Virulenz während eines Tierversuches wichtig, die oben genannten Faktoren einzubeziehen (Dahle & Liess, 1992). Dafür entwickelten Mittelholzer et al. (2000) den sogenannten *Clinical Score* (CS), der bei der Einteilung der Virulenz die klinischen Symptome und deren Ausprägungsgrad berücksichtigte. Die Beurteilung der Schwere der Erkrankung erfolgt mithilfe einer Punktevergabe pro KSPV-relevantes Kriterium.

Die hoch virulenten KSPV-Stämme führen bei jungen Schweinen zu Erkrankungen mit hoher Mortalität, während moderat virulente KSPV-Stämme chronische Erkrankungen auslösen können. Schwach virulente Stämme werden mit milden oder subklinischen Verlaufsformen in Verbindung gebracht.

### **2.1.8 Verlaufsformen der Klassischen Schweinepest**

Bei der Klassischen Schweinepest differenziert man zwischen der akuten, chronischen und der pränatalen Verlaufsform (Depner et al., 1996; van Oirschot, 1999).

Die Symptome der Klassischen Schweinepest sind in der Regel unspezifisch und sehr variabel. Sie sind in hohem Maße abhängig von Wirtsfaktoren wie dem Alter (Altersresistenz), dem Immunstatus, der Kondition und der Konstitution sowie der Rasse des Tieres (Depner et al., 1996, 1997; Blacksell et al., 2006). Auch die Virulenz des Virusstammes, die Infektionsdosis und auftretende Sekundärinfektionen können den Krankheitsverlauf erheblich beeinflussen (Liess, 1987; van Oirschot, 1999; Moennig et al., 2003).

#### **2.1.8.1 Akute Verlaufsform**

Infektionen von Ferkeln und jungen Mastschweinen mit hoch virulenten KSPV führen zur Entwicklung einer akuten Verlaufsform, die entweder letal oder transient verlaufen kann.

Die Inkubationszeit beträgt etwa drei bis sieben Tage. Das erste Anzeichen einer Infektion mit dem KSPV ist ein Anstieg der Körpertemperatur auf über 41 °C (van Oirschot, 1999). Im weiteren Verlauf werden Appetitlosigkeit, Konjunktivitis, Erbrechen, Verstopfung und Durchfall, vergrößerte Lymphknoten und Atembeschwerden beobachtet (van Oirschot, 1999). Außerdem können Störungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) auftreten, die sich in einer Schwäche der Hinterhand, unkoordinierten Bewegung bis hin zu Lähmungen manifestieren (Moennig et al., 2003). Die klassischen Hautveränderungen in Form von petechialen und flächenhaften Blutungen werden in der Endphase der Erkrankung sichtbar und erscheinen in der Regel an Ohren, Gliedmaßen und Schwanz (van Oirschot, 1999). Die Mortalitätsrate kann bei dieser Verlaufsform bis zu 90 % betragen. Die erkrankten Tiere sterben nach etwa zehn bis 20 Tagen.

Neutralisierende Antikörper sind bei den Tieren in der Terminalphase der Erkrankung in geringen Mengen nachweisbar. Die Tiere, die eine akute Verlaufsform der KSP überleben oder an einer mildereren Verlaufsform erkranken, bilden dagegen nach ca. zwei Wochen eine effektive Immunantwort aus (Böhm et al., 1966; Liess et al., 1987; Depner et al., 1996).

Während der Sektion werden vor allem Veränderungen an den Lymphknoten, der Milz und der Niere festgestellt. Die Lymphknoten sind geschwollen, ödematös und hämorrhagisch. Die Nieren und die Milz weisen Petechien und Ekchymosen auf (van Oirschot, 1999).

Außerdem werden schwere Leukopenien und Thrombozytopenien festgestellt, welche die Immunsuppression verstärken (Dunne, 1970; van Oirschot, 1999).

Neben der akuten Verlaufsform der KSP können perakute und subakute Formen auftreten, bei denen die Ferkel nach einer kurzen Phase hohen Fiebers plötzlich verenden (Dunne, 1970). Transiente Verlaufsformen werden oft bei älteren Mastschweinen oder Zuchttieren beobachtet. Nachdem sich die Tiere von milden klinischen Symptomen erholt haben, bilden sie eine effektive Immunantwort aus. In solchen Fällen ist eine Diagnose anhand der Klinik schwierig, weil die klinischen Befunde nicht auf eine KSPV-Infektion hindeuten. Dieser Zustand wird als eine „atypische“ Verlaufsform bezeichnet (Dahle & Liess, 1992; Depner et al., 1996).

### **2.1.8.2 Chronische Verlaufsform**

Die chronische Verlaufsform, die häufig mit moderat virulenten Virusstämmen in Verbindung gebracht wird, tritt auf, wenn die Tiere nicht in der Lage sind eine

effektive Immunantwort auszubilden (van Oirschot, 1999) und ist gekennzeichnet durch eine Krankheitsdauer von mehr als 30 Tagen (Mengeling & Packer, 1969). Die infizierten Tiere zeigen zuerst Symptome einer akuten Erkrankung und anschließend eine Phase der Besserung. Danach kommt es erneut zu klinischen Symptomen. Chronisch erkrankte Tiere können mehrere Wochen oder sogar Monate überleben, aber die Erkrankung verläuft letztendlich immer letal (van Oirschot, 1999). Infizierte Jungtiere zeigen deutliche Entwicklungsrückstände und kümmern (Depner et al., 1996).

Die erkrankten Tiere scheiden über die gesamte Zeit bis zum Tod das Virus aus und stellen somit eine permanente Infektionsquelle dar. Neutralisierende Antikörper sind nur kurze Zeit nachweisbar (Mengeling & Packer, 1969; Depner et al., 1996; van Oirschot, 1999).

### **2.1.8.3 Pränatale Verlaufsform**

Das KSPV kann in tragenden, immunologisch naiven Sauen die Plazentaschranke überwinden und die Feten infizieren. Die pränatale Verlaufsform kann je nach Trächtigkeitsstadium zum embryonalen bzw. fetalen Tod, zu teratogenen Veränderungen, zur Geburt toter Ferkel oder zur Geburt scheinbar gesunder, persistent infizierter virämischer Ferkel führen, wobei die Sauen nur transient erkranken. Die betroffenen Ferkel kümmern und sterben nach einigen Wochen oder sogar Monaten (van Oirschot, 1979; Meyer et al., 1981; Depner et al., 1996).

Die persistent infizierten Ferkel sind immuntolerant gegenüber dem KSPV, so dass homologe Antikörper gegen das Virus zu keinem Zeitpunkt gebildet werden. Außerdem sind die betroffenen Tiere eine ständige Infektionsquelle, da sie permanent das Virus ausscheiden und ungeschützte Tiere infizieren können.

### **2.1.9 Pathogenese**

Die Infektion erfolgt meist oronasal und die primäre Virusvermehrung findet zunächst in den Tonsillen statt (Liess, 1987). Anschließend gelangt das Virus über die Lymphbahnen in die umliegenden Lymphknoten, von wo aus sich die Ausbreitung in den Blutkreislauf fortsetzt und es zu einer primären Virämie kommt (Ressang, 1973). Das Virus befällt umliegende Organe wie die Milz, das Knochenmark, viszerale Lymphknoten und das lymphoide Gewebe des Dünndarms (Röhler & Pehl, 1960), wobei die Hauptzielzellen Makrophagen und Monozyten sind (Summerfield et al., 1998; Knoetig et al., 1999). Die Inkubationszeit beträgt in der Regel bis zu sieben



Tage (Depner et al., 1994). Das Virus wird anschließend über Schleimhäute des Maul- und Nasenraumes, des Urogenitaltraktes, des Gastrointestinaltraktes und über Konjunktivalflüssigkeit ausgeschieden und kann in nahezu allen Organen nachgewiesen werden (Ressang, 1973). Die Virusausbreitung im Organismus ist nach ca. fünf bis sechs Tagen abgeschlossen (Ressang, 1973). Der Schaden, den das KSPV verursacht, resultiert unter anderem in einer Thrombozytopenie und Leukopenie (Susa et al., 1992). Bei dem akuten Krankheitsverlauf können in der Endphase petechiale und flächenhafte Blutungen auftreten, die für virale hämorrhagische Erkrankungen charakteristisch sind und bei denen verschiedene Zellpopulationen betroffen sind.

## **2.2 Einfluss der KSPV-Infektion auf verschiedene Zellpopulationen**

### **2.2.1 Einfluss der KSPV-Infektion auf Makrophagen**

Im Infektionsverlauf zeigen sich zunächst ein kurzfristiger Anstieg und später ein Abfall der zirkulierenden Makrophagen. Infektion, apoptotische Prozesse sowie phagozytotische und sekretorische Aktivierung treten in allen Makrophagenpopulationen auf (Gómez-Villamandos et al., 1998, 2000, 2001, 2003a; Ruiz-Villamor et al., 2001; Carrasco et al., 2001; Sánchez-Cordón et al., 2002, 2003, 2005b; Núñez et al., 2005).

Eine direkte Zell- bzw. Gewebeschädigung durch das Virus wurde für viele Hämorrhagien, die im Rahmen einer Infektion auftreten können, weitgehend ausgeschlossen. Der genaue Pathomechanismus ist allerdings nicht bekannt. Vor allem die Ursache für eine Lymphozytopenie und Thrombozytopenie sind weiterhin ungeklärt (Summerfield et al., 1998; Gómez-Villamandos et al., 2000; Sato et al., 2000; Sánchez-Cordón et al., 2002). Es wird angenommen, dass unterschiedliche Zytokine ursächlich beteiligt sind, zu denen TNF- $\alpha$ , IL-1 sowie IL-6 gehören (Sánchez-Cordón et al., 2002; Jamin et al., 2008).

In *in vitro* infizierten Alveolarmakrophagen sowie in Lymphknoten infizierter Schweine und in dendritischen Zellen ist die Expression von TNF- $\alpha$  bzw. TNF- $\alpha$ -Protein erhöht (Choi et al., 2004; Jamin et al., 2008). TNF- $\alpha$  kann Apoptose in unterschiedlichen Zellpopulationen auslösen (Zheng et al., 1995; Nagata, 1997) und kommt somit als einer der Auslöser der Leukopenie in Frage. Ferner wurde Apoptose sowohl in virusinfizierten als auch in nicht-infizierten lymphatischen Zellen nachgewiesen (Choi et al., 2004). Dieses könnte bedeuten, dass das KSPV sowohl direkt als auch indirekt

Apoptose auslösen kann. Wie das Virus die TNF- $\alpha$  Produktion anregt, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Das Vorhandensein von KSPV-Antigen in den TNF- $\alpha$  positiven Makrophagen legt jedoch nahe, dass virale Komponenten über die Bindung an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche oder Mechanismen im Inneren der Zelle den Auslöser für die TNF- $\alpha$  Synthese darstellen (Choi et al., 2004).

Neben TNF- $\alpha$  können auch IL-1 und IL-6 Apoptose in unterschiedlichen Zellspezies induzieren, was bereits für andere virale Erkrankungen wie der Afrikanischen Schweinepest, Ebola oder dem Dengue-Fieber nachgewiesen wurde (Gómez del Moral et al., 1999; Bray & Geisbert, 2005; Durand et al., 2009; Levy et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 bei der Pathogenese der KSP eine Rolle spielen (Sánchez-Cordón et al., 2002). Eine erhöhte IL-1 Produktion nach einer KSPV-Infektion von Monozyten und Makrophagen wurde auch *in vitro* gezeigt (Knoetig et al., 1999). Eine Beteiligung des TNF- $\alpha$  oder IL-6 war *in vitro* jedoch nicht reproduzierbar (Knoetig et al., 1999).

In immunohistochemischen Analysen wurde bei Makrophagen der Leber im Verlauf der akuten KSPV-Infektion neben einer Aktivierung der Phagozytose eine Überexpression sowohl von TNF- $\alpha$  als auch von IL-1 $\alpha$  und IL-6 festgestellt (Núñez et al., 2005). Besonders der Verlauf der IL-1 $\alpha$  Produktion wies einen Zusammenhang mit dem Auftreten klinischer Symptome und pathologisch-anatomisch nachweisbarer Hämorrhagien auf (Núñez et al., 2005). In peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) wurde *in vitro* ebenfalls nachgewiesen, dass nach der Infektion mit einem hoch virulenten KSPV-Stamm ein Unterschied in der Zytokinexpression zwischen 24 und 48 Stunden nach der Infektion (*hours post infection, hpi*) zu erkennen war (Borca et al., 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass während der akuten Phase der Erkrankung in dendritischen Zellen IFN- $\alpha$  überexprimiert wird (Jamin et al., 2008). Es wird vermutet, dass auch dieses Zytokin an der Entstehung der Lymphopenie beteiligt sein könnte (Summerfield et al., 2006).

### **2.2.2 Einfluss der KSPV-Infektion auf Lymphozyten**

Die KSPV-Infektion verursacht vor allem in ihrer akut-letalen Verlaufsform eine schwere Lymphopenie und eine damit verbundene Immunsuppression, die bereits vor Auftreten der ersten Symptome nachweisbar ist (Pauly et al., 1998; Summerfield et al., 2001). In den lymphoretikulären Organen kommt es zu einer ausgeprägten Depletion der Lymphozyten, vor allem der B-Lymphozytenpopulation (Susa et al., 1992; Quezada et al., 2000; Narita et al., 2000). Zudem erfolgte der Abfall der

Lymphozytenzahl in Thymus und Milz zeitgleich mit dem vermehrten Auftreten von Makrophagen, die phagozytierte Zelltrümmer enthielten („*tingible body*“ *macrophages*). Ebenfalls ging die Depletion der Lymphozyten mit eindeutigen Hinweisen apoptotischer Veränderungen einher (Sánchez-Cordón et al., 2005a). Quantitative Veränderungen der T-Lymphozytenpopulationen sowie qualitative Veränderungen der Zytokinexpression durch diese Zellen wurden im Sinne einer zellvermittelten Immunantwort vom Typ 1 interpretiert, die im späteren Verlauf von einer Typ 2 Immunantwort abgelöst wird (Sánchez-Cordón et al., 2005b).

### **2.2.3 Einfluss der KSPV-Infektion auf Granulozyten**

Neben einer ausgeprägten Lymphopenie kommt es im Verlauf der Infektion mit dem KSPV auch zu einer markanten Granulozytopenie (Susa et al., 1992; Summerfield et al., 1998). Die Depletion der Granulozyten, die bereits drei Tage nach der Infektion auftritt, betrifft sowohl reife Granulozyten als auch unreife Vorläuferzellen im Knochenmark. Dabei spielen sowohl apoptotische als auch nekrotische Veränderungen im Knochenmark eine Rolle (Summerfield et al., 2000). Da erhöhte Aktivitäten der Caspasen 3 und 9 einige Tage nach der Infektion nachweisbar waren, wurde der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion postuliert (Budihardjo et al., 1999). Die Fähigkeit zur Differenzierung und somit der Granulozytopoese war jedoch in Knochenmarkszellen infizierter Tiere über den gesamten Verlauf der Erkrankung nicht gestört. Relativ gesehen nahmen unreife Granulozyten über den Zeitraum der Infektion zu (Summerfield et al., 2000).

### **2.2.4 Einfluss der KSPV-Infektion auf Thrombozyten**

Ein charakteristisches Symptom im Verlauf der akuten KSP ist eine hochgradige Thrombozytopenie, deren Beginn mit dem Auftreten von Fieber und einer messbaren Virämie korreliert (Heene et al., 1971; Hoffmann et al., 1971a; Gómez-Villamandos et al., 1998). Prinzipiell kann eine Thrombozytopenie durch verminderte oder fehlende Thrombozytopoese (Bildungsstörung), erhöhten peripheren Verschleiß durch Verbrauch, Verlust bzw. Zerstörung oder eine veränderte Plättchenverteilung (Verteilungsstörung) hervorgerufen werden (Bautista et al., 2002). Als Ursache der Thrombozytopenie nach der Infektion mit dem KSPV wurde eine massive Degeneration der Megakaryozyten im Knochenmark postuliert (Hoffmann et al., 1971b). Außerdem wurden in Milz und Leber eine Plättchenaktivierung und -aggregation sowie eine sekretorische und phagozytotische Aktivierung der

Makrophagen beobachtet (Bautista et al., 2002). In diesem Zusammenhang wird eine massive Aktivierung und nachfolgende Phagozytose der Plättchen, ausgelöst durch die Freisetzung plättchenaktivierender Faktoren durch aktivierte Makrophagen, als primäre Ursache der Thrombozytopenie im Verlauf der KSP angenommen (Bautista et al., 2002). Eine Aktivierung und Aggregation der Plättchen durch den *tissue factor* (TF) wird aufgrund mangelnder Fibrinablagerungen in den betroffenen Organen ausgeschlossen (Gómez-Villamandos et al., 2003b). Morphologische Anzeichen eines Endothel- oder sonstigen Gewebeschadens, der eine Aktivierung des Gerinnungssystems herbeigeführt haben könnte, waren ebenfalls nicht nachweisbar (Bautista et al., 2002).

Bei KSPV-infizierten Schweinen kommt es zu ausgeprägten Veränderungen im Knochenmark, die jedoch erst nach Beginn der Thrombozytopenie entstehen (Gómez-Villamandos et al., 1998, 2003a, b). Die bereits früher beobachteten degenerativen Veränderungen der Megakaryozyten (Hoffmann et al., 1971b) wurden als „nackte Megakaryozytenkerne“ bezeichnet, jedoch im Sinne eines Versuches zur Wiederherstellung normaler Plättchenzahlen interpretiert (Gomez-Villamandos et al., 2003b).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass in KSPV-infizierten Endothelzellen der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert wird, welcher die Aktivierung von Endothelzellen reguliert. Es kommt zusätzlich zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen (IL-1α, IL-6 und IL-8) und prokoagulatorischen Faktoren (Bensaude et al., 2004). Sowohl die Expression des Gewebefaktors als auch des Endothelzellwachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) und des Zelloberflächenadhäsionsmoleküls E-Selektin waren *in vitro* erhöht. Zudem wurden Plättchenaggregate und aktivierte Plättchen in der Leber infizierter Tiere nachgewiesen, die in der Nähe von Kupffer-Zellen lokalisiert waren.

Neben der KSP weisen andere hämorrhagische Fieber Gemeinsamkeiten in der Pathogenese auf und sollen im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

### **2.2.5 Einfluss hämorrhagischer Fieber auf verschiedene Zellpopulationen**

Die Erreger fast aller hämorrhagischer Fieber können unterschiedliche Zelltypen infizieren (Geisbert & Jahrling, 2004; Zampieri et al., 2007). Die primäre Replikation der meisten Erreger viraler hämorrhagischer Fieber erfolgt in Monozyten bzw.

Makrophagen und in dendritischen Zellen, zu denen neben dem Ebolavirus auch andere Vertreter aus der Familie der *Flaviviridae* zählen. Dazu gehören neben den veterinärmedizinisch relevanten Erregern wie das KSPV auch humanpathogene Erreger wie das durch Mücken übertragbare Gelbfieberevirus oder das Dengue-Virus (Monath, 2001; John, 2003; Gómez-Villamandos et al., 2003a; Geisbert et al., 2003b; Bray, 2005; Ridpath et al., 2006; Malavige et al., 2007). Eine Ausnahme bilden die Hantaviren, die primär in Endothelzellen replizieren.

Obwohl einige dieser Viren auch einen direkt zellschädigenden Effekt haben, sind die meisten klinischen Erscheinungen eine Folge der Reaktionen des Immunsystems und der damit verbundenen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch infizierte Monozyten und Makrophagen (Mahanty & Bray, 2004; Bray, 2005).

Bei der Entstehung von Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes nach einer Infektion mit dem Ebolavirus spielen die Interaktionen des Virus mit Makrophagen und dendritischen Zellen eine tragende Rolle (Geisbert et al., 2003b, c, d). Die Erreger viraler hämorrhagischer Fieber können das unspezifische Abwehrsystem umgehen, indem sie sich in Monozyten bzw. Makrophagen und dendritischen Zellen vermehren, die eigentlich eindringende Pathogene abwehren sollten. Diese nutzen sie als Transportvehikel zu parenchymatösen Organen (Hensley et al., 2002), was durch die Hemmung der Typ 1 Interferonproduktion unterstützt wird (Bray, 2005).

Die durch die Infektion aktivierten Monozyten und Makrophagen schütten Zytokine und Chemokine aus, die das Gefäßsystem im Sinne einer Endothelzellaktivierung beeinflussen. Infizierte dendritische Zellen scheinen in der Fähigkeit gestört zu sein, naive Lymphozyten zu aktivieren (Geisbert et al., 2000, 2003b; Mahanty & Bray, 2004; Geisbert & Jahrling, 2004; Bray & Geisbert, 2005).

Filoviren induzieren einen direkten zytopathischen Effekt, der sich sowohl in den infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen als auch in parenchymatösen Zellen der Leber, der Nebenniere und anderer Organe manifestiert. Der Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt. Die auftretenden Hämorrhagien und Nekrosen, die als pathologische Veränderungen während einer Infektion auftreten, werden durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus infizierten und aktivierten Monozyten und Makrophagen verursacht (Mahanty & Bray, 2004).

Die indirekten Wirkungen der Infektionen mit diesen Viren wurden besonders anhand der Ebolavirusinfektion untersucht. Die Replikation der Viren in Makrophagen

resultiert in einer Interaktion einzelsträngiger viraler RNA, doppelsträngiger RNA-Intermediate und anderer virusspezifischer Substanzen mit Typ 1 Transmembranproteinen, *Toll-like* Rezeptoren und weiteren Proteinen des unspezifischen Immunsystems. Dadurch werden der Transkriptionsfaktor NFκB, Interferon regulierende Faktoren bzw. andere Signaltransduktionswege angeschaltet. Diese Aktivierung führt zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1, IL-6, TNF-α und Stickstoffoxid (NO) (Hotchkiss & Karl, 2003; Bray, 2005).

Dendritische Zellen setzen Chemokine frei, die weitere empfängliche Monozyten und dendritische Zellen zu den Orten viraler Replikation locken und tragen so zur Verbreitung des Virus bei (Hensley et al., 2002; Mahanty et al., 2003; Bray & Geisbert, 2005).

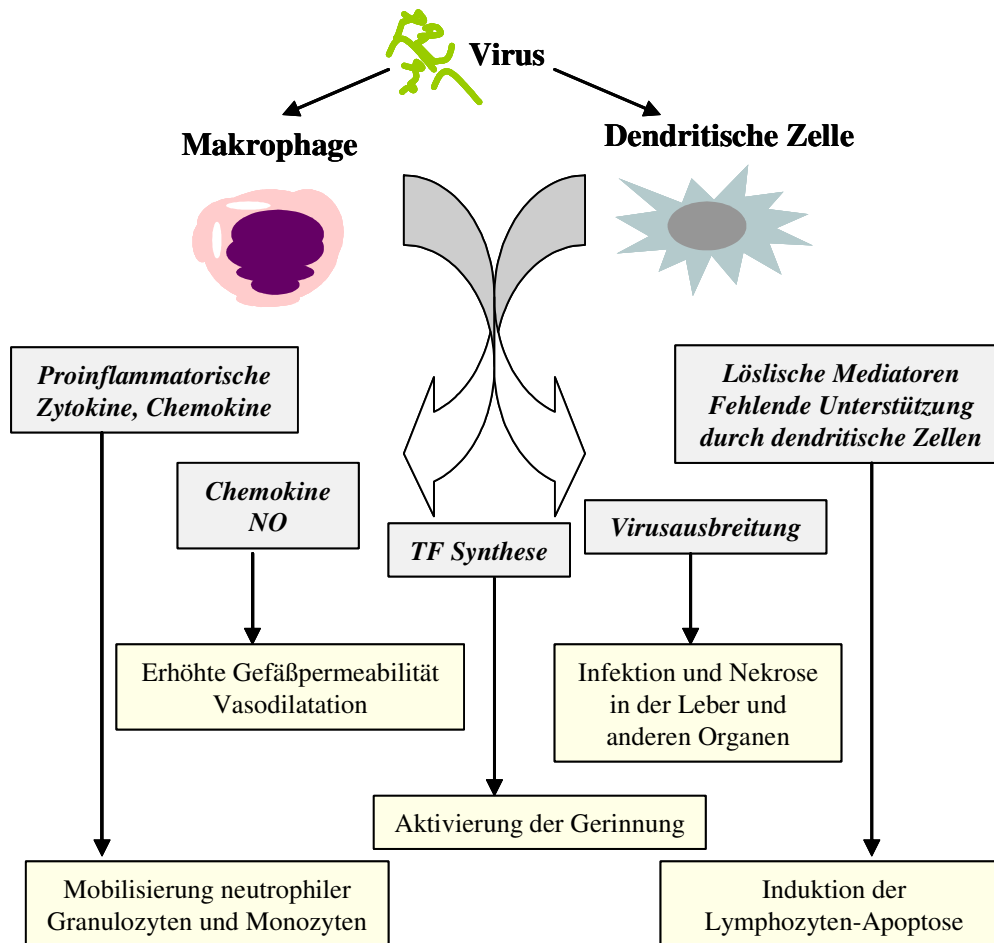
Die vaskulären Permeabilitätsstörungen und Koagulopathien wurden in älteren Studien häufig direkten Wirkungen des Virus auf infizierte Endothelzellen zugeschrieben (Peters & Zaki, 2002; Schnittler & Feldmann, 2003). Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Virusreplikation in Endothelzellen erst in der Finalphase der Erkrankung stattfindet, wenn Gerinnungsstörungen und Schocksymptomatik bereits ausgeprägt sind. Die auftretenden Vasodilatationen, die erhöhte Gefäßpermeabilität sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen im Bereich des Endothels werden daher mit der Wirkung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren wie IL-6 und *tissue factor* (TF) in Verbindung gebracht (Mahanty & Bray, 2004; Bray, 2005). Die bedeutsame Beziehung zwischen viraler Infektion, Entzündungsreaktion und Blutgerinnung ist inzwischen experimentell belegt (Geisbert et al., 2003a).

Für Infektionen mit Erregern viraler hämorrhagischer Fieber ist zudem eine ausgeprägte Apoptose vorwiegend nicht-infizierter lymphatischer Zellen charakteristisch, die zu einer massiven Immunsuppression durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen führt (Mahanty & Bray, 2004; Bray, 2005; Bray & Geisbert, 2005).

### **2.3 Relevante Zytokine bei hämorrhagischen Fiebern**

Bei Zytokinen handelt es sich um Glykoproteine, die regulierende Funktionen auf spezifische Zellen ausüben; vor allem spielen sie bei der Regulation und Kontrolle der Immunantwort eine wichtige Rolle (Arai et al., 1990). Zytokine haben nur eine kurze Halbwertszeit und deren Expression erfolgt normalerweise erst nach vorheriger Stimulation (Ibelgauft, 2003).

Die Pathogenese bei virus-induzierten hämorrhagischen Fiebrern ist mit Gefäßstörungen verbunden. Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen werden nach Eintritt des Virus primär infiziert, wobei es nach einer Infektion von Monozyten und Makrophagen zu einer Überaktivierung kommen kann, die mit einer überschießenden Ausschüttung von Zytokinen und proinflammatorischen Mediatoren einhergeht. Diese freigesetzten Mediatoren führen zu pathologischen Veränderungen des Gefäßsystems, insbesondere des Endothels (Sánchez-Cordón et al., 2002; Bray, 2005). Unter den Zytokinen, die im Rahmen der Pathogenese hämorrhagischer Fieber, zu denen auch die KSP zählt, untersucht wurden, scheinen u. a. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  die wichtigsten zu sein (Zheng et al., 1995; Bray, 2005). Allerdings spielt auch das IFN- $\beta$  in der Pathogenese eine wichtige Rolle, zumal es unter den Zytokinen eines der ersten ist, welches nach einer Infektion aktiviert wird. Es weist wie alle Interferone eine antivirale und antitumorale Wirkung auf, indem es die betroffenen Zellen in einen Zustand der Resistenz gegenüber Viren versetzt und antiviral wirksame Gene aktiviert (Staehele, 1990). IL-1 und IL-6 aktivieren Makrophagen und Natürliche Killerzellen, was zur Phagozytose des Pathogens und zur Antigenpräsentation führt (Lee et al., 1989). TNF- $\alpha$  ist für entzündliche Prozesse verantwortlich und erhöht die Permeabilität der Blutgefäße. Dieses Zytokin wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und kann Apoptose auslösen, die Zellproliferation beeinflussen und andere Zytokine wie z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 aktivieren (Heinrich et al., 2003; Hehlhans & Pfeffer, 2005; Dinarello, 2005) (Abb. 2-3). IL-8 kann von allen Zellen, die einen *Toll like* Rezeptor besitzen, ausgeschüttet werden. Neben IL-1 $\beta$  kann IL-6 das Chemokin IL-8 in Endothelzellen aktivieren und das Gefäßsystem beeinflussen. Die primäre Funktion dieses Zytokins ist die Induktion der Chemotaxis in den Zielzellen (z. B. neutrophile Granulozyten), um die Phagozytose einzuleiten (Modi et al., 1990).



**Abb. 2-3:** Pathogenetische Mechanismen der hämorrhagischen Fieber am Beispiel einer Infektion mit dem Ebolavirus (modifiziert nach Bray, 2005; Bray & Geisbert, 2005). Die Infektion der Makrophagen und dendritischen Zellen bewirkt eine überschießende Ausschüttung von Zytokinen, was zur Vasodilatation und Erhöhung der vaskulären Permeabilität, zur Mobilisierung monozytärer Zellen, zur Aktivierung der Blutgerinnung und zur Induktion apoptotischer Prozesse führt. Zusätzlich tritt eine Suppression der Typ I IFN Antwort auf. NO = Stickstoffoxid; TF = *tissue factor*.

Die *in vitro* untersuchte Überexpression der oben genannten Zytokine in PBMCs, vor allem des TNF- $\alpha$ , scheinen eine Rolle in der Induktion der Apoptose zu spielen und somit eine Ursache der Leukopenie zu sein (Choi et al., 2004; Carrasco et al., 2004; Bray, 2005; Jamin et al., 2008).

## 2.4 Genexpressionsanalyse

Bei Genexpressionsanalysen handelt es sich um molekularbiologische und biochemische Methoden, die dabei helfen, Expressionsprofile bestimmter Gene in Zellen zu ermitteln. Sie können auch für das gesamte Genom angewandt werden. Anhand der Analysen können sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Aktivität verschiedener Gene getroffen werden. Im Folgenden werden die Serielle



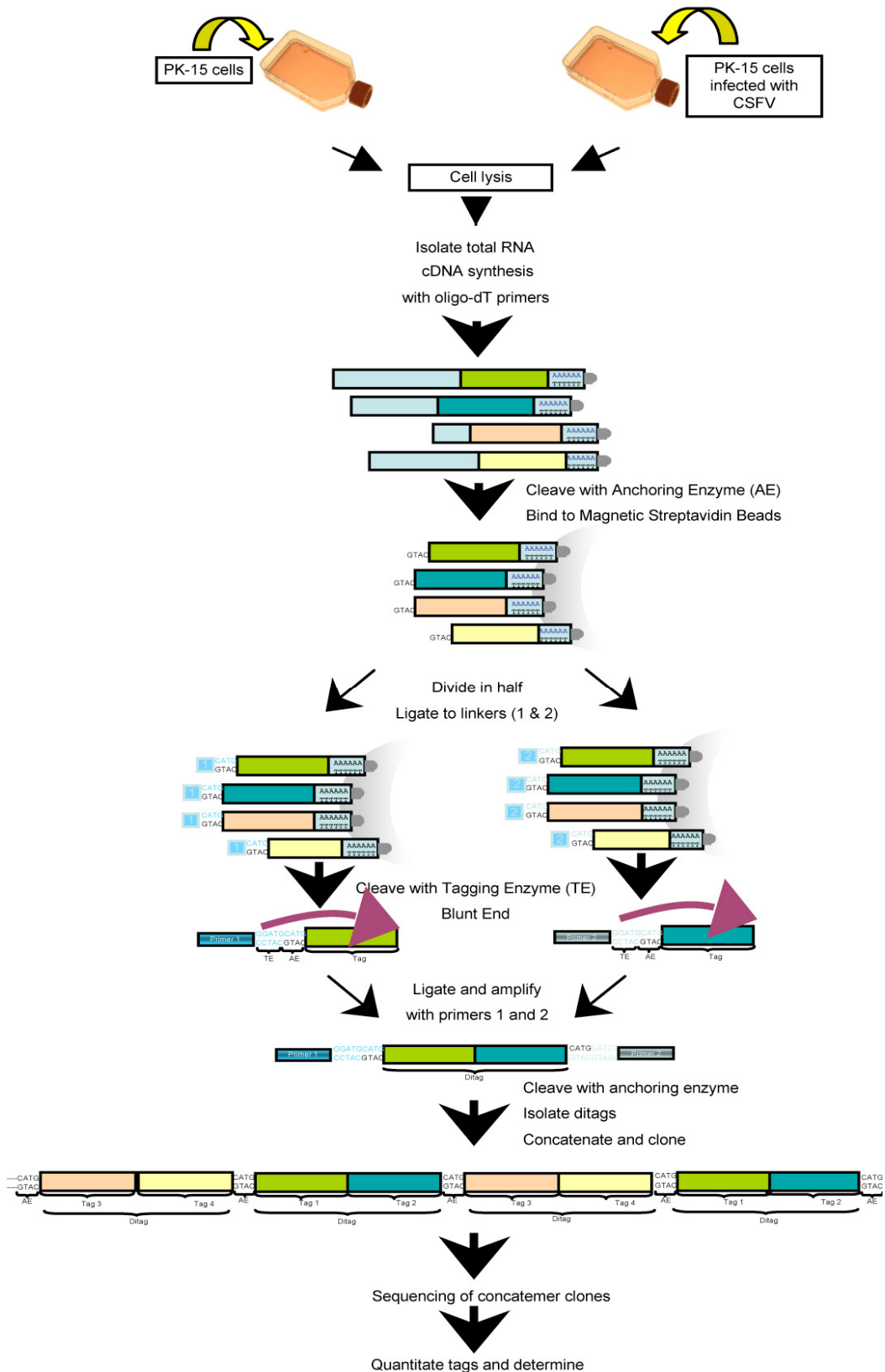
Analyse der Genexpression (SAGE) und die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) näher erläutert, da diese Methoden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

#### **2.4.1 Serielle Analyse der Genexpression**

Die 1995 entwickelte Methode SAGE erlaubt eine qualitative und quantitative Analyse einer großen Anzahl an mRNA-Transkripten in einem Ansatz. Die Methode ermöglicht es, das Transkriptom einer Zelle in einem beliebigen Entwicklungs- und Krankheitsstadium zu analysieren (Velculescu et al., 1995).

SAGE basiert auf zwei grundlegenden Prinzipien. Zum einen enthalten kurze Nukleotidsequenzen (*tags*) aus einer cDNA mit einer Länge von 9 bis 10 bp ausreichende Informationen, um ein mRNA-Transkript eindeutig zu identifizieren und einem ganz bestimmten Gen zuzuordnen zu können. Die Kürze der *tags* erlaubt auch eine serielle Sequenzierung, was einen wesentlich höheren Durchlauf ermöglicht. Notwendige Voraussetzung ist aber, dass die Position, an der sich der *tag* in der cDNA befindet, bekannt ist. Berechnungen zufolge findet man in über 90 % der Fälle tatsächlich nur ein dazugehöriges Gen (Velculescu et al., 1995). Zum anderen erlaubt ein Zusammenfügen kurzer Sequenz*tags* zu einem langen sequenzierbaren Concatamer eine effiziente Analyse der Transkripte. Dabei werden viele *tags* innerhalb eines einzigen Klons sequenziert (Velculescu et al., 1995). Die Sequenzanalyse der mRNA-Transkripte erfolgt durch spezielle Computerprogramme (Abb. 2-4). Die Variationen in der Häufigkeit der identifizierten *tags* zwischen verschiedenen Expressionsprofilen können dazu benutzt werden, um statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression herauszuarbeiten.

SAGE wurde zuerst verwendet, um die Genexpression im humanen Pankreas zu ermitteln. Dabei wurde NlaIII als *anchoring enzyme* und BsmFI als *tagging enzyme* verwendet (Velculescu et al., 1995). Im Vergleich zu anderen Methoden, die das gleiche Ziel verfolgen, erlaubt SAGE die Analyse von Genen, die noch unbekannt sind. Allerdings ist SAGE nicht nur eine aufwendige und zeitintensive, sondern auch eine sehr teure Methode.



**Abb. 2-4:** Schematische Darstellung der Seriellen Analyse der Genexpression (Abbildung erhalten von Laura Miller, *National Animal Disease Center*, Ames, Iowa nicht veröffentlicht).

### **2.4.2 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR und erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der eingesetzten Nukleinsäure. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Signal während eines PCR-Zyklus erfasst wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Es gibt die Möglichkeit, interkalierende Farbstoffe (z. B. SYBR Green), die sich in die doppelsträngige DNA einlagern (Higuchi et al., 1992, 1993), und sequenzspezifische Oligonukleotide (sogenannte Sonden) zu verwenden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Saiki et al., 1985). Für die quantitative Analyse wird die exponentielle Phase wegen der optimalen Reaktionsbedingungen herangezogen. Es gibt zwei Möglichkeiten der Quantifizierung. Auf der einen Seite steht die absolute Quantifizierung, bei der die Kopienzahl in Bezug auf eine Standardreihe bekannter Konzentrationen bestimmt wird. Eine interne Kontrolle ist hier nicht unbedingt erforderlich (Bustin, 2000). Auf der anderen Seite kann man eine relative Quantifizierung durchführen, indem man eine interne Kontrolle als Bezugsgröße verwendet und somit die zu untersuchenden Proben untereinander vergleichen kann. Als interne Kontrolle verwendet man ein *housekeeping* Gen, welches in allen Geweben möglichst gleich hoch exprimiert wird (Bustin, 2000).

### **2.4.3 Genexpressionsanalyse bei hämorrhagischen Fiebern**

Für ein besseres Verständnis der Pathogenese viraler hämorrhagischer Fieber und die Immunantwort des Wirts wurden Genexpressionsanalysen mithilfe von Microarrays oder der qRT-PCR durchgeführt. Dafür wurden Endothelzellen oder PBMCs verwendet, die *in vitro* infiziert oder direkt aus einem infizierten Tier isoliert und für die jeweiligen Untersuchungen vorbereitet wurden. Für die Ebola-Infektion in PBMCs konnte mittels Microarrays ein signifikanter Anstieg von bestimmten Zytokinen und Chemokinen vier Tage nach der Infektion (*days post infection, dpi*) nachgewiesen werden. Für die Auswertung wurden nur Zytokine berücksichtigt, die mindestens einen Anstieg um das 2,5-fache im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen hatten. Dabei fielen die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  auf. Einige Zytokine wie IL-2 oder IL-10 wurden ebenfalls detektiert, allerdings wurde keine Veränderung in der Genexpression beobachtet (Rubins et al., 2007). Bei Analysen mit humanen PBMCs, die *in vitro* mit dem Dengue-Virus infiziert wurden, wurde der Einfluss der Chemokine, Zytokine, Adhäsionsproteine, Chemokin- und Zytokinrezeptoren auf die

Pathogenese untersucht. Dafür wurden cDNA Expressionsarrays durchgeführt, die mehr als 350 Gene identifizieren. Dabei wurden u. a. Transkripte für IL-8 und IL-1 $\beta$  detektiert, die am Anfang der Infektion einen Anstieg zeigten, allerdings 24 hpi nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Moreno-Altamirano et al., 2004). Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Dengue-Fiebers soll das Zytokin IL-8 spielen und als Indikator für eine akute Verlaufsform der Erkrankung dienen (Raghupathy et al., 1998). In allen untersuchten Patienten, die eine akute Verlaufsform des Dengue-Fiebers zeigten, wurden hohe Konzentrationen an IL-8 im Serum nachgewiesen (Raghupathy et al., 1998).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiere und Material

#### 3.1.1 Tiere und Versuchsaufbau

Alle *in vivo* Infektionsversuche wurden im Rahmen der Aufgaben des EU Referenzlabors für KSP in den Stallungen des Instituts für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule, durchgeführt.

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Absatzferkel, die aus der Zucht des Lehr- und Forschungsguts der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Schäfersberg, Ruthe stammen. Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Tiere ca. zehn bzw. 18 Wochen alt und zeigten keine klinischen Symptome einer Erkrankung. Zur Unterscheidung der einzelnen Tiere wurden diese mit einer Ohrmarke markiert. Die Tiere wurden einstreulos unter Hochsicherheitsbedingungen gehalten und täglich mit einem kommerziell erhältlichen Futter versorgt. Die Wasserzufuhr erfolgte *ad libitum* über eine automatische Tränkeeinrichtung. Alle Tiere wurden zu Versuchsbeginn auf neutralisierende Antikörper gegen verschiedene Pestiviren untersucht und erwiesen sich als negativ. Von allen Tieren wurde täglich die Körpertemperatur gemessen sowie Anzeichen von klinischer Erkrankung dokumentiert. Im Versuchsverlauf wurden Tiere, die einen CS (Mittelholzer et al., 2000) über 12 aufwiesen, aus tierschutzrechtlichen Gründen schmerzlos durch die intravenöse Applikation einer Überdosis Pentobarbital getötet. Gleiches galt für Tiere mit einem niedrigen CS, aber einem nicht vertretbaren Leiden.

Im ersten Versuch wurden insgesamt 20 Absatzferkel im Alter von ca. zehn Wochen eingestallt und zufällig in vier Gruppen eingeteilt. Für die Studien der Pathogenese wurden nur drei Gruppen in die Auswertung einbezogen. In Gruppe 1 befanden sich vier Tiere für die Infektion mit dem Vakzinestamm C, Gruppe 2 enthielt drei Tiere für die Infektion mit dem moderat virulenten Stamm CSF0864 und die letzte Gruppe umfasste ebenfalls drei Tiere für die Infektion mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382. Die Infektion erfolgte intranasal mit 5 ml virushaltigem Zellkulturüberstand bzw. Voll-Blut infizierter Tiere. Die Virusdosis betrug  $5 \times 10^4$  Kulturinfektiöse Dosis 50 (KID<sub>50</sub>/5 ml. Die erste Blutentnahme fand 5 hpi statt. Alle weiteren Blutentnahmen wurden an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 7 durchgeführt. Das Blut wurde aus der *Vena jugularis* entnommen und die Menge betrug bei jeder Entnahme ca. 15 ml. Die

EDTA-Blutproben wurden für die Isolierung von PBMCs verwendet, die für Genexpressionsanalysen in der qRT-PCR vorbereitet wurden.

Im zweiten Versuch wurden drei Schweine im Alter von ca. 18 Wochen eingestallt. Diese wurden mit je 5 ml virushaltigem Voll-Blut infizierter Tiere (hoch virulenter KSPV-Stamm CSF0382) infiziert. Der weitere Versuchsablauf ist der oberen Versuchsbeschreibung zu entnehmen.

### **3.1.2 Zellen**

Die zellkulturellen Arbeiten wurden mit der permanenten, epitheloiden Zelllinie *porcine kidney-15* (Amsterdam) (PK15(A)) durchgeführt. Diese Zelllinie wird im EU Referenzlabor für KSP in Hannover in der KSP-Diagnostik und KSPV-Vermehrung eingesetzt. Sie wurde 1974 durch Einzelklonierung erhalten (Liess, persönliche Mitteilung). Die Zelllinie ist frei von Mykoplasmen und Pestiviren. Zusätzlich wurde die porcine Hodenzelllinie ST verwendet.

Die PBMCs, die sowohl für die *in vitro* als auch *in vivo* Infektionsversuche verwendet wurden, stammten aus Schweinen unterschiedlicher Rasse und unterschiedlicher Altersstufe. Zur besseren Unterscheidung der Tiere, aus denen die Zellen isoliert wurden, wurden diese in zwei Altersgruppen eingeteilt. Alle Schweine, die jünger als 18 Wochen waren, wurden der Altersgruppe 1 zugeordnet, alle Tiere, die älter als 18 Wochen waren, der Altersgruppe 2.

### **3.1.3 Virusisolate**

Für die Infektionsversuche und anschließende Analyse der Genexpression mittels SAGE und qRT-PCR wurde der hoch virulente KSPV-Stamm CSF0382 verwendet. Das Isolat stammt aus der Virusbank des EU Referenzlabors für KSP in Hannover. Zusätzlich wurden der moderat virulente KSPV-Stamm CSF0864 und der Impfstamm C verwendet, die ebenfalls aus der Virusbank des Europäischen Referenzlabors für KSP in Hannover stammten.

### **3.1.4 Sonstige Materialien**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, die Zusammensetzungen der verwendeten Medien, Puffer, Lösungen und Chemikalien sowie eingesetzte Enzyme und kommerziell erhältliche Kits werden im Anhang ausführlich aufgeführt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Klinische Parameter**

#### **3.2.1.1 Bestimmung des *Clinical Score* nach Mittelholzer et al., 2000**

Die Bewertung und Dokumentation der klinischen Symptome wurde im Verlauf des Infektionsversuchs täglich anhand des Standardprotokolls, welches am EU Referenzlabor für KSP gebräuchlich ist, vorgenommen. Das Untersuchungsschema bezieht sich auf die Dokumentation der klinischen Symptome anhand eines Punktesystems, einem sogenannten CS (Mittelholzer et al., 2000). Dabei werden neun KSP relevante Parameter (Lebhaftigkeit, Haltung, Nährzustand, Atmung, Gang, Haut, Augen, Appetit und Kotabsatz) je nach Ausprägungsgrad mit einer Punktzahl von null bis drei versehen. Die Summe der vergebenen Punkte ergibt den CS. Tiere mit einem CS über 12 wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen schmerzlos durch die Applikation einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Das gleiche galt für Schweine mit einem niedrigen CS, aber einem nicht vertretbaren Leiden. Eine pathologisch-anatomische Untersuchung wurde in jedem Fall durchgeführt.

#### **3.2.1.2 Bestimmung der Körpertemperatur**

Die Körpertemperatur wurde bei jedem Tier täglich mit einem digitalen Fieberthermometer rektal erfasst und dokumentiert.

### **3.2.2 Zellkulturtechnik**

Die Zelllinie PK15(A) wurde in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen unter Verwendung von *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) Erhaltungsmedium und 5 % fetalem Kälberserum (FKS), welches frei von Pestiviren und gegen sie gerichtete Antikörper war, kultiviert. Die Zelleinsaat erfolgte mit  $4,2 \times 10^5$  Zellen. Die Zellsuspension wurde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der Zellrasen war nach etwa drei Tagen konfluent. Zur Zellpassage wurde das Erhaltungsmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen mit Versen-Trypsin gewaschen. Anschließend wurden 2 ml frisches Versen-Trypsin auf die Zellen pipettiert und für ca. 10 min bei 37 °C inkubiert. Sobald sich der Zellrasen von dem Zellkulturflaschenboden gelöst hat, wurden die Zellen in 8 ml frischem Erhaltungsmedium aufgenommen, resuspendiert und 2 ml der Zellsuspension mit 18 ml Medium weiter passagiert. Die Passagierung

der ST-Zellen erfolgte auf gleiche Art und Weise, allerdings wurde das Erhaltungsmedium EMEM mit 10 % FKS verwendet.

### 3.2.3 Virusanzucht

Die Anzucht der KSPV-Isolate CSF0382, CSF0864 und C-Stamm erfolgte auf PK15(A) Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, wobei  $4,2 \times 10^5$  Zellen eingesät wurden. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Erhaltungsmedium entfernt und 1 ml virushaltiger Zellkulturüberstand auf den Zellrasen gegeben. Es erfolgte eine einstündige Adsorption im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde die Virussuspension vom Zellrasen entfernt, dieser drei Mal mit sterilem PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und mit 8 ml Erhaltungsmedium aufgefüllt. Es folgte eine 72stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Um das Virus zu ernten, wurde ein Gefrier-Tau-Zyklus durchgeführt. Dabei wurde die Zellkulturflasche für mehrere Stunden bei -80 °C eingefroren und anschließend zügig aufgetaut. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C für 15 min bei 437 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Cryogefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Virustiters.

### 3.2.4 Virustitration

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte als Endpunktverdünnung in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) (Frey & Liess, 1971). Es wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe des Zellkulturüberstandes von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  in EMEM, 10 % FKS und Antibiotikazusatz in Kahnröhrchen angelegt und je 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe in vier Kavitäten der Mikrotiterplatte gefüllt. Hinzu wurden je 50 µl einer auf  $1,6 \times 10^6$  Zellen eingestellten Zellsuspension hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde in einer feuchten Kammer für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte mikroskopisch nach Hitzefixierung und einer indirekten Immunfärbung durch den *Peroxidase-linked Antibody Assay* (PLA). Die KID<sub>50</sub> wurde mithilfe der Gleichung nach Kaerber (1931) ermittelt.

$$\log KID_{50} = \log_{1,0} - \log_{int} (S-0,5)$$

log KID<sub>50</sub>: Logarithmus der KID<sub>50</sub>

log<sub>1,0</sub>: Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe mit der Reaktionsrate R=1

log<sub>int</sub>: Logarithmus des Verdünnungsintervalls

S: Summe der Reaktionsraten



### 3.2.5 Indirekte Immunfärbung (Peroxidase-linked Antibody Assay)

Zum Nachweis von KSPV Antigen wurde eine indirekte Immunfärbung mit einem Peroxidase-Konjugat (PO-Konjugat) des pestiviruspezifischen monoklonalen Antikörpers BVD/C16 und *Rabbit anti-Mouse* Peroxidase-Konjugat durchgeführt (Greiser-Wilke et al., 1992).

Für die Hitze-fixierung der Zellen in Mikrotiterplatten wurde das Kulturmedium aus den Kavitäten mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und der Zellrasen dreimal mit 1/3 PBS gewaschen. Die Fixierung der Platten erfolgte bei 80 °C für drei Stunden im Heißluftsterilisator. Der Zellrasen wurde bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden je 50 µl des entsprechend verdünnten BVD/C16-PO-Konjugat (1:200 verdünnt mit PBS-0,1 % Tween<sub>20</sub>) in jede Kavität pipettiert und anschließend 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatten mit PBS-Tween<sub>20</sub> (Zusatz von 0,1 % Tween<sub>20</sub>) wurde 20 min mit der Substratlösung, die 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Natriumacetat und 3 %iges Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) enthielt, inkubiert.

Die Umsetzung des Substrats führte zu einem roten Niederschlag im Bereich des Zytoplasmas. Die AEC-Lösung wurde mit einer Multikanalpipette entfernt und die Reaktion mit *Aqua bidest.* gestoppt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch.

### 3.2.6 Gewinnung der Blutproben

Für die Blutentnahme aus der *Vena jugularis* wurden kommerziell erhältliche Blutentnahmeröhrchen und Adaptersysteme der Firma KABE<sup>®</sup> Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, verwendet. Zur Blutentnahme wurden die Tiere entweder von zwei Personen auf dem Rücken oder aber bei Tieren über 40 kg von einer Person per Nasenschlinge fixiert. Das entnommene EDTA-Blut wurde in die entsprechenden Blutentnahmeröhrchen aufgenommen. Das Blut für die *in vitro* Infektionsversuche stammte von KSPV-freien Schweinen unterschiedlicher Rasse und Altersstufe aus der Klinik für kleine Klauentiere, Tierärztliche Hochschule Hannover.

### 3.2.7 Isolierung von PBMCs

Die EDTA-Blutproben wurden noch am selben Tag der Blutentnahme aufgearbeitet. Für die Isolierung von PBMCs wurden ca. 15 ml EDTA-Blut von sowohl gesunden als auch KSPV-infizierten Schweinen benötigt. Dieses wurde zuerst 1:2 in 50 ml Falcon-Röhrchen mit sterilem PBSM verdünnt und anschließend mit 15 ml Ficoll-Lösung unterschichtet.

Eine Zentrifugation erfolgte bei 1000 g und 4 °C für 30 min, wobei die Bremse ausgestellt werden musste. Anschließend wurde die Leukozyten-reiche Interphase mit einer Glaspipette entnommen und in ein neues, mit 10 ml sterilem PBSM befülltes Röhrchen überführt. Die Leukozyten wurden bei 500 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, wobei die Bremse wieder angestellt werden durfte. Daraufhin wurde der Überstand verworfen. Zur Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten wurde das Pellet zuerst mit 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O versetzt, ca. 20 Mal geschwenkt und anschließend mit 10 ml sterilem 2 x PBSM verdünnt. Eine Zentrifugation erfolgte bei 350 g und 4 °C für 10 min. Im nächsten Schritt wurde das Pellet mit 10 ml sterilem PBSM gewaschen und bei 350 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen entweder in Einfriermedium (RPMI 1640 + L-Glutamin + 1 % Penicillin / Streptavidin + 20 % Schweineserum + 10 % DMSO) aufgenommen und zügig bei -80 °C eingefroren, oder für weitere Versuche ohne DMSO bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

### 3.2.8 Nukleinsäure-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN®, Hilden) durchgeführt. Dafür wurden Säulen verwendet, die eine Silica-Gel-Membran enthielten.

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten die Arbeiten in einem separaten Labor. Die Isolierung der RNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Photometers ermittelt, indem die RNA-Probe 1:125 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$C [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

C = Konzentration der Ausgangslösung

OD<sub>260</sub> = Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

V = Verdünnungsfaktor (125)

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA; 40 für ssRNA)

### 3.2.9 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden 100 ng der isolierten RNA unter Zugabe von 8 µl Reverse Transkriptase-Puffer, 8 µl Nukleotide (je 2,5 mM) und der entsprechenden

Menge DEPC-Wassers (Mastermix I) zunächst denaturiert. In einem zweiten Schritt wurde durch Zugabe der Oligo (dT) Primer, eines RNase-Inhibitors sowie der Reversen Transkriptase (Mastermix II) die Synthese der cDNA gestartet. In Tabelle 3-1 ist das thermische Profil der Reversen Transkription dargestellt.

**Tabelle 3-1:** Thermisches Profil für die Reverse Transkription.

Temperatur	Dauer
70 °C	∞
70 °C	5 min
4 °C	∞
22 °C	5 min
37 °C	15 min
42 °C	30 min
99 °C	5 min
4 °C	∞

### 3.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 3.2.10.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle, gelbasierte PCR wurde für die Identifizierung der Produkte verwendet. Die thermischen Profile änderten sich entsprechend der verwendeten Primer für die jeweiligen Zytokine. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem separaten Raum durchgeführt, um die Kontaminationsgefahr zu vermindern.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche RNA-Isolierung wurde nach der cDNA-Synthese mit einer PCR ein Abschnitt des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin mit einer Größe von 114 bp mit folgenden Primern amplifiziert (Duvigneau et al., 2005):

**Tabelle 3-2:** Verwendete Primer für das Gen  $\beta$ -Aktin mit einer Fragmentgröße von 114 bp (Duvigneau et al., 2005).

Gen	<b>Forward-Primer (5'→3') / Reverse-Primer (5'→3')</b>	Fragmentgröße
$\beta$ -Aktin	CTCGATCATGAAGTGCGACGT	114 bp
	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	

Dabei wurden zu dem kommerziell erhältlichen 1.1 ThermoStart<sup>®</sup> PCR Mastermix der Firma Fisher Scientific<sup>®</sup>, der zu je 45  $\mu$ l portioniert wurde, je 1  $\mu$ l (jeweils 30 pmol)

des *Forward*- und *Reverse*-Primers und 3 µl cDNA pipettiert. Dafür wurde anschließend folgendes Programm verwendet:

**Tabelle 3-3:** Thermisches Profil der  $\beta$ -Aktin PCR.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
95 °C	15 min	1
95 °C	1 min	34
56 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	∞	

Es wurden fünf Zytokine ausgewählt, von denen angenommen wird, dass sie bei der Ausbildung klinischer Erscheinungen eine Rolle spielen bzw. die Symptome der Erkrankung verstärken könnten. Dafür wurden Primer für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  verwendet. Die Primer wurden aus der Publikation von Borca et al. (2008) übernommen. Die Annealingtemperatur der Primer wurde entsprechend angepasst (Tabelle 3-4).

**Tabelle 3-4:** Auswahl der Primer für die zu untersuchenden Zytokine. Bei der Literaturrecherche wurden nur qRT-PCRs berücksichtigt.

Zytokin	<i>Forward-Primer</i> (5'→3') / <i>Reverse-Primer</i> (5'→3')	Fragment- größe	Annealing- temperatur
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	AACGTGCAGTCTATGGAGT	122 bp	57 °C
	GAACACCACTTCTCTCTTCA		
<i>IL-6</i>	CTGGCAGAAAACAACCTGAACC	93 bp	57 °C
	TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC		
<i>IL-8</i>	AAGCTTGTCAATGGAAAAGAG	101 bp	57 °C
	CTGTTGTTGTTGCTTCTCAG		
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	AACCTCAGATAAGCCCGTCCG	128 bp	57 °C
	ACCACCAGCTGGTTGTCTTT		
<i>IFN-<math>\beta</math></i>	AGTGCATCCTCCAAATCGCT	58 bp	57 °C
	GCTCATGGAAAGAGCTGTGGT		

### 3.2.10.2 Herstellung positiver Kontrollen

Bei jeder PCR wurden entsprechende positive Kontrollen für die nachzuweisenden Zytokine mitgeführt. Als positive Kontrollen für IL-1 $\beta$  und IL-8 wurden PBMCs, die zuvor mit 10 mg / ml Lipopolysaccharid (LPS) für 24 h behandelt wurden, eingesetzt (Knoetig et al., 2002). Die Zytokine IL-6 und IFN- $\beta$  wurden in PK15(A) Zellen induziert, indem sie 72 h mit dem Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), Stamm New Jersey (NJ), infiziert wurden (Trottier et al., 2007). Anschließend wurden die Zellen mit einem Lysispuffer (aus *RNeasy Mini Kit*, QIAGEN<sup>®</sup>) lysiert. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden sie als positive Kontrollen in der qRT-PCR eingesetzt. TNF- $\alpha$  wurde im Zellkulturüberstand von PK15(A) Zellen, die mit porcinem Influenzavirus (*swine influenza virus*, SIV) infiziert waren, nachgewiesen. Die Probe wurde freundlicherweise von der Diagnostik des Instituts für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt (Tabelle 3-5).

**Tabelle 3-5:** Verwendete positive Kontrollen für jede PCR.

Zytokin	Positive Kontrolle
IL-1 $\beta$	PBMCs induziert mit 10 mg / ml LPS für 24 h
IL-6	PK15(A) Zellen infiziert mit VSV-NJ
IL-8	PBMCs induziert mit 10 mg / ml LPS für 24 h
TNF- $\alpha$	PK15(A) Zellen infiziert mit SIV, Isolat 7
IFN- $\beta$	PK15(A) Zellen infiziert mit VSV-NJ

### 3.2.10.3 SYBR Green real-time PCR

Für die SYBR Green real-time PCR wurde der Mastermix *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (QIAGEN<sup>®</sup>) verwendet. Zu diesem Mastermix wurden je 1  $\mu$ l des jeweiligen Primers (30 pmol) und 3  $\mu$ l des Templates pipettiert und zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l mit sterilem RNase freiem Wasser (im Kit enthalten) aufgefüllt. Der Mastermix wurde in PCR-Röhrchen pipettiert und nach kurzem Zentrifugieren in das real-time PCR-Gerät Mx3005 (Agilent Technologies<sup>®</sup>) gestellt. Bei jeder PCR wurde der Nachweis für das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin als Referenz mitgeführt, um die Ergebnisse mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode auswerten zu können. Folgendes thermisches Profil wurde für alle Zytokine verwendet:

**Tabelle 3-6:** Thermisches Profil der real-time PCR für alle getesteten Zytokine.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
95 °C	15 min	1
95 °C	1 min	40
57 °C	1 min	

### 3.2.10.3.1 Auswertung nach $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode war eine der ersten Methoden, die für die quantitative Berechnung der PCR-Ergebnisse verwendet wurde. Die errechneten Werte sind Annäherungswerte an den eigentlichen Wert. Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mithilfe des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes angegeben. Der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) gibt den Wert an, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant ansteigt und messbar ist. Die Normalisierung erfolgt anhand eines *housekeeping* Gens und die anschließende relative Quantifizierung wird in Bezug auf einen Kontrollwert durchgeführt (z. B. Nullwert oder nicht behandelte Probe). Wichtig bei dieser Methode ist, dass die Ct-Werte des *housekeeping* Gens bei allen zu untersuchenden Proben in der gesamten PCR-Reaktion vergleichbar sein müssen. Die Ct-Werte der zu bestimmenden Probe werden von dem Ct-Wert des *housekeeping* Gens subtrahiert ( $\Delta Ct$ ). Anschließend wurden auch die Ct-Werte der zu vergleichenden Gruppe (z. B. infiziert / nicht infiziert) wie beschrieben von einander subtrahiert. Mithilfe der Gleichung  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  wird die n-fache Expression bestimmt.

### 3.2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikation der Produkte in der PCR wurde qualitativ über die Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel überprüft. Dafür wurde TBE-Elektrophoresepuffer mit 2 % w/v Agarose in einem Erlenmeyerkolben gemischt und erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gefüllt.

Um die Proben nach der Polymerisation auf das Gel zu laden, wurde jedes PCR-Amplifikat mit jeweils 3  $\mu$ l Ladepuffer gemischt und in die jeweilige Geltasche pipettiert. 5  $\mu$ l (0,2  $\mu$ g DNA /  $\mu$ l) eines DNA-Längenstandards (10 kb Marker) wurden ebenfalls mit dem Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche gefüllt.

Die Fragmente wurden bei einer Spannung von 130 V im Gel aufgetrennt und daraufhin für etwa 10 min in einem 0,2 %igen Ethidiumbromidbad gefärbt.

Anschließend wurde das Gel für ca. 10 min im Wasserbad entfärbt. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator (Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht, mit einer CCD-Kamera fotografiert und ausgedruckt.

### **3.2.12 Serielle Analyse der Genexpression**

Für die Erstellung der SAGE-Bibliotheken wurden infizierte und nicht-infizierte PK15(A) Zellen verwendet. Die Zellen wurden jeweils 2, 6 und 24 hpi lysiert und die Gesamt-RNA wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN®) isoliert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels Photometer bestimmt. Die RNA wurde bei -80 °C bis zum nächsten Schritt aufbewahrt oder aber direkt für die Erstellung der SAGE-Bibliotheken verwendet.

#### **3.2.12.1 Präparation der mRNA aus der Gesamt-RNA**

Die mRNA wurde aus der Gesamt-RNA mithilfe von magnetischen Streptavidin-gekoppelten Partikeln, die mit biotinylierten Oligo (dT) Primern markiert sind, isoliert. Die *Dynabeads* (aus *mRNA direct Kit*, Invitrogen®) wurden gut gemischt und 100 µl in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend auf einen Magneten gestellt. Nach ca. 30 sec wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt und verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde vom Magneten genommen und die *Dynabeads* mit 500 µl *lysis/binding* Puffer (aus *Dynabeads mRNA Direct Kit*, Invitrogen®) gewaschen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß erneut auf den Magneten gestellt und der Überstand nach 30 sec entfernt. In einem separaten 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 ng RNA vorbereitet. Die RNA wurde nun mit den *Dynabeads* vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden diese mit dem Waschpuffer A (Zusammensetzung im Anhang) gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Daraufhin wurden die *Dynabeads* einmal mit einem weiteren Waschpuffer (Puffer B, Zusammensetzung siehe Anhang) und vier Mal mit je 100 µl *1 x First Strand Buffer* gewaschen.

#### **3.2.12.2 cDNA-Synthese**

Nach dem Entfernen des *1 x First Strand Buffer* wurden folgende Komponenten für die cDNA Synthese zu den *Dynabeads* pipettiert:

**Tabelle 3-7:** SAGE: Ansatz der cDNA-Synthese Teil 1.

Reagenz	Menge
Biotin-Oligo (dT) (1 µg / µl)	2,5 µl
5 x <i>First Strand Buffer</i>	18 µl
0.1 M DTT	9 µl
10 mM dNTPs	4,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	54 µl
RNase Inhibitor	1 µl

Anschließend wurde der Mastermix gut gemischt und für 2 min bei 50 °C inkubiert. Daraufhin wurden dem Ansatz 3 µl *Superscript III Reverse Transkriptase* (Invitrogen®) hinzugesetzt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 50 °C, wobei alle 15 min das Röhrchen kurz gemischt wurde. Nach der Inkubation wurde die Probe auf Eis gestellt und mit 465 µl kaltem DEPC-H<sub>2</sub>O versetzt. Anschließend wurden folgende Komponenten zu dem Ansatz pipettiert und gemischt:

**Tabelle 3-8:** SAGE: Ansatz der cDNA-Synthese Teil 2.

Reagenz	Menge
5 x <i>Second Strand Buffer</i>	150 µl
10 mM dNTPs	15 µl
mischen und anschließend wieder auf Eis stellen; Enzyme in folgender Reihenfolge zu der Probe dazugeben	
E. coli Ligase	5 µl
E. coli DNA Polymerase I	15 µl
E. coli RNase H	5 µl

Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 16 °C, wobei das Röhrchen alle 15 min kurz gemischt wurde. Nach der Inkubation wurden dem Ansatz 50 µl EDTA (pH 7,5) auf Eis dazugegeben.

### 3.2.12.3 Restriktionsverdau mit NlaIII

Anschließend wurde die cDNA mit einer Restriktionsendonuklease (*anchoring enzyme*) geschnitten, von der bekannt ist, dass sie mindestens einmal im Genom schneidet. Für diese Methode werden Restriktionsenzyme verwendet, die eine Erkennungssequenz von vier Basen besitzen und gewährleisten, dass die Enzyme



im Durchschnitt alle 256 bp im Genom schneiden. Der größte Teil der geschnittenen cDNA wurde aufgrund des biotinylierten Primers am 3'-Ende des Genoms durch Streptavidin-gekoppelte Partikel gebunden.

Für die weiteren Schritte wurden folgende Puffer frisch angesetzt: 1 x Puffer B+W mit 1 % SDS und 10 mg Glykogen; 1 x Puffer B+W mit 4 x BSA; 1x Puffer 4 mit 4 x BSA und LoTe Puffer.

Die Probe wurde auf dem Magneten platziert und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Anschließend wurden 750 µl 1 x Puffer B+W mit 1 % SDS und 10 mg Glykogen dazugegeben und gemischt. Daraufhin wurde die Probe für 10 min bei 75 °C inkubiert und erneut auf den Magneten gestellt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit dem 1 x Puffer B+W mit 1 % SDS und 10 mg Glykogen. Nach dem Entfernen des Überstands (auf dem Magneten) wurde die Probe vier Mal mit je 750 µl 1 x Puffer B+W mit 4 x BSA und anschließend einmal mit 200 µl 1 x Puffer 4 mit 4 x BSA gewaschen. Der gesamte Inhalt des Röhrchens wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt und erneut zwei Mal mit je 200 µl 1 x Puffer 4 mit 4 x BSA gewaschen. Das Röhrchen wurde auf den Magneten gesetzt und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Daraufhin wurden 173 µl LoTe Puffer, 8 µl BSA und 20 µl 20 x Puffer 4 und 5 µl des Enzyms NlaIII zum Ansatz gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden die *Dynabeads* zwei Mal mit je 750 µl Puffer B+W mit 1 % SDS und 10 mg Glykogen und vier Mal mit je 750 µl 1 x Puffer B+W mit 4 x BSA gewaschen.

### **3.2.12.4 Ligation der Linker an die cDNA-Fragmente**

Im nächsten Schritt wurde die cDNA auf zwei Ansätze aufgeteilt und mit zwei verschiedenen Linkern ligiert, die ein *sticky end* zum Andocken an die Restriktionsendonuklease besaßen. Desweiteren trugen beide Linker eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym (*tagging enzyme*) vom Typ II.

Für die folgenden Schritte wurden die Linker 1 und 2 vorbereitet. Dafür wurden zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße bereitgestellt, die mit je 9 µl Linker 1A (oder 2A) und 1B (oder 2B), 9 µl LoTe Puffer und 2 µl 10x Puffer 4 befüllt wurden. Diese wurden für 2 min bei 95 °C und anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben auf den Magneten gestellt und der Überstand wurde entfernt und verworfen. Die Probe wurde zwei Mal mit je 150 µl 1 x Ligase Puffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift zu je 75 µl auf zwei neue Reaktionsgefäße verteilt. Zu diesen Ansätzen wurden folgende Komponenten hinzupipettiert:

**Tabelle 3-9:** SAGE: Ansatz der Ligation der Linker an die cDNA-Fragmente.

	<b>Röhrchen 1</b>	<b>Röhrchen 2</b>
LoTe Puffer	13 µl	13 µl
Linker 1A, B	2 µl	-
Linker 2A, B	-	2 µl
5 x Ligase Puffer	4 µl	4 µl
Linker 1A	5'-TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG-3'	
Linker 1B	5'-TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC C-3'	
Linker 2A	5'-TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG-3'	
Linker 2B	5'TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG-3'	

Daraufhin wurden die Proben für 2 min bei 50 °C und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde je 1 µl T4 *Ligase High Concentration* hinzugegeben und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe 500 µl 1 x B+W Puffer mit 4 x BSA hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben vereint. Die Probe wurde auf den Magnet gestellt und der Überstand wurde verworfen. Der Ansatz wurde anschließend erneut einmal mit 500 µl und zwei Mal mit je 200 µl 1 x B+W Puffer mit 4 x BSA gewaschen.

### 3.2.12.5 Restriktionsverdau mit BsmFI und *Blunt Ending Release*

Bei dem BsmFI handelt es sich um ein Typ II Restriktionsenzym, welches nicht direkt an der asymmetrischen Erkennungsstelle GGATG, sondern 13 bp weiter in Richtung des ehemaligen poly-A-Schwanzes schneidet, um den *tag* vom biotungebundenen Rest zu trennen. Auf diese Weise erhält man einen eindeutigen *tag*, der durch die letzte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease vor dem poly-A-Ende der mRNA und den zusätzlichen 9 bis 10 bp des *tags*, charakterisiert ist.

Der Überstand der Probe wurde auf dem Magneten entfernt und 172 µl LoTe Puffer, 20 µl 10 x Puffer 4, 8 µl 100 x BSA und 4 µl BsmFI (2 U/µl) wurden in das Probenröhrchen pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 65 °C für 1 h. Nach der Inkubation wurde die Probe auf den Magneten gestellt und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Lagerung über Nacht wurden der

Probe 200 µl Phenolchloroform zugesetzt und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 133 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc, 3 µl Glykogen (5 mg / ml) und 850 µl 100 %iges Ethanol versetzt und bei -20 °C gelagert.

Die Probe wurde am nächsten Tag für 30 min bei 4 °C bei 20000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 2 min bei RT und 20000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 33,5 µl LoTe Puffer aufgenommen und mit 10 µl 5 x 2nd *Strand* Puffer, 2,5 µl 10 mM dNTPs und 3 µl Klenow (1 U / µl) versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde erneut präzipitiert.

### 3.2.12.6 Herstellung von Ditags

Die Linker verblieben zunächst am *tag*. Die getrennten Ansätze wurden wieder vereint und unter Einwirkung einer Ligase wurden zwei *tags* zu einem *Ditag* ligiert.

Nach dem Waschen und Zentrifugieren der Probe wurde das Pellet in 1 µl LoTe Puffer resuspendiert. In einem separaten Reaktionsgefäß wurde der Ligationsansatz für die Herstellung von *Ditags* mit 1,25 µl 3 mM TrisHCl (pH 7,5), 1,5 µl 5 x Ligase Puffer und 1 µl T4 Ligase *High Concentration* pipettiert. Der Ligationsansatz wurde gemischt und 1 µl wurde zu dem resuspendierten Pellet hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

### 3.2.12.7 Amplifikation der Ditags mittels PCR

Durch die PCR wurden die *Ditags* unter Einsatz von linkerspezifischen Primern amplifiziert. Zu dem Ligationsansatz vom Vortag wurden 14 µl LoTe Puffer hinzugegeben. Um die optimale Verdünnung in der PCR einzusetzen, wurde vorab eine Kontroll-PCR mit drei Verdünnungen (1:50, 1:100 und 200) von der Probe angesetzt. Folgender Mastermix wurde hierfür hergestellt (für 5 Reaktionen):

**Tabelle 3-10:** SAGE: Ansatz für die Amplifikation der *Ditags* mittels PCR.

Reagenz	Menge
10 x PCR Puffer	25 µl
DMSO	15 µl
10 mM dNTPs	37,5 µl
Primer 1 (350 ng / µl)	5 µl
Primer 2 (350 ng / µl)	5 µl
Nuclease freies Wasser	152,5 µl

Reagenz	Menge
Platinum Taq (5 U / $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l
<b>Primersequenz Primer 1</b>	5'-GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA-3'
<b>Primersequenz Primer 2</b>	5'-CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT-3'

Je 49  $\mu$ l des Mastermixes wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend wurde 1  $\mu$ l der jeweilig verdünnten Probe hinzupipettiert. Die Reaktion lief bei folgendem Temperaturprofil ab:

**Tabelle 3-11:** SAGE: Thermisches Profil für die Amplifikation der *Ditags*.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
94 °C	1 min	1
94 °C	30 sec	27
55 °C	1 min	
70 °C	1 min	
70 °C	5 min	1
4 °C	$\infty$	

In der Zwischenzeit wurde ein 12 %iges Polyacrylamid Gel gegossen:

**Tabelle 3-12:** SAGE: Ansatz für das 12 %ige Polyacrylamidgel zur Kontrolle der *Ditags*-Amplifikation.

Reagenz	Menge
10 x TAE	3,5 ml
29:1 Polyacrylamid	10,5 ml
Autoklaviertes Wasser	20,7 ml
10 %iges APS	300 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l

Der Ansatz wurde gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Das Gel wurde mit einem 50 kb Marker (7  $\mu$ l LoTe Puffer + 3  $\mu$ l Marker + 2  $\mu$ l Ladepuffer) und den jeweiligen Proben (10  $\mu$ l Probe + 2  $\mu$ l Ladepuffer) beladen. Die Gelelektrophorese lief etwa 2,5 h bei 160 V. Anschließend wurde es im Dunkeln für 30 min im Ethidiumbromidbad gefärbt. Nach der Kontroll-PCR wurde ein Großansatz für zwei 96-Well Platten pipettiert und die 1:100 verdünnte Probe wurde als Template in der PCR eingesetzt. Anschließend wurden die *Ditags* aus dem 12 %igen

Polyacrylamidgel isoliert, mit SYBR Green gefärbt und für weitere Schritte gereinigt und präzipitiert.

### **3.2.12.8 Entfernung der Linker**

Nach der PCR wurden die Linker durch ein Typ II Restriktionsenzym entfernt.

Nach der Präzipitation wurden die *Ditags* mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend im LoTe Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Linker von den *Ditags* entfernt, indem diese mit NlaIII für 1 h bei 37 °C behandelt wurden. Die verdauten *Ditags* wurden erneut aus einem 12 %igen Polyacrylamidgel isoliert und gereinigt.

### **3.2.12.9 Herstellung von Concatameren**

Durch das Vorhandensein von *sticky ends* konnten die einzelnen *Ditags* zu einem langen Concatamer ligiert werden.

Nach der Präzipitation und Reinigung wurden die *Ditags* mit 5 x Ligase Puffer und der T4 *High Concentration* Ligase für 3 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden die zu Concatameren ligierten *Ditags* präzipitiert.

Nach der Reinigung wurde die Probe erneut auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach 3stündiger Gelelektrophorese bei 130 V aus dem Gel isoliert.

### **3.2.12.10 Klonierung**

Anschließend wurden die Concatamere in Plasmide kloniert. Dafür wurde die Probe mit 1 µl pZero Plasmid (25 ng / µl), 5 x Ligase Puffer und 1 µl T4 Ligase (1 U / µl) versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe zwei Mal mit je 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet in 10 µl LoTe Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Plasmide mittels Elektroporation (2,0 kV, 200 Ω und 25 µF) in *E.coli* Bakterien gebracht, mit 1000 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C und 300 rpm für 30 min im Schüttelinkubator inkubiert. Daraufhin wurden 20 µl der Bakterien-Suspension auf Zeocin-enthaltenden Agarplatten ausplattiert. Nach ca. 16 h wurden einzelne Kolonien gepickt und in einer Kolonie-PCR mit den Primern T7 und SP6 (je 100 µM) und der Taq Polymerase DyNAzyme auf das Vorhandensein des Inserts kontrolliert (Tabelle 3-13).

**Tabelle 3-13:** SAGE: Temperaturprofil der Kolonie-PCR: Kontrolle der Elektroporation nach Klonierung der Concatamere in ein pZero Plasmid.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
94 °C	1 min	1
94 °C	10 sec	34
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	∞	

Nach positivem Ergebnis wurde die Bakteriensuspension erneut auf mindestens zehn Zeocin-enthaltenden Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gepickten Kolonien wurden im SOC-Medium in 96-Well Platten vermehrt und die Plasmide mithilfe des Plasmidpräparationskits (QIAGEN®) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Mittels plasmidspezifischer Primer wurden die Plasmide sequenziert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Blast Option der EST Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Serielle Analyse der Genexpression

#### 4.1.1 Erstellung der Bibliotheken

Die *in vitro* Infektionsversuche als Vorbereitung für die SAGE-Versuche wurden im Institut für Virologie durchgeführt. Dafür wurden PK15(A) Zellen mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 infiziert. Nach 2, 6 und 24 wurden die Zellen mit einem Lysispuffer (QIAGEN®) lysiert. Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN®) isoliert und die mRNA mithilfe von biotinylierten Oligo (dT) Primern von der Gesamt-RNA getrennt. Die eigentlichen SAGE-Versuche fanden am *National Animal Disease Center* in Ames, Iowa statt. Dafür wurde das MicroSAGE Protokoll (Croix et al., 2001) verwendet.

Es wurden insgesamt vier SAGE-Bibliotheken erstellt und analysiert. Drei Bibliotheken stammten aus infizierten PK15(A) Zellen der Zeitpunkte 2 hpi, 6 hpi und 24 hpi. Zusätzlich wurde eine Kontrollbibliothek aus nicht-infizierten PK15(A) Zellen des Zeitpunktes 24 h hinzugezogen. Die erstellten Plasmide wurden sequenziert.

#### 4.1.2 Analyse der Bibliotheken

Nach der Sequenzierung erfolgte die Analyse der erhaltenen Daten. Anhand der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym NlaIII (CATG) wird die Leserichtung des *tag* festgelegt.

Zur Zuordnung der erhaltenen SAGE *tags* wurden die 14 Basen langen Fragmente unter Nutzung der *Blast* Option mit der porcinen EST Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) bzw. <http://compbio.dfci.harvard.edu/Blast>) verglichen. Eine erfolgreiche Identifizierung der *tags* erfolgt mithilfe der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym.

Die *tags* wurden anschließend anhand ihrer zellulären Funktionen eingeteilt. Die Analyse der SAGE-Bibliotheken ergab, dass jede Bibliothek aus etwa 40,000 *tags* bestand (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1:** Gesamtzahl der *tags*, die nach den Sequenzierungen der vier Bibliotheken ermittelt werden konnten.

	<b>PK15(A) 24 h Kontrolle</b>	<b>PK15(A) 2 hpi CSF0382</b>	<b>PK15(A) 6 hpi CSF0382</b>	<b>PK15(A) 24 hpi CSF0382</b>
<b>Gesamtzahl <i>tags</i></b>	42 474	40 648	36 200	37 809

Die Funktionen der 14 Basen langen Fragmente konnten zu einem großen Teil dem zellulären Transport, der Bildung des Zytoskeletts, der Glykolyse und der Atmungskette zugeordnet werden. Allerdings fanden sich auch *tags*, die in apoptotische Prozesse, oxidativen Stress oder der Regulation der Transkription involviert sind. In Tabelle 4-2 sind ausgesuchte, identifizierte Gene und ihre dazugehörigen Funktionen aufgelistet. Für das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin wurde in allen untersuchten SAGE-Bibliotheken eine ähnliche Anzahl an *tags* identifiziert. Die NADH-Dehydrogenase, eine Oxidoreduktase in der mitochondrialen Atmungskette, zeigte im Vergleich zur Kontrollbibliothek schon 2 hpi einen Anstieg in der Genexpression, der bis 24 hpi anhält. Tubulin- $\alpha$ , ein Protein des Zytoskeletts, zeigte 2 hpi ebenfalls einen Anstieg in der Genexpression, die aber bis 24 hpi wieder auf den Wert der Kontrollbibliothek zurückgefallen war. Eine Abnahme der Anzahl der *tags* wurde für das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), ebenso wie für einige Hitzeschockproteine detektiert. Für das Annexin I, ein Protein des Zytoskeletts, welches in antiinflammatorische und apoptotische Prozesse involviert ist, wurde am Anfang der Infektion eine Zunahme der Anzahl der *tags* detektiert. Das einzige Zytokin, das in die Auswertung einbezogen werden konnte, war IL-8, welches 2 hpi eine Zunahme der Anzahl der *tags* zeigte. Allerdings ging der Wert 24 hpi auf den Kontrollwert zurück (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2:** Kategorisierung ausgesuchter *tags* und deren analysierte Anzahl in den vier Bibliotheken.

<b>Gene</b>	<b>Funktion</b>	<b>24 h Kontrolle</b>	<b>2 hpi CSF0382</b>	<b>6 hpi CSF0382</b>	<b>24 hpi CSF0382</b>
$\beta$ -Aktin	<i>housekeeping</i> Gen	50	59	56	54



Gene	Funktion	24 h Kontrolle	2 hpi CSF0382	6 hpi CSF0382	24 hpi CSF0382
<i>NADH-Dehydrogenase</i>	Atmungskette	49	70	73	77
<i>Tubulin-α</i>	Zytoskelett	13	27	26	11
<i>GAPDH</i>	Glykolyse	30	46	48	27
<i>Annexin I</i>	Protein des Zytoskeletts	41	46	57	47
<i>IL-8</i>	Chemokin	68	101	80	68

## 4.2 Quantitative real-time PCR

### 4.2.1 Auswahl der internen Kontrollen

Als interne Kontrolle wurde das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin gewählt. Um die unterschiedliche Genexpression der Proben bestimmen zu können, war die interne Kontrolle Voraussetzung für jeden qRT-PCR-Versuch. Anhand der internen Kontrolle konnten die Ergebnisse der PCR normalisiert und relativ quantifiziert werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Ct-Werte des *housekeeping* Gens in jeder Probe etwa vergleichbare Werte hatten. Die Primersequenz stammt aus der Publikation Duvigneau et al., 2005.

### 4.2.2 Auswertung der *in vitro* Infektion in der Zellkultur

Für die *in vitro* Infektionsversuche wurden zwei porcine permanente Zelllinien und drei verschiedene KSPV-Stämme verwendet. Die porcine Nierenzelllinie PK15(A) und die Hodenzelllinie ST wurden sowohl mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382, dem moderat virulenten Stamm CSF0864 als auch mit dem Impfstamm C infiziert. Anschließend wurden die Zellen 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi lysiert. Nach der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde die mRNA der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in der qRT-PCR analysiert. Die entsprechenden positiven Kontrollen für jedes Zytokin sind in Tabelle 3-5 aufgelistet. Die Auswertung der n-fachen Expression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Die mit dem Impfstamm infizierten Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt der Infektion eine Veränderung in der Zytokinexpression.

In den untersuchten Zelllinien, die mit dem hoch und dem moderat virulenten KSPV-Stamm infiziert wurden, konnte die IL-1 $\beta$  mRNA weder in den nicht-infizierten noch in den infizierten Zellen nachgewiesen werden, wohingegen das IFN- $\beta$  keine Änderung in der Genexpression zeigte. Die mRNA-Level aller anderen getesteten Zytokine, die sowohl in der Nieren- als auch in der Hodenzelllinie mit dem moderat virulenten Stamm analysiert wurden, zeigten kein auffälliges Expressionsmuster (Daten nicht gezeigt).

Bei den PK15(A) Zellen, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert wurden, wurde hingegen eine leichte Veränderungen in der IL-6 und IL-8 Expression beobachtet. Die größte Veränderung bei der IL-6 Expression wurde 24 bzw. 48 hpi nachgewiesen. IL-8 wurde 24 hpi um das 3-fache runterreguliert und erreichte 48 hpi einen 5-fachen Abfall. Im Vergleich dazu wurde bei den ST-Zellen, die mit dem gleichen Stamm infiziert wurden, eine größere Veränderung in der Zytokinexpression festgestellt. Sowohl die IL-6 als auch die IL-8 mRNA wurden 5 hpi um das 5-fache runterreguliert. Im Verlauf des Infektionsversuchs wurde ein Anstieg der Genexpression beobachtet, der 48 hpi ein Maximum erreichte. 72 hpi wurde allerdings erneut eine Runterregulierung sowohl bei der IL-6 als auch bei der IL-8 mRNA beobachtet (Tabelle 4-3). Dagegen zeigte TNF- $\alpha$  bei den PK15(A) Zellen 5 h nach der Infektion einen Abfall des mRNA-Levels um das 50-fache im Vergleich zum nicht behandelten Kontrollwert, wohingegen bei der Hodenzelllinie der Abfall der Genexpression bei 3 lag. In beiden Zelllinien wurde ein Anstieg 24 hpi (PK15(A) Zellen) bzw. 48 hpi (ST-Zellen) beobachtet (Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3:** N-facher Abfall bzw. Anstieg der Genexpression von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  nach Infektion von PK15(A) und ST-Zellen mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382. Bestimmung der Genexpression aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durch Vergleich nicht-infizierter / infizierter Zellen; Werte kleiner 0 = Abfall der Genexpression; Werte größer 0 = Anstieg der Genexpression.

<i>PK15(A) CSF0382</i>	<b>Zeit</b>			
<b>Zytokin</b>	<b>5 hpi</b>	<b>24 hpi</b>	<b>48 hpi</b>	<b>72 hpi</b>
<b>IL-6</b>	0,5 - 0,7	0,6 - 0,9	0,4 - 0,6	1,01 – 1,3
<b>IL-8</b>	0,8 - 1,06	0,3 - 0,5	0,1 - 0,2	1,4 - 1,7
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,02 - 0,05	0,04 -0,06	0,04 - 0,07	0,05 - 0,07

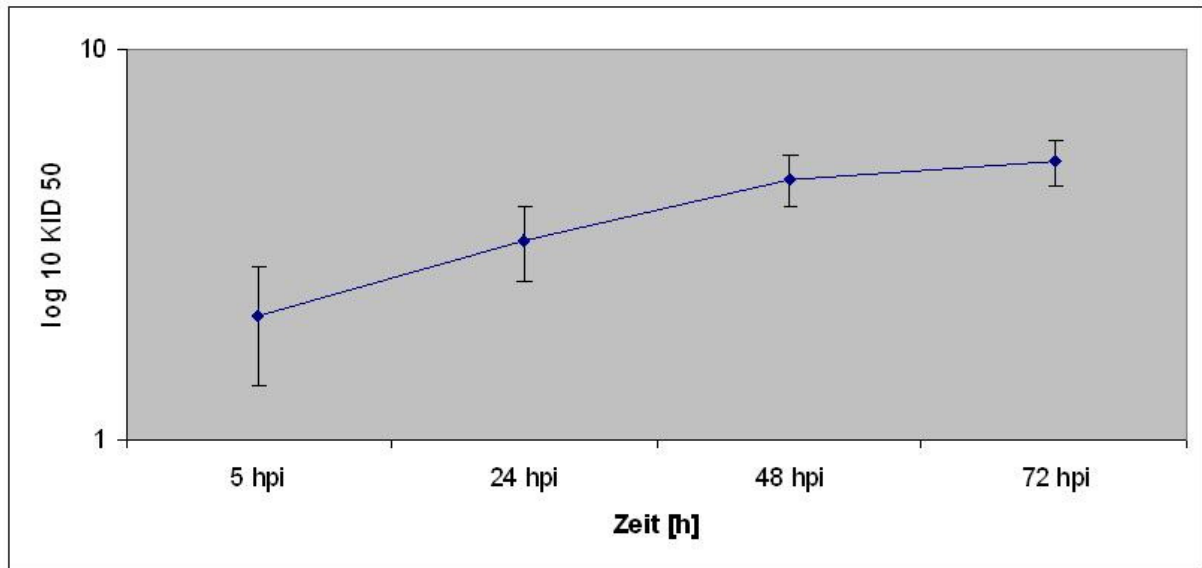
<b>ST-Zellen CSF0382</b>	<b>Zeit</b>			
<b>Zytokin</b>	<b>5 hpi</b>	<b>24 hpi</b>	<b>48 hpi</b>	<b>72 hpi</b>
<b>IL-6</b>	0,2 - 0,4	0,4 - 0,7	3,4 - 4,0	0,8 - 1,1
<b>IL-8</b>	0,2 - 0,6	1,3 - 1,6	3,4 - 3,7	0,3 - 0,4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,3 - 0,6	0,3 - 0,4	0,7 - 1,0	0,2 - 0,3

#### 4.2.3 Auswertung der *in vitro* Infektion in PBMCs

Für die *in vitro* Infektionsversuche wurden PBMCs aus EDTA-Blut klinisch gesunder Schweine unterschiedlicher Altersstufen und Rassen isoliert. Diese wurden in Zellkulturflaschen aufgenommen und über mehrere Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert und 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi lysiert (Lysispuffer aus *RNeasy Mini Kit*, QIAGEN®). Nach der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde in der qRT-PCR die Veränderung der Zytokinexpression untersucht. Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

Untersucht wurden Tiere im Alter von vier und zwölf Wochen als auch im Alter von etwa 1,5 Jahren. Bei den 1,5 Jahre alten Schweinen handelte es sich ausnahmslos um Hybridkreuzungen unbekannter Rassen. Die vier bzw. zwölf Wochen alten Tiere gehörten der Rasse Hampshire bzw. Pietrain an.

Bei jedem Infektionsversuch wurde zu jedem gemessenen Zeitpunkt der Virustiter bestimmt (Abb. 4-1).

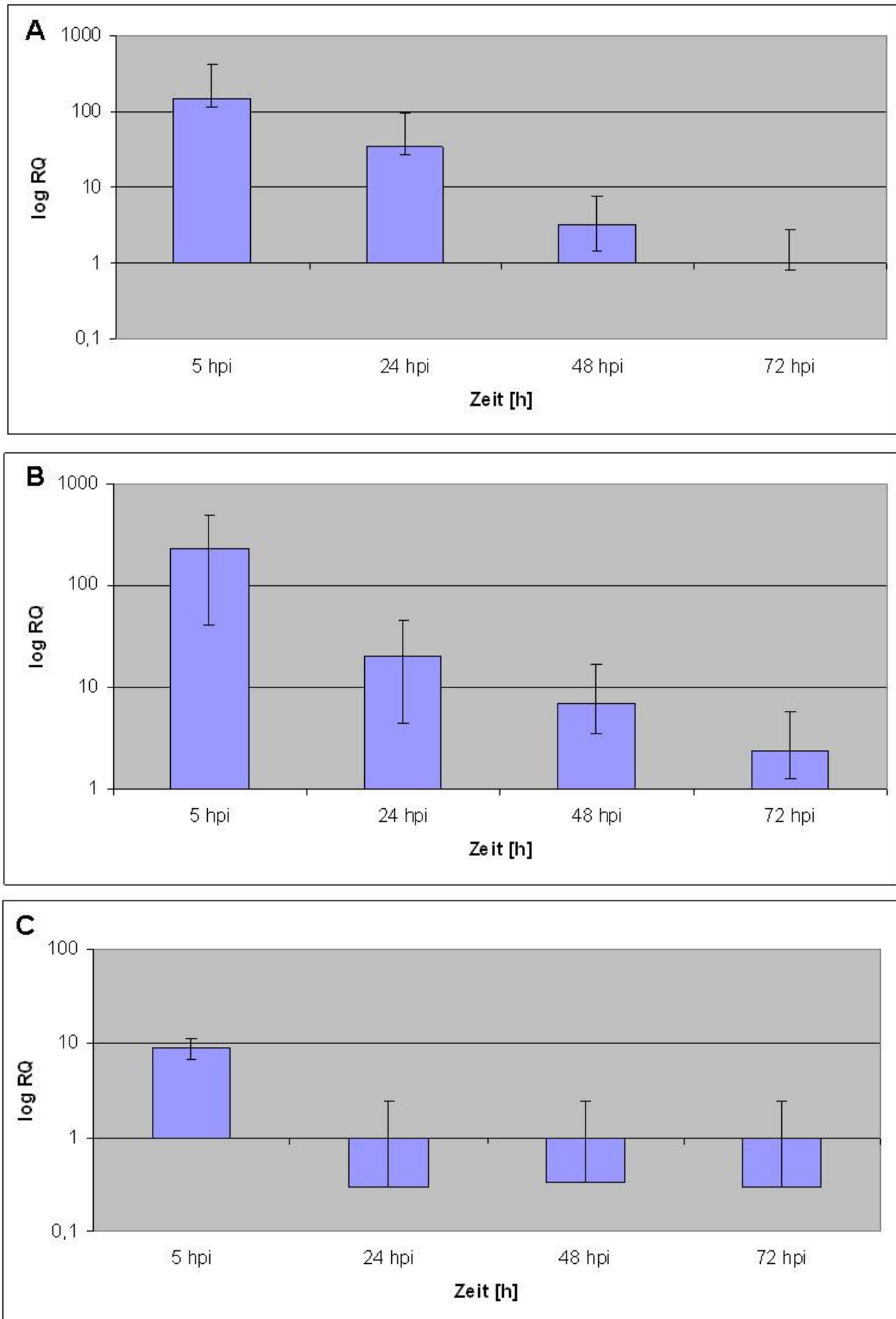


**Abb. 4-1:** Replikation des hoch virulenten KSPV-Stamms CSF0382 auf PBMCs, Rasse Hampshire, Alter vier Wochen. Die Zellkulturüberstände wurden von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen an vier Zeitpunkten (5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi) gesammelt, auf PK15(A) Zellen titriert und mittels PLA ausgewertet.

#### 4.2.3.1 IL-1 $\beta$

Die *in vitro* infizierten PBMCs der jungen Tiere zeigten 5 hpi einen Anstieg in der IL-1 $\beta$  Genexpression um das 150-fache bzw. 230-fache (im Vergleich zum 0-Wert bzw. den nicht infizierten Proben). Im weiteren Verlauf der Infektion wurde ein kontinuierlicher Abfall der Genexpression beobachtet (Abb. 4-2; A und B). In den PBMCs der 1,5 Jahre alten Schweine wurde nur ein leichter Anstieg 5 hpi beobachtet. Im Verlauf der Infektion erfolgte ein Abfall der IL-1 $\beta$  Expression (Abb. 4-2; C).

## Ergebnisse



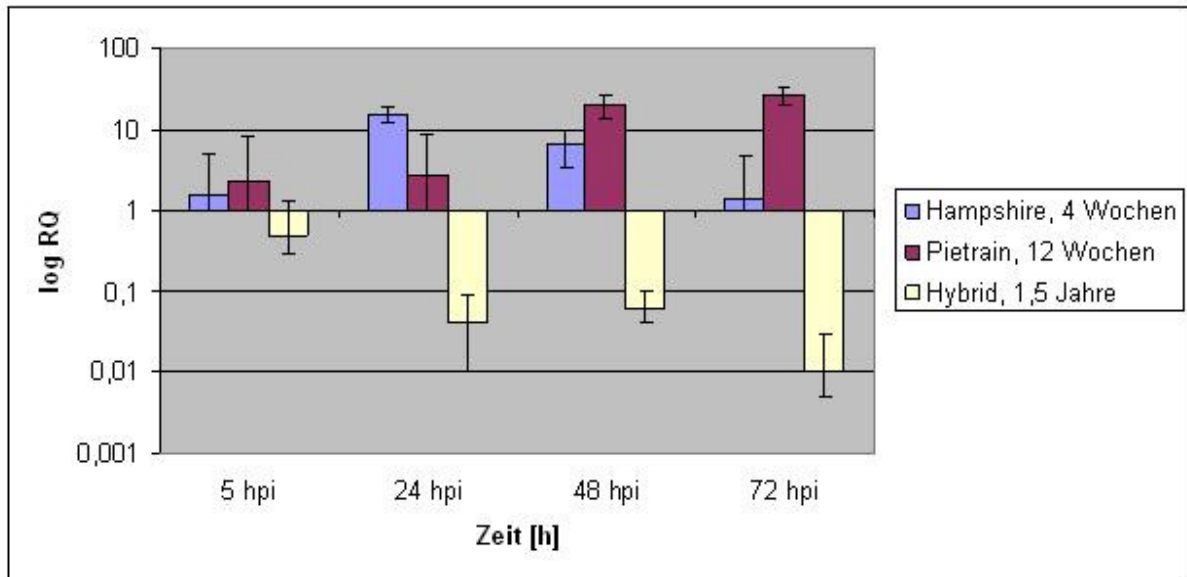
**Abb. 4-2:** Änderungen der IL-1 $\beta$  Genexpression in PBMCs. Isolierung der PBMCs aus EDTA-Blut aus vier Wochen alten Hampshire- (**A**), zwölf Wochen alten Pietrain-

**(B)** bzw. ca. 1,5 Jahren alten Hybridschweinen **(C)**. *In vitro* Infektionsversuch mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382. Lyse der Zellen 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und die relative Quantifizierung (RQ) wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Infektionsversuchen.

### 4.2.3.2 IL-6

Der Vergleich der PCR-Ergebnisse der jungen Tiere (Rasse Hampshire und Pietrain) zeigte im Vergleich zu den nicht-infizierten PBMCs einen Anstieg des IL-6 mRNA-Levels 24 hpi bzw. 48 hpi. Bei den PBMCs der Rasse Hampshire wurde danach jedoch ein Abfall in der Genexpression beobachtet, wohingegen bei den PBMCs der Rasse Pietrain ein 1,3-facher Anstieg zum vorangegangenen Zeitpunkt festgestellt wurde (Abb. 4-3).

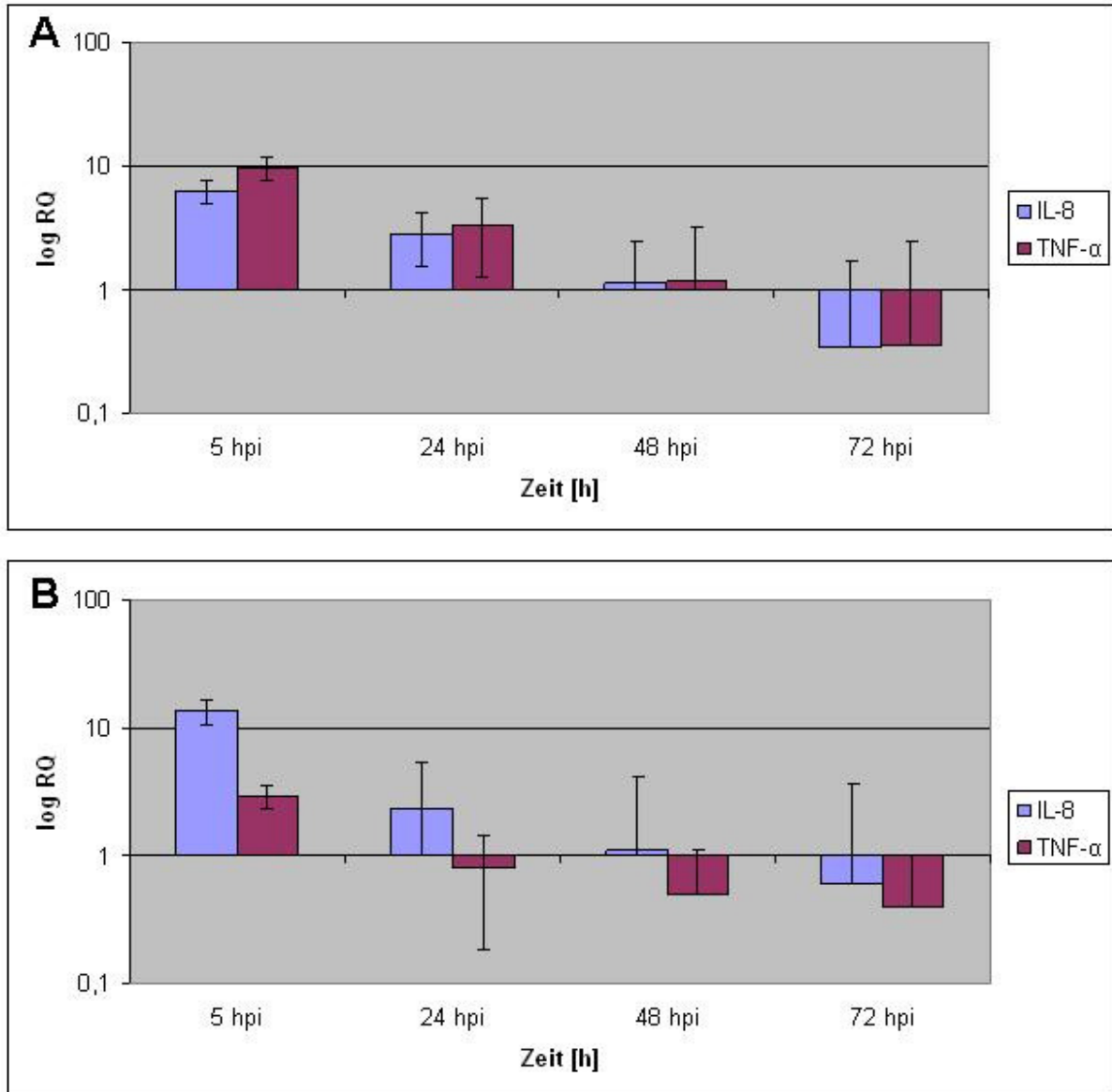
Bei der Gruppe der 1,5 Jahre alten Hybridschweine erfolgte dagegen vom ersten gemessenen Zeitpunkt nach der Infektion bis zum Ende des Versuchs (72 hpi) ein Abfall der Genexpression (Abb. 4-3).



**Abb. 4-3:** Änderungen der IL-6 Genexpression in PBMCs. Isolierung der PBMCs aus EDTA-Blut aus vier Wochen bzw. zwölf Wochen bzw. 1,5 Jahre alten Schweinen. *In vitro* Infektionsversuche mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382. Lyse der Zellen 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und die RQ wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt. Gezeigt wird der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

#### 4.2.3.3 IL-8 und TNF- $\alpha$

Sowohl für IL-8 als auch für TNF- $\alpha$  wurde bei den PBMCs der jungen Tiere unterschiedlicher Rassen eine Änderung der Genexpression 5 hpi beobachtet. Sowohl die PBMCs aus den Hampshire- als auch aus den Pietrainschweinen zeigten einen Anstieg am Anfang der Infektion (für IL-8: 6-fach bzw. 13-fach; für TNF- $\alpha$ : 9-fach bzw. 3-fach im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen), welche bereits 24 hpi abfielen (Abb. 4-4). Die PBMCs, die aus den 1,5 Jahre alten Hybridschweinen stammten, zeigten dagegen keine Veränderung in der Genexpression dieser beiden Zytokine.



**Abb. 4-4:** Änderungen der IL-8 und TNF- $\alpha$  Expression in PBMCs. Isolierung der PBMCs aus EDTA-Blut aus vier Wochen alten Hampshire- **(A)** bzw. zwölf Wochen alten Pietrain-Schweinen **(B)**. *In vitro* Infektionsversuche mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382. Lyse der Zellen 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und die RQ wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Infektionsversuchen.

#### 4.2.3.4 IFN- $\beta$

Weder in den PBMCs junger als auch älterer Schweine unterschiedlicher Rasse wurde eine Veränderung der IFN- $\beta$  Expression im Vergleich zu den nicht-infizierten PBMCs gezeigt.



#### 4.2.4 Auswertung des Tierversuchs V2009/3

Für diesen Versuch wurden drei verschiedene KSPV-Stämme aus der Virusbank des EURLs ausgesucht, mit denen die Tiere infiziert wurden. Je drei Schweine wurden mit dem hoch virulenten Stamm CSF0382 (Nr. 228-230) und dem moderat virulenten Stamm CSF0864 (232-234; 241-243) und vier Tiere mit dem Impfstamm C (224-227) infiziert. Vor der Infektion wurden die Tiere per Multiplex-PCR auf andere porcine Erreger getestet (Harder & Huebert, unveröffentlicht). Die PCR ergab, dass das Tier mit der Nummer 224 aus der C-Stamm Gruppe und das Tier mit der Nummer 228, welches mit dem hoch virulenten Stamm infiziert wurde, PCV-2 (Porzines Circovirus 2) positiv waren.

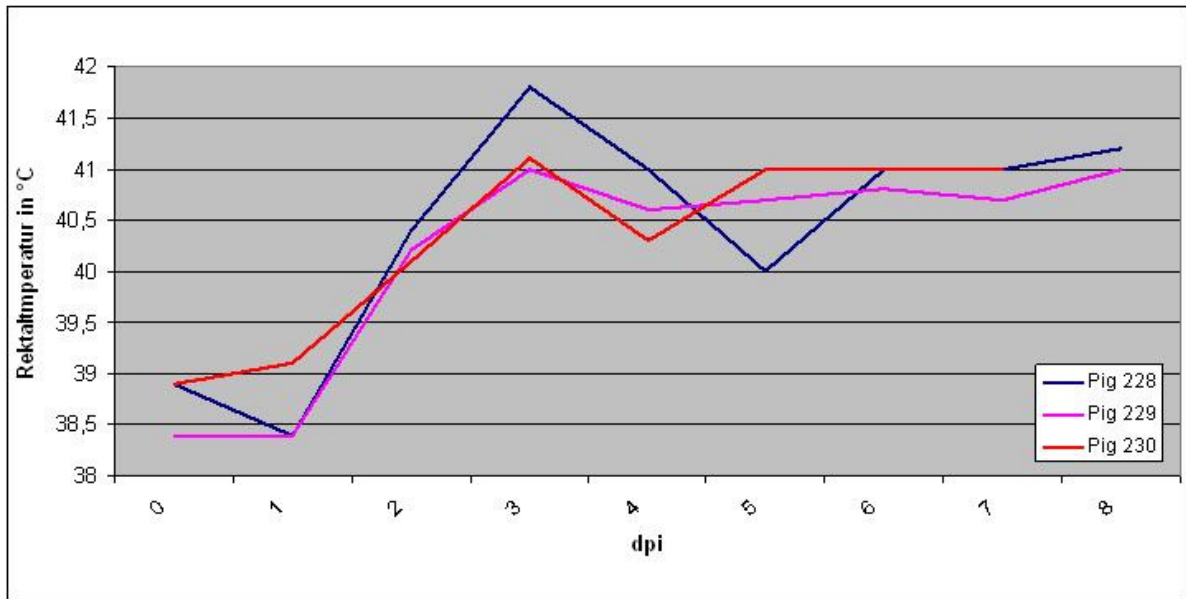
Für die Genexpressionsanalyse wurden Blutproben von 5 h, 1 d, 2 d und 3 d nach der Infektion aus der *Vena jugularis* entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurden PBMCs isoliert, die für die Genexpressionsanalyse der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  mithilfe der qRT-PCR verwendet wurden. Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

##### 4.2.4.1 Verlauf der Körpertemperatur

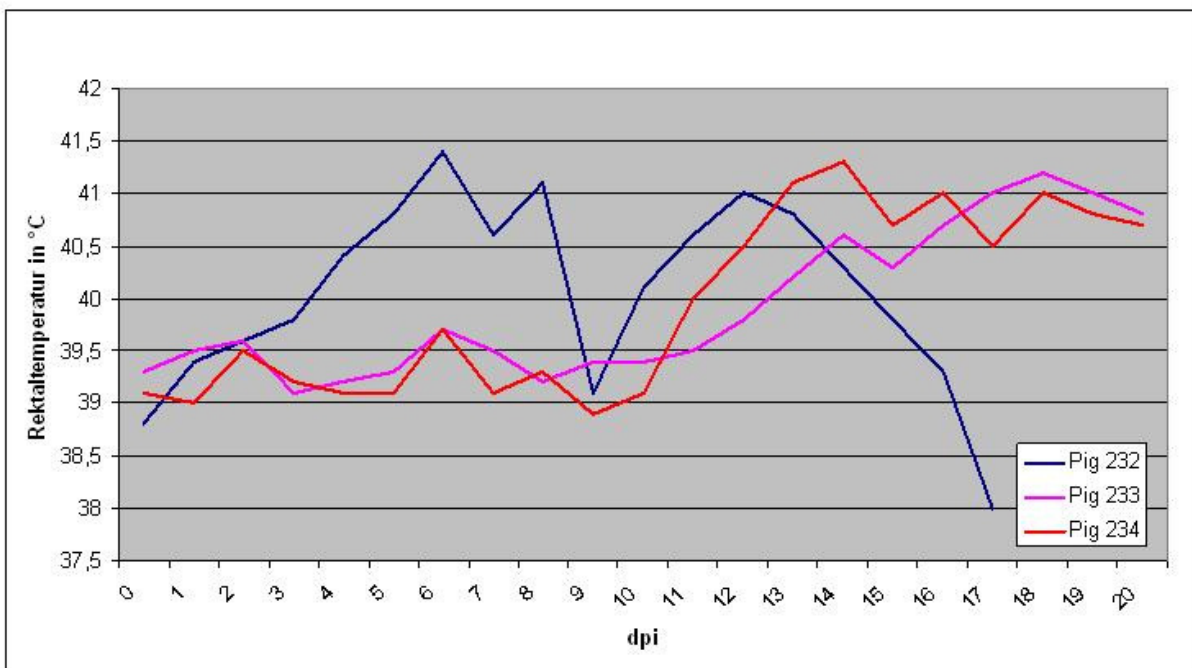
Die rektale Körpertemperatur der Schweine wurde jeden Tag bei jedem Tier mit einem digitalen Fieberthermometer erfasst. Nach der Infektion mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm entwickelten die Tiere schon nach zwei Tagen eine Körpertemperatur von über 40 °C (Abb. 4-5), während die Tiere, die mit dem moderat virulenten Stamm CSF0864 infiziert waren, diese Temperatur erst nach vier oder fünf bzw. nach über elf Tagen erreichten.

Bei dem hoch virulenten Stamm stieg die Temperatur auf ein Maximum von 41,8 °C (Nr. 228) (Abb. 4-5). Dagegen blieb die Körpertemperatur bei den Tieren, die mit dem moderat virulenten Stamm infiziert waren, eher konstant, bis sie nach etwa elf Tagen (bei dem Tier Nr. 232 schon nach vier Tagen) auf über 40 °C anstieg (Abb. 4-6).

Die Tiere, die mit dem C-Stamm infiziert wurden, blieben während des ganzen Versuchsverlaufs fieberfrei.



**Abb. 4-5:** Fieberkurve der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren.



**Abb. 4-6:** Fieberkurve der Tiere, die mit dem moderat virulenten KSPV-Stamm CSF0864 infiziert waren.

#### 4.2.4.2 Erfassung der pathologisch-anatomischen Befunde

Die Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren, wurden zwischen dem siebten und dem neunten Tag euthanasiert. Sie zeigten vergrößerte Lymphknoten und zum Teil eine nekrotisierende Tonsillitis (Nr. 228 und 230). Außerdem wurden Petechien in der Niere festgestellt (Nr. 228 und 230).

Die Schweine der Gruppe, die mit dem moderat virulenten KSPV-Stamm infiziert waren, wurden zwischen dem 18. und dem 21. Tag euthanasiert. Alle wiesen vergrößerte, zum großen Teil hämorrhagisch-infarzierte Lymphknoten auf (232-234). Hinzu kamen bei einem Tier petechiale Blutungen in den Tonsillen, in der Niere (Abb. 4-7) und im Magen (Nr. 233).



**Abb. 4-7:** Petechiale Blutungen in der Niere (Tier Nr. 233).

#### **4.2.4.3 Untersuchung der Zytokinexpression**

Isolierte PBMCs der infizierten Tiere wurden in der qRT-PCR auf eine Änderung der Zytokinexpression untersucht.

##### **4.2.4.3.1 IL-1 $\beta$**

Die PBMCs, die aus den mit dem avirulenten KSPV-Isolat infizierten Tieren stammten, wiesen keinerlei Veränderungen in der IL-1 $\beta$  Expression im Vergleich zu dem Kontrollwert auf. Der moderat und der hoch virulente KSPV-Stamm bewirkte nur bei je einem Schwein einen leichten Anstieg um das 3-fache des IL-1 $\beta$  mRNA-Levels. Dieser Anstieg wurde nur 1 dpi (moderat virulent) bzw. 2 dpi (hoch virulent) festgestellt.

##### **4.2.4.3.2 IL-6**

Bei den PBMCs der mit dem C-Stamm infizierten Tiere wurde keine Änderung in der IL-6 Genexpression beobachtet.

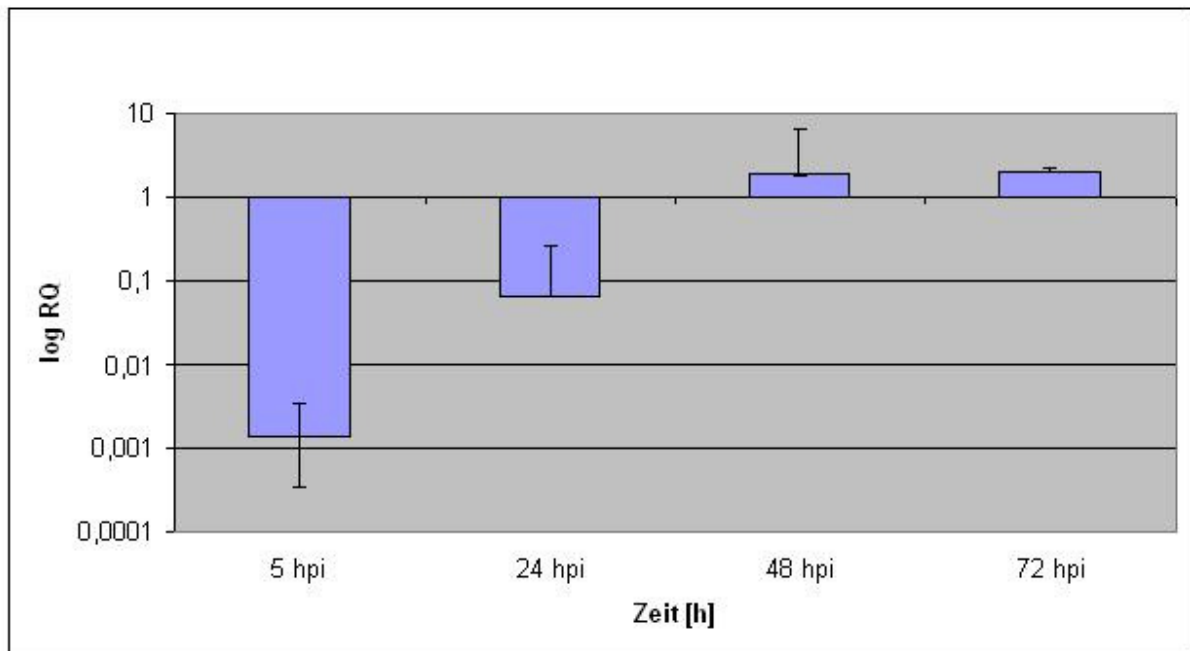
Die aus Tieren stammenden PBMCs, die mit dem hoch virulenten Stamm infiziert wurden, zeigte erneut nur ein Schwein (Nr. 229) schon 5 hpi einen 4-fachen Anstieg im Vergleich zum Kontrollwert. Dieser Wert blieb bis zum Ende der Versuchsreihe konstant.

Bei dem moderat virulenten Stamm wies nur ein Tier (Nr. 232) einen 8-fachen Anstieg des IL-6 mRNA-Levels 5 hpi auf. In den anderen Schweinen wurden keine Veränderungen der Zytokinexpression beobachtet.

#### 4.2.4.3.3 IL-8 und TNF- $\alpha$

Es wurde keine Veränderung in der IL-8 und TNF- $\alpha$  Expression bei den Tieren, die mit dem C-Stamm infiziert waren, beobachtet. In den PBMCs des Schweins (Nr. 232), das mit dem moderat virulenten Stamm infiziert wurde, wurde bereits 5 hpi ein 30-facher Anstieg sowohl bei der IL-8 als auch bei der TNF- $\alpha$  Genexpression beobachtet.

Die PBMCs der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert wurden, wiesen nur 5 hpi einen Abfall der IL-8 Genexpression um das 1000-fache auf, die im Verlauf des Versuchs wieder anstieg (Abb. 4-8).



**Abb. 4-8:** Änderungen der IL-8 Expression in PBMCs, die aus ca. 10 Wochen alten Tieren stammten. *In vivo* Infektion mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 und Isolierung der PBMCs aus EDTA-Blut 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und die relative Quantifizierung (RQ) wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt. Bei den

dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Infektiosversuchen.

Die TNF- $\alpha$  Expression war bei den Tieren, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert waren, leicht runterreguliert (2-fach), und änderte sich im Verlauf des Versuchs nicht.

#### **4.2.4.3.4 IFN- $\beta$**

Bei der IFN- $\beta$  Expression wurde weder bei den PBMCs der Tiere, die mit dem C-Stamm, noch bei den PBMCs der Tiere, die mit dem moderat und hoch virulenten KSV-Stamm infiziert wurden, eine Änderung im Vergleich zum Kontrollwert beobachtet.

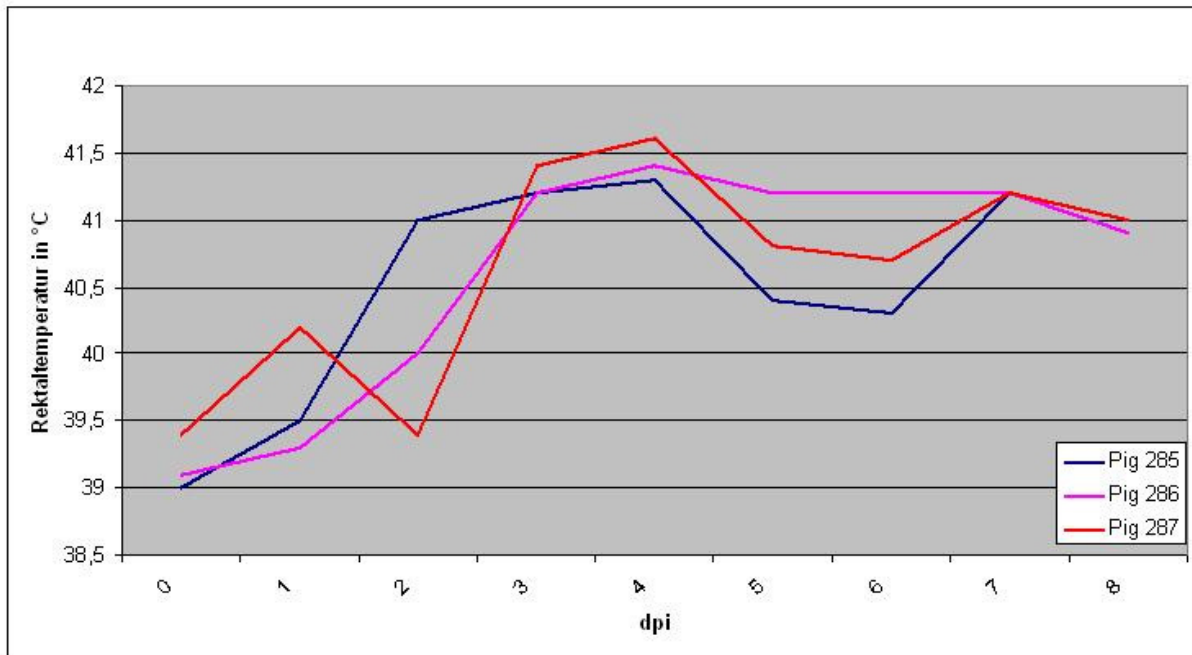
#### **4.2.5 Auswertung des Tierversuchs V2009/2**

Bei diesem Versuch wurden drei Schweine (Nr. 285-287) im Alter von ca. 18 Wochen mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert. Vor der Infektion wurden die Tiere per Multiplex-PCR auf andere porcine Erreger getestet (Harder & Huerbert, unveröffentlicht). Die PCR ergab, dass die Tiere 285 und 286 PCV-2 positiv waren.

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Blutproben von 5 hpi, 1 dpi, 2 dpi und 3 dpi aus der *Vena jugularis* entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurden PBMCs isoliert, die für die Genexpressionsanalyse der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  mithilfe der qRT-PCR verwendet wurden. Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

##### **4.2.5.1 Verlauf der Körpertemperatur**

Die mit einem hoch virulenten KSPV-Stamm infizierten Schweine hatten schon nach zwei bzw. nach drei Tagen eine Körpertemperatur über 40 °C. Bis zur Euthanasie der Tiere blieb diese auch bei über 40 bzw. 41 °C (Abb. 4-9).



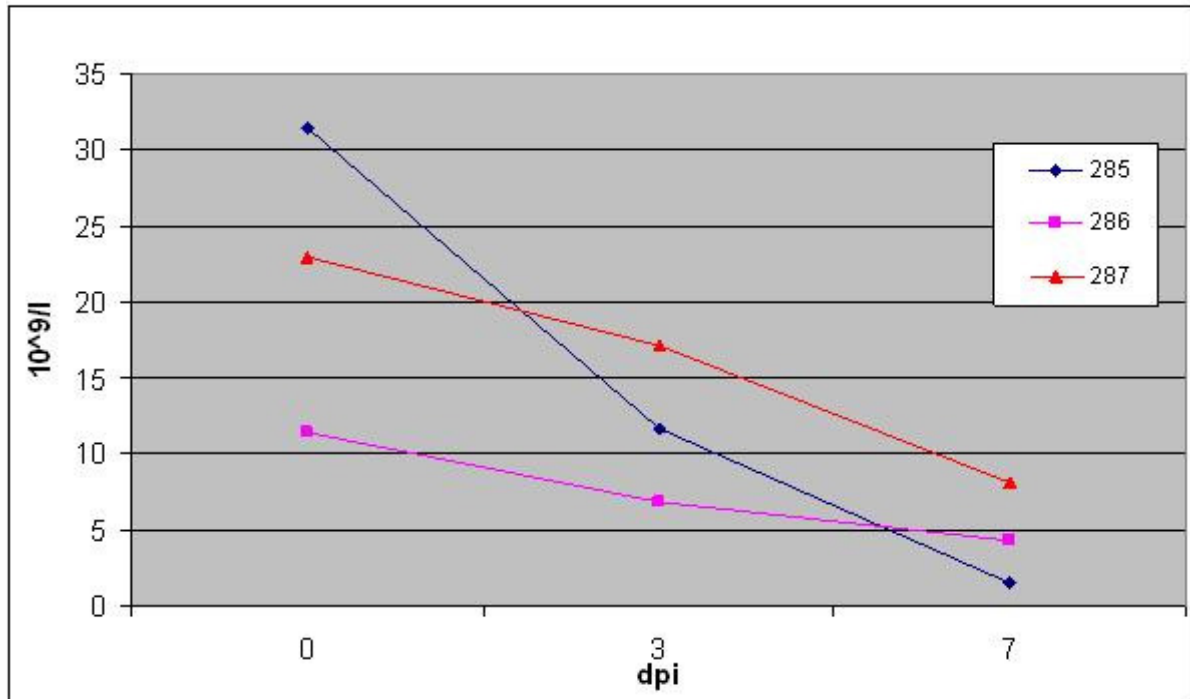
**Abb. 4-9:** Fieberkurve der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren.

#### 4.2.5.2 Erfassung der pathologisch-anatomischen Befunde

Alle drei Tiere hatten vergrößerte und hämorrhagische Lymphknoten sowie Petechien in der Niere und Blase. Hinzu kam, dass ein Tier (Nr. 287) petechiale Blutungen in der Trachea und der Epiglottis sowie in der Leber und im Dünn- und Dickdarm aufwies.

#### 4.2.5.3 Erfassung der Leukozytenzahl des hoch virulenten KSPV-Stamms

Aus den EDTA-Blutproben der infizierten Tiere wurden die Leukozytenzahlen mithilfe eines Leukozytenzählers (Abacus Vet Junior, Diatron) bestimmt. Die Leukozytenzahlen wurden an drei Tagen ermittelt (vor der Infektion, 3 dpi und 7 dpi). Alle Tiere zeigten eine Depletion bereits drei Tage nach der Infektion (Abb. 4-10).



**Abb. 4-10:** Leukozytenzahlen der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren.

#### 4.2.5.4 Untersuchung der Zytokinexpression

Isolierte PBMCs der infizierten Tiere wurden in der qRT-PCR im Hinblick auf eine Änderung der Zytokinexpression untersucht.

##### 4.2.5.4.1 IL-1 $\beta$

Die Auswertungen der PCR-Ergebnisse ergaben keine Veränderungen in der IL-1 $\beta$  Expression. In den PBMCs der infizierten Tiere wurde eine 2-fache Runterregulierung 5 hpi beobachtet, was allerdings bei den nächsten gemessenen Zeitpunkten nicht mehr zu sehen war.

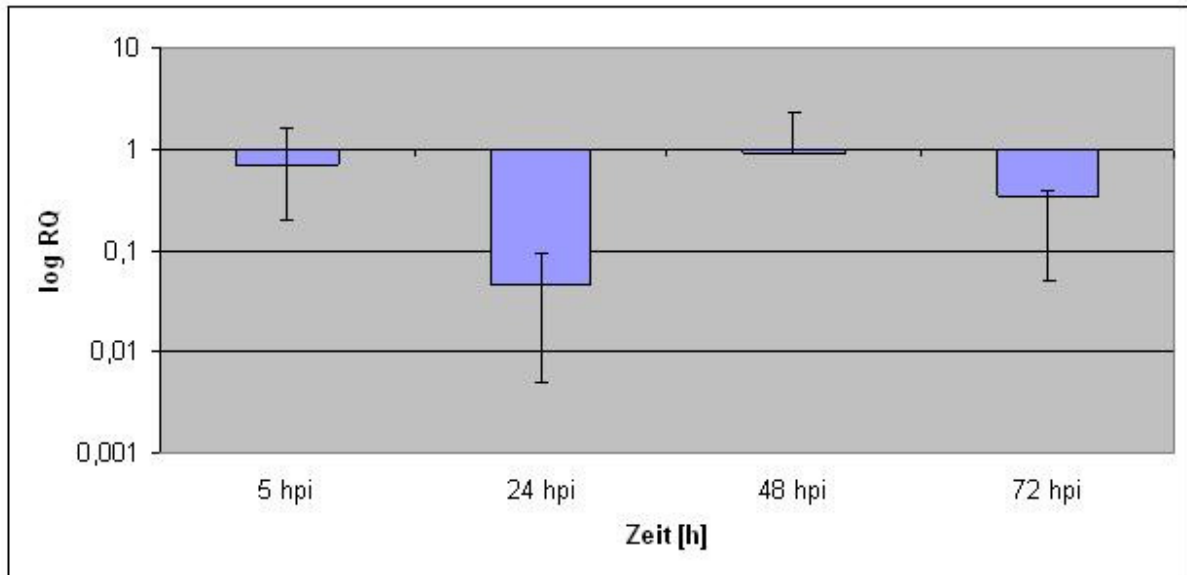
##### 4.2.5.4.2 IL-6

Die Analysen der IL-6 Expression bei den ca. 18 Wochen alten Schweinen, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert waren, zeigten einen etwa 3-fachen Anstieg des mRNA-Levels 5 hpi. Dieser konnte zu den weiteren Zeitpunkten jedoch nicht mehr beobachtet werden.

##### 4.2.5.4.3 IL-8

Bei der Auswertung der IL-8 Expression wurde in den PBMCs zweier infizierter Tiere (Nr. 285 und 287) eine leichte Runterregulierung (1,4-fach) 5 hpi gezeigt, 24 hpi und

72 hpi wurde sogar eine 25-fache Reduktion nachgewiesen. Allerdings wurde 48 hpi eine Hochregulierung des IL-8 Gens beobachtet (Abb. 4-11). In den PBMCs des dritten Tieres (Nr. 286) konnte 5 hpi und 24 hpi keine IL-8 Genexpression gezeigt werden, allerdings wurde 2 dpi ein 12-facher Anstieg festgestellt.



**Abb. 4-11:** Änderungen der IL-8 Expression in PBMCs, die aus zwei ca. 18 Wochen alten Tieren stammten. *In vivo* Infektion mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 und Isolierung der PBMCs aus EDTA-Blut 5 hpi, 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und die RQ wurde mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt. Das dritte Tier wurde auf Grund der nicht detektierbaren Expression 5 hpi und 24 hpi in dieser Grafik nicht berücksichtigt.

#### 4.2.5.4.4 TNF- $\alpha$ und IFN- $\beta$

Es konnten bei den ca. 18 Wochen alten Tieren, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren, zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Änderungen der TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  Expression beobachtet werden.



## 5 Diskussion

Die KSP gehört weltweit zu den wichtigsten viralen Erkrankungen der Haus- und Wildschweine und besitzt eine hohe wirtschaftliche Bedeutung (Edwards et al., 2000). Eine Infektion mit dem KSPV kann in ihrer Symptomatik sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Vor allem eine Infektion mit hoch virulenten KSPV-Stämmen führt häufig zu einer akut-letalen Verlaufsform, die häufig durch das Auftreten von hämorrhagischen Symptomen gekennzeichnet ist und dem Bild eines klassischen viralen hämorrhagischen Fiebers entspricht (Gomez-Villamandos et al., 2003b). Wie bei anderen hämorrhagischen Fiebern sind bisher weder die Mechanismen der Pathogenese, noch die damit einhergehende Leukopenie, Thrombozytopenie, erhöhte vaskuläre Permeabilität, Petechien und Hämorrhagien aufgeklärt. Lange Zeit ging man davon aus, dass die klinischen Symptome der akuten KSP aufgrund einer disseminierten intravasalen Koagulopathie auftreten (Heene et al., 1971; Hoffmann et al., 1971a). Obwohl es im Verlauf der KSPV-Infektion zu einer Aktivierung der Gerinnung und zu einem Verbrauch der Faktoren des extrinsischen Pfades kommt, scheinen diese Vorgänge nicht im Zusammenhang mit dem Auftreten der Hämorrhagien bzw. der Thrombozytopenie, die bereits vor den ersten Dekompensationsanzeichen auftreten, zu stehen. Die mangelnde Beeinflussbarkeit des Geschehens durch die Verabreichung eines Thrombininhibitors unterstützt die Annahme, dass das plasmatische Gerinnungssystem nicht die Hauptrolle in der Pathogenese der KSP spielt (Blome, 2006). Mittlerweile nimmt man an, dass verschiedene Zytokine für die Symptomatik verantwortlich sind bzw. die Symptome verstärken (Sánchez-Cordón et al., 2002, 2005a, b; Choi et al., 2004; Núñez et al., 2005). Die Überaktivierung der betroffenen Gene führt zu einer übermäßigen Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , die in verschiedenen Zellpopulationen Apoptose auslösen können, das Gefäßsystem verändern, und auch bei viralen Infektionen aktiviert werden (Sánchez-Cordón et al., 2002; Bray, 2005; Borca et al., 2008).

Bislang veröffentlichte Untersuchungen zur Genexpressionsanalyse bei der KSP basieren auf qRT-PCR, Microarrays (Borca et al., 2008; Shi et al., 2009; Li et al., 2010; Gladue et al., 2010), *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Graham et al., 2010), Immunhistochemie (Núñez et al., 2005) und Proteomikanalysen (Sun et al., 2008). Neben PK15(A) Zellen für die Proteomikanalysen kamen sowohl *in vivo*

als auch *in vitro* infizierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs), Endothelzellen und dendritische Zellen zum Einsatz (Sánchez-Cordón et al., 2002; Bensaude et al., 2004; Jamin et al., 2008; Borca et al., 2008; Shi et al., 2009).

Der Einfluss der Virulenz verschiedener KSPV-Isolate wurde bislang in den Untersuchungen vernachlässigt. Lediglich Durand et al. (2009) untersuchten in einer Microarray-Analyse den Effekt unterschiedlich virulenter KSPV-Stämme auf die Aktivierung antiviraler und apoptotischer Gene nach RNA-Isolierung aus Lymphknoten, der Milz und den Tonsillen. Die einzige signifikante Überexpression zeigte IFN- $\gamma$  nach Infektion mit einem schwach virulenten KSPV-Stamm, wobei der früheste berücksichtigte Analysezeitpunkt 3 dpi war.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit Änderungen der Genexpressionen der oben genannten Zytokine auch im Hinblick auf verschiedene KSPV-Stämme analysiert. Deren Effekt auf die Genexpression sollte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Infektionsversuchen nachgewiesen werden. Hierfür wurden ein hoch, ein moderat und ein avirulenter KSPV-Stamm ausgewählt.

### **5.1 Serielle Analyse der Genexpression**

Um erste Hinweise auf induzierte bzw. inhibierte Gene in KSPV-infizierten Zellen zu erhalten, wurden sogenannte SAGE-Bibliotheken von nicht-infizierten und infizierten PK15(A) Zellen hergestellt. SAGE ist eine Methode, die es erlaubt, Expressionslevel von Genen im Vergleich nicht-infizierter / infizierter Zellen auf der mRNA Ebene zu untersuchen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass auch Expressionsprofile unbekannter Gene untersucht werden können (Velculescu et al., 1995).

Da viele Zytokine nur eine geringe Halbwertszeit aufweisen (Ibelgauft, 2003), wurde vor allem der Anfang der KSPV-Infektion für die Untersuchung berücksichtigt.

Für die Infektionsversuche wurde ein hoch virulentes KSPV-Isolat ausgewählt, da davon auszugehen ist, dass nach Infektion die meisten pathogenetischen Veränderungen zu beobachten sind. Insgesamt wurden vier Bibliotheken erstellt, wobei jede aus ca. 40000 *tags* bestand, die anhand der 14 Basen in zelluläre Funktionen kategorisiert werden konnten. Die Analyse der *tags* zeigte, dass das Gen  $\beta$ -Aktin in allen Bibliotheken ähnliche Expressionswerte hatte. Aus diesem Grund diente es für die Normalisierung der Daten als *housekeeping* Gen in den folgenden qRT-PCR-Versuchen.

Das einzige Zytokin, das in den SAGE-Bibliotheken von nicht-infizierten und infizierten Zellen Unterschiede zeigte, war IL-8. Am Anfang der Infektion konnte ein Anstieg der Anzahl der IL-8 *tags* mit anschließendem Abfall auf den Wert der Kontrollbibliothek beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurden in einer Proteomikstudie mit PK15(A) Zellen keine Änderung der Zytokine in nicht-infizierten und infizierten Zellen nachgewiesen (Sun et al., 2008).

Weitere *tags*, die sich in den Bibliotheken nicht-infizierter und infizierter Zellen unterschieden, wurden der Atmungskette (NADH Dehydrogenase), der Bildung des Zytoskeletts (Tubulin- $\alpha$ ), der Glykolyse, dem oxidativen Stress, apoptotischen Prozessen oder der Regulation der Transkription zugeordnet. Ähnliche Ergebnisse wurden mit nicht-infizierten und infizierten PK15(A) Zellen in Proteomikanalysen gefunden (Sun et al., 2008).

Sowohl die Analyse der SAGE-Daten als auch das Ergebnis der Proteomikstudie von Sun et al. (2008) deuten auf einen Abfall der *GAPDH*-Expression. Auch die Gene, die für Hitzeschockproteine kodieren, waren runterreguliert. Hitzeschockproteine können Apoptose verursachen, wenn ein inkorrektter Reparaturmechanismus in der Wirtszelle vorliegt (Javid et al., 2007).

In anderen SAGE-Studien, die mit dem eng verwandten BVDV durchgeführt wurden, wurde ebenfalls eine epitheliale Zelllinie für die Erstellung der SAGE-Bibliotheken verwendet. In diesem Fall wurden allerdings keine *tags* für Zytokine oder andere Mediatoren des Immunsystems gefunden (Neill & Ridpath, 2003a, b). Dieses deutet darauf hin, dass für die Analyse der Zytokinexpressionsprofile möglicherweise die Verwendung einer permanenten Zelllinie zu artifiziell ist. Wie andere Studien zu KSP zeigen, scheinen Zellen des Immunsystems wie PBMCs und vor allem Zielzellen des Virus geeigneter zu sein (Summerfield et al., 1998; Knoetig et al., 1999; Borca et al., 2008; Li et al., 2010). Inwiefern die verwendete Zelllinie und weitere KSPV-Isolate unterschiedlicher Virulenz einen Einfluss auf die Zytokinexpression haben, wurde im Folgenden in der qRT-PCR untersucht.

### **5.2 Quantitative real-time PCR**

Die Analyse der Genexpression in den SAGE-Bibliotheken lieferte einen ersten Überblick über hoch- bzw. runterregulierte Gene nach einer KSPV-Infektion. Da die SAGE-Daten bis auf IL-8 keine weiteren Hinweise auf die Induktion bzw. Inhibition von Zytokinen oder anderen Faktoren gaben, wurden für die Genexpressionsanalyse

in der qRT-PCR die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie in verschiedenen Zellpopulationen Apoptose auslösen, zu einer vaskulären Fehlfunktion beitragen können und bei viralen Infektionen als erstes aktiviert werden (Heinrich et al., 2003; Hehlgans & Pfeffer, 2005; Bray, 2005; Dinarello, 2005). Um festzustellen, ob die Genexpression tatsächlich vom verwendeten Zellsystem abhängt, wurden für die Analysen PK15(A) und ST-Zellen sowie PBMCs *in vitro* infiziert und mit dem Zytokin-Expressionslevel nicht-infizierter Zellen verglichen. Außerdem wurden PBMCs von *in vivo* infizierten Schweinen verschiedener Altersstufen verwendet, wobei ebenfalls ein Vergleich der Zytokin mRNA-Level nicht-infizierter und infizierter Tiere stattfand.

### 5.2.1 Zytokinexpressionsanalyse in der Zellkultur

Weder die PK15(A) noch die ST-Zellen zeigten nach Infektion mit dem avirulenten Vakzinestamm C eine Veränderung in der Expression. Auch der moderat virulente KSPV-Stamm bewirkte keine Veränderung.

Da IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet wird, wurde es erwartungsgemäß weder in den nicht-infizierten noch in den infizierten PK15(A) und ST-Zellen nachgewiesen (Dinarello, 2005). Ein leichter Abfall der IL-6 und IL-8 Expression wurde bei PK15(A) Zellen, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm infiziert waren, festgestellt. Auffallend war der 50-fache Abfall des TNF- $\alpha$  mRNA-Levels 5 hpi in PK15(A) Zellen. Damit konnte zum ersten Mal der Effekt unterschiedlich virulenter KSPV-Stämme *in vitro* auf Genomebene gezeigt werden. Nennenswerte Effekte wurden nur nach Infektion mit dem hoch virulenten Stamm beobachtet.

### 5.2.2 Zytokinexpressionsanalyse bei PBMCs

Da in der Zellkultur der moderat und der avirulente KSPV-Stamm keinen Einfluss auf die Zytokin-Genexpression hatten, wurde für die *in vitro* Infektionsversuche der PBMCs nur der hoch virulente KSPV-Stamm ausgewählt. Die PBMCs stammten von Schweinen von drei verschiedenen Rassen unterschiedlicher Altersstufen.

Im Vergleich zu den Ergebnissen in der Zellkultur zeigte die IL-1 $\beta$  mRNA in den PBMCs einen deutlichen Anstieg. Dabei wurde deutlich, dass vor allem bei Tieren der Altersgruppe 1 (vier und zwölf Wochen alt) bereits 5 hpi die Änderung mit 150- bzw. 230-fach höher ausfiel als zum gleichen Zeitpunkt bei der Altersgruppe 2 (1,5 Jahre alt).

In den PBMCs der Schweine der Altersgruppe 1 wurde ein leichter IL-6 Anstieg 5 hpi beobachtet, welcher im Laufe der Infektion anhielt. Dagegen wurde in der Altersgruppe 2 ein Abfall der IL-6 Expression beobachtet. Ein Anstieg des TNF- $\alpha$  mRNA-Levels wurde nur in der Altersgruppe 1 bereits am Anfang der Infektion nachgewiesen. Im Verlauf der Infektion fiel die TNF- $\alpha$  Expression. Die Schweine der Altersgruppe 2 zeigten keine Veränderung im gesamten Versuch. Bei einem Vergleich nicht-infizierter und infizierter PBMCs wurde in keiner Altersgruppe zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine Änderung der IFN- $\beta$  Expression beobachtet.

Erhöhte Genexpression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , die in infizierten PBMCs, aber auch in Endothelzellen (Bensaude et al., 2004) festgestellt wurden, könnten zu der vaskulären Fehlfunktion beitragen, die in *in vivo* Studien beobachtet wurde. Vaskuläre Fehlfunktionen resultieren in *plasma leakage* und einer gestörten Blutgerinnung, wie es z. B. bei Dengue-Fieber gezeigt wurde (Bosch et al., 2002). Sowohl IL-1 $\beta$  als auch IL-6 sind dominierend bei der Induktion der vaskulären Permeabilität und pathologischer Veränderungen wie Fieber, Blutgerinnungsdefekten und Hämorrhagien (Bray, 2005).

Neben IL-1 $\beta$  kann IL-6 das Chemokin IL-8 in Endothelzellen aktivieren, welches wiederum für die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und für die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten verantwortlich ist (Gabay, 2006). Vor allem aber ist IL-8 für die Zerstörung der *tight junctions* und die Reorganisation des Zytoskeletts verantwortlich, was ebenfalls in erhöhter vaskulärer Permeabilität resultiert (Talavera et al., 2004).

Die ausbleibende IFN- $\beta$  Induktion in KSPV-infizierten Zellen wurde mit dem Verlust des *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF 3) in Verbindung gebracht, welcher durch das N<sup>pro</sup> Protein vermittelt werden soll (La Rocca et al., 2005; Bauhofer et al., 2007). Das lässt die Vermutung zu, dass das IFN- $\beta$  nach einer KSPV-Infektion nur von bestimmten Zellen produziert werden kann oder aber sogar von der Virulenz des KSPV-Isolats abhängig ist.

### **5.2.3 Zytokinexpressionsanalyse *in vivo***

#### **5.2.3.1 Einfluss verschiedener KSPV-Isolate auf die Zytokinexpression junger Schweine**

Die Infektion mit dem avirulenten KSPV-Stamm rief bei den Tieren keine klinischen Symptome hervor. Die aus den infizierten Tieren isolierten und untersuchten PBMCs zeigten im Hinblick auf die Zytokinexpression keine signifikanten Veränderungen. In

früheren Studien konnte nur IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Suradhat et al., 2001), was zeigt, dass der C-Stamm keine signifikante Zytokinantwort auslöst oder auslösen kann. Nach Infektion mit dem moderat virulenten KSPV-Stamm konnten Veränderungen in der Zytokinexpression zumindest bei einem Tier in Form eines 30-fachen Anstiegs von TNF- $\alpha$  und IL-8 5 hpi festgestellt werden. Die anderen beiden Schweine zeigten allerdings keine Veränderung der Zytokinexpression, eine Bestätigung früherer Untersuchungen, dass nicht alle Tiere gleicher Rasse und gleicher Altersstufe in gleichem Maße auf eine KSPV-Infektion reagieren (Dahle & Liess, 1992; Depner et al., 1996; Moennig et al., 2003; Floegel-Niesmann et al., 2003).

In dem vorliegenden Tierversuch der Altersgruppe 1 (ca. 10 Wochen alt) spielte IL-8 eine besondere Rolle. Es war das einzige Zytokin, welches im Vergleich zum Kontrollwert bei allen jungen Tieren einen 1000-fachen Abfall der Genexpression aufwies. Diese Tiere entwickelten am Anfang der Infektion hohes Fieber, eine früh einsetzende Leukopenie und hämorrhagische Symptome. Diese Beobachtung lässt sich mit Studien vergleichen, in denen u. a. die Rolle des IL-8 in der Pathogenese des Lassa-Fiebers, ebenfalls ein hämorrhagisches Fieber, das sowohl milde als auch akut-letale Verlaufsformen bei Menschen aufweist, untersucht wurde (Lukashevich et al., 1999; Mahanty et al., 2001). Eine Infektion mit Lassa-Viren kann vor allem bei Kindern unter 12 Jahren akute Verlaufsformen entwickeln und sogar zum Tod führen (Webb et al., 1986; Frame, 1989). Neben Lassa-Viren wurde der Effekt auch bei anderen Arenaviren unterschiedlicher Virulenz sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* infizierten PBMCs und in Endothelzellen auf mRNA und Proteinebene gezeigt (Lukashevich et al., 1999; Mahanty et al., 2001; Scott & Aronson, 2008). Vor allem scheint die größte Veränderung in den frühen Zeitpunkten (früher als 6 hpi) stattzufinden (Lukashevich et al., 1999). Runterregulierte IL-8-Level könnten die fehlende Ausbildung einer effektiven Immunantwort während einer akuten Verlaufsform erklären (Lukashevich et al., 1999). Allerdings sind die Mechanismen, die zu einer supprimierten Makrophagenaktivierung führen, noch nicht vollständig geklärt.

### **5.2.3.2 Einfluss des hoch virulenten KSPV-Isolats auf die Zytokinexpression im Tier**

Um die Abhängigkeit vom Alter der Schweine nach einer KSPV-Infektion zu analysieren, wurden Tiere verschiedener Altersstufen mit einem hoch virulenten

KSPV-Stamm infiziert. Die Änderungen der Zytokinexpression wurden analysiert und verglichen. Die Infektion mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm zeigte vor allem einen altersabhängigen Verlauf. Ein leichter Anstieg der IL-1 $\beta$  Expression wurde sowohl in Schweinen der Altersgruppe 1 als auch 2 beobachtet. Allerdings unterschieden sich hierbei der Zeitpunkt des Anstiegs und auch die Anzahl der Tiere, bei denen die Veränderung festgestellt wurde. Bei allen Schweinen der Altersgruppe 1 wurde die Veränderung 2 dpi nachgewiesen. Nur bei einem Tier der Altersgruppe 2 wurde der Anstieg bereits am Anfang der Infektion beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der IL-6 Expression bei Schweinen beider Altersgruppen erzielt. Bei zwei Tieren der Altersgruppe 2 wurde ebenfalls ein Abfall der IL-8 mRNA am Anfang der Infektion festgestellt, welcher allerdings mit 25-facher Veränderung niedriger ausfiel als bei der Altersgruppe 1 mit 1000-fach.

Der Vergleich des mRNA-Levels nicht-infizierter und infizierter Schweine der Altersgruppe 2 konnte weder bei TNF- $\alpha$  noch bei IFN- $\beta$  einen Unterschied aufweisen. Da viele Zytokine schon nach wenigen Stunden, meist schon eine Stunde nach der Infektion ihren Maximalwert erreichen und vor allem nur eine kurze Zeit nachweisbar sind (Ibelgauft, 2003), ist möglicherweise der gewählte Zeitpunkt von 5 hpi für eine Analyse bereits zu spät gewählt. Ein anderes Problem könnte sein, dass die nachweisbare Menge an Zytokin-mRNA zu niedrig ist, so dass diese gar nicht erfasst werden können (Ruggli et al., 2003; Balmelli et al., 2005; Summerfield et al., 2006). Allerdings lässt das IL-8, vor allem der Altersgruppe 1, die Hypothese zu, dass es eine Schlüsselrolle in der Pathogenese spielt (Lukashevich et al., 1999; Mahanty et al., 2001). Einen möglichen Einfluss auf die Zytokinexpression könnten auch unterschiedliche Zellen haben. Wie bereits bekannt, wurde z. B. ein Anstieg des TNF- $\alpha$  in dendritischen Zellen bereits 16 hpi nachgewiesen, wohingegen in Monozyten und Makrophagen eine Induktion des gleichen Zytokins erst 2 dpi gefunden wurde (Sánchez-Cordón et al., 2002; Jamin et al., 2008). In diesem Fall könnte aber auch das Alter der Tiere entscheidend sein, da in beiden Studien Tiere unterschiedlicher Altersstufen untersucht wurden.

In der vorliegenden Studie konnte auf der einen Seite zum ersten Mal der Einfluss des hoch virulenten KSPV-Stamm auf die IL-8 Expression *in vivo* gezeigt werden. Ebenso wurde zum ersten Mal in einem *in vivo* Infektionsversuch ein solch früher Zeitpunkt für die Analyse gewählt. Auf der anderen Seite wurde zum ersten Mal eine

Genexpressionsanalyse in KSPV-infizierten Zellen mit Hilfe von SAGE durchgeführt und auch der Effekt drei verschiedener KSPV-Isolate *in vitro* untersucht.

### **5.3 Schlussfolgerung**

Die Analyse der mRNA-Level von ausgewählten Zytokinen in nicht-infizierten und KSPV-infizierten Zellen wurde sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Versuchen durchgeführt. Die Resultate der *in vitro* Studie können nur bedingt auf *in vivo* Untersuchungen übertragen werden. Die Schwierigkeit bei *in vivo* Versuchen besteht darin, geeignete Zeitpunkte für die Analyse zu bestimmen. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Probeentnahmen in engen Zeitabständen die Tiere in einen erhöhten Stresszustand versetzen, der eventuell die zu untersuchenden Parameter beeinflussen kann. In *in vitro* Infektionsversuchen kann der Zeitpunkt flexibler bestimmt werden. Ein anderer Vorteil ist natürlich auch, dass der Erhalt und die Kultivierung der Zellen einfacher sind. Schwierig ist es nur, geeignete Zellen für die Analyse der Genexpression auszuwählen.

In dieser Studie wurden sowohl KSPV-Isolate unterschiedlicher Virulenz als auch das Alter der Tiere und verschiedene Zellen hinsichtlich der Zytokin-Genexpression berücksichtigt. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA bestimmter Zytokine nur in speziellen Zellen aktiviert wird und dass die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  altersabhängig zu sein scheint.



## 6 Literaturverzeichnis

- Anonym (2001). Council Directive 2001/89/EC. Official Journal of the European Communities.
- Anonym (2005). Classical swine fever in South Africa: follow-up report No. 4
- Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. & Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry* 59, 783-836.
- Balmelli, C., Vincent, I. E., Rau, H., Guzylack-Piriou, L., McCullough, K. & Summerfield, A. (2005). Fc gamma RII-dependent sensitisation of natural interferon-producing cells for viral infection and interferon-alpha responses. *European Journal of Immunology* 35(8), 2406-2415.
- Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 14(2), 241-254.
- Bauhofer, O., Summerfield, A., Sakoda, Y., Tratschin, J., Hofmann, M. A. & Ruggli, N. (2007). Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *Journal of Virology* 81(7), 3087-3096.
- Bautista, M. J., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2002). Early platelet aggregation as a cause of thrombocytopenia in classical swine fever. *Veterinary Pathology* 39(1), 84-91.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. & Thiel, H. J. (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262(1), 64-71.
- Bensaude, E., Turner, J. L. E., Wakeley, P. R., Sweetman, D. A., Pardieu, C., Drew, T. W., Wileman, T. & Powell, P. P. (2004). Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *The Journal of General Virology* 85(Pt 4), 1029-1037.
- Blacksell, S. D., Khounsy, S., Van Aken, D., Gleeson, L. J. & Westbury, H. A. (2006). Comparative susceptibility of indigenous and improved pig breeds to Classical swine fever virus infection: practical and epidemiological implications in a

- subsistence-based, developing country setting. *Tropical Animal Health and Production* 38(6), 467-474.
- Blome, S. (2006). Zur Pathogenese der Klassischen Schweinepest: Analysen der Blutgerinnungsstörungen. Dissertation, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Boehm, K. H., Abdallah, I. S. & Reuss, U. (1966). Vergleichender Antigen- und Antikörpernachweis bei der Schweinepest mittels der Agargelpräzipitation. *Arch. Exp. Vet. Med.* 20, 927-933.
- Borca, M. V., Gudmundsdottir, I., Fernández-Sainz, I. J., Holinka, L. G. & Risatti, G. R. (2008). Patterns of cellular gene expression in swine macrophages infected with highly virulent classical swine fever virus strain Brescia. *Virus Research* 138(1-2), 89-96.
- Bosch, I., Xhaja, K., Estevez, L., Raines, G., Melichar, H., Warke, R. V., Fournier, M. V., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. (2002). Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *Journal of Virology* 76(11), 5588-5597.
- Bray, M. (2005). Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Current Opinion in Immunology* 17(4), 399-403.
- Bray, M. & Geisbert, T. W. (2005). Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(8), 1560-1566.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 269-290.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2), 169-193.
- Calderon, N. L., Fortoul, T. I., Paasch, L. H. & Bouda, L. (1998). Pathogenesis of thrombocytopenia in acute classical swine fever. *Acta Veterinaria Brno* 67: 115-119.
- Carrasco, L., Ruiz-Villamor, E., Gómez-Villamandos, J. C., Salguero, F. J., Bautista, M. J., Maciá, M., Quezada, M. & Jover, A. (2001). Classical swine fever: morphological and morphometrical study of pulmonary intravascular macrophages. *Journal of Comparative Pathology* 125(1), 1-7.

- Carrasco, C. P., Rigden, R. C., Vincent, I. E., Balmelli, C., Ceppi, M., Bauhofer, O., Tâche, V., Hjertner, B., McNeilly, F., van Gennip, H. G., McCullough, K. C. & Summerfield, A. (2004). Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *The Journal of General Virology* 85(Pt 6), 1633-1641.
- Choi, C., Hwang, K. & Chae, C. (2004). Classical swine fever virus induces tumor necrosis factor-alpha and lymphocyte apoptosis. *Archives of Virology* 149(5), 875-889.
- Collett, M. S. (1992). Molecular genetics of pestiviruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 15(3), 145-154.
- Croix, B. St., Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Traverso, G., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (2000). MicroSAGE Detailed Protocol. Johns Hopkins Oncology Center and Howard Hughes Medical Institute, 424 North Bond Street Baltimore, MD 21231.
- Dahle, J. & Liess, B. (1992). A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 15(3), 203-211.
- Depner, K. R., Gruber, A. & Liess, B. (1994). Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of Hog Cholera Classical Swine Fever Virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* 81, 370-373.
- Depner, K. R., Rodriguez, A., Pohlenz, J. & Liess, B. (1996). Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a virus isolated during 1995 epidemic in Germany : Clinical, virological, serological and pathological findings. *Europ. J. Vet. Pathol.* 2, 61-66.
- Depner, K. R., Hinrichs, U., Bickhardt, K., Greiser-Wilke, I., Pohlenz, J., Moennig, V. & Liess, B. (1997). Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection. *The Veterinary Record* 140(19), 506-507.
- de Smit, A. J., Bouma, A., Terpstra, C. & van Oirschot, J. T. (1999). Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Veterinary Microbiology* 67(4), 239-249.
- Dinarello, C. A. (2005). Interleukin-1beta. *Critical Care Medicine* 33(12 Suppl), 460-462.
- Dong, X. & Chen, Y. (2007). Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 25(2), 205-230.

- Dunne, H. W. (1970). Hog Cholera. In: H. W. Dunne (Hrsg.): Diseases of swine. Durand, S. V. M., Hulst, M. M., de Wit, A. A. C., Mastebroek, L. & Loeffen, W. L. A. (2009). Activation and modulation of antiviral and apoptotic genes in pigs infected with classical swine fever viruses of high, moderate or low virulence. *Archives of Virology* 154(9), 1417-1431.
- Duvigneau, J. C., Hartl, R. T., Groiss, S. & Gemeiner, M. (2005). Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *Journal of Immunological Methods* 306(1-2), 16-27.
- Edwards, S., Fukusho, A., Lefèvre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P. & Westergaard, J. (2000). Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology* 73(2-3), 103-119.
- Floegel, G., Wehrend, A., Depner, K. R., Fritzeimer, J., Waberski, D. & Moennig, V. (2000). Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. *Veterinary Microbiology* 77(1-2), 109-116.
- Floegel-Niesmann, G., Bunzenthal, C., Fischer, S. & Moennig, V. (2003). Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50(5), 214-220.
- Frame, J. D. (1989). Clinical features of Lassa fever in Liberia. *Reviews of Infectious Diseases* 11 Suppl 4, 783-789.
- Frey, H. R. & Liess, B. (1971). [Multiplication kinetics and usefulness of a highly cytopathogenic VD-MD virus strain in diagnostic studies using the microtiter method]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 18(1), 61-71.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 8 Suppl 2, 3.
- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Gibb, T. R., Steele, K. E., Jaax, N. K. & Jahrling, P. B. (2000). Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80(2), 171-186.
- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Larsen, T., Geisbert, J. B., Paragas, J., Young, H. A., Fredeking, T. M., Rote, W. E. & Vlasuk, G. P. (2003a). Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* 362(9400), 1953-1958.

- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Larsen, T., Young, H. A., Reed, D. S., Geisbert, J. B., Scott, D. P., Kagan, E., Jahrling, P. B. & Davis, K. J. (2003b). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *The American Journal of Pathology* 163(6), 2347-2370.
- Geisbert, T. W., Young, H. A., Jahrling, P. B., Davis, K. J., Kagan, E. & Hensley, L. E. (2003c). Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *The Journal of Infectious Diseases* 188(11), 1618-1629.
- Geisbert, T. W., Young, H. A., Jahrling, P. B., Davis, K. J., Larsen, T., Kagan, E. & Hensley, L. E. (2003d). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. *The American Journal of Pathology* 163(6), 2371-2382.
- Geisbert, T. W. & Jahrling, P. B. (2004). Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nature Medicine* 10(12 Suppl), 110-121.
- Gladue, D. P., Zhu, J., Holinka, L. G., Fernandez-Sainz, I., Carrillo, C., Prarat, M. V., O'Donnell, V. & Borca, M. V. (2010). Patterns of gene expression in swine macrophages infected with classical swine fever virus detected by microarray. *Virus Research* 151(1), 10-18.
- Gómez del Moral, M., Ortuño, E., Fernández-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerra, A. & Domínguez, J. (1999). African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *Journal of Virology* 73(3), 2173-2180.
- Gómez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Bautista, M. J., Carrasco, L., Sánchez, C., Quezada, M. & Sierra, M. A. (1998). Immunohistochemical and ultrastructural evidence of hog cholera virus infection of megakaryocytes in bone marrow and spleen. *Journal of Comparative Pathology* 119(2), 111-119.
- Gómez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Quezada, M., Sánchez, C. P., Salguero, F. J. & Sierra, M. A. (2000). Pathogenesis of classical swine fever: renal haemorrhages and erythrodiapedesis. *Journal of Comparative Pathology* 123(1), 47-54.
- Gómez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sánchez, C. P., Sánchez-Cordón, P. J., Salguero, F. J. & Jover, A. (2001). Morphological and

- immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology* 125(2-3), 98-109.
- Gómez-Villamandos, J. C., Carrasco, L., Bautista, M. J., Sierra, M. A., Quezada, M., Hervás, J., Chacón, M. D. L. F., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Núñez, A., Mekonen, T., Méndez, A. & Jover, A. (2003a). African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 110(4), 165-169.
- Gomez-Villamandos, J. C., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Sánchez-Cordón, P. J., Bautista, M. J. & Sierra, M. A. (2003b). Classical Swine Fever: pathology of bone marrow. *Veterinary Pathology* 40(2), 157-163.
- Graham, S. P., Everett, H. E., Johns, H. L., Haines, F. J., La Rocca, S. A., Khatri, M., Wright, I. K., Drew, T. & Crooke, H. R. (2010). Characterisation of virus-specific peripheral blood cell cytokine responses following vaccination or infection with classical swine fever viruses. *Veterinary Microbiology* 142(1-2), 34-40.
- Greiser-Wilke, I., Moennig, V., Coulibaly, C. O., Dahle, J., Leder, L. & Liess, B. (1990). Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. *Archives of Virology* 111(3-4), 213-225.
- Greiser-Wilke, I., Dittmar, K. E., Liess, B. & Moennig, V. (1992). Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *The Journal of General Virology* 73 (Pt 1), 47-52.
- Greiser-Wilke, I., Fritzemeier, J., Koenen, F., Vanderhallen, H., Rutili, D., De Mia, G. M., Romero, L., Rosell, R., Sanchez-Vizcaino, J. M. & San Gabriel, A. (2000). Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998. *Veterinary Microbiology* 77(1-2), 17-27.
- Harder, T. C. & Huerbert, P. (unveröffentlicht). Co-detection of viral and mycoplasmal agents associated with the porcine respiratory disease complex by a nonplex reverse transcription-polymerase chain amplification assay.
- Heene, D., Hoffmann-Fezer, G., Müller-Berghaus, G., Hoffmann, R., Weiss, E. & Lasch, H. G. (1971). [Coagulation disorders in acute hog cholera]. *Beiträge Zur Pathologie* 144(3), 259-271.
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115(1), 1-20.

- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal* 374(Pt 1), 1-20.
- Hensley, L. E., Young, H. A., Jahrling, P. B. & Geisbert, T. W. (2002). Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunology Letters* 80(3), 169-179.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* (Nature Publishing Company) 10(4), 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* (Nature Publishing Company) 11(9), 1026-1030.
- Hoffmann, R., Hoffmann-Fezer, G., Kimeto, B. & Weiss, E. (1971a). [Microthrombi as morphological evidence of consumption coagulopathy in acute hog cholera]. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 18(9), 710-718.
- Hoffmann, R., Hoffmann-Fezer, G. & Weiss, E. (1971b). [Bone marrow lesions in acute hog cholera with special reference to thrombopoietic cells]. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 84(16), 301-305.
- Holinka, L. G., Fernandez-Sainz, I., O'Donnell, V., Prarat, M. V., Gladue, D. P., Lu, Z., Risatti, G. R. & Borca, M. V. (2009). Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine. *Virology* 384(1), 106-113.
- Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 348(2), 138-150.
- Ibelgauft, H. (2003). Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia; Version 10.3: URL: <http://www.copewithcytokines.de>.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Yu, H. & Behrens, S. (2004). Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA (New York, N.Y.)* 10(10), 1637-1652.
- Jamin, A., Gorin, S., Cariolet, R., Le Potier, M. & Kuntz-Simon, G. (2008). Classical swine fever virus induces activation of plasmacytoid and conventional

- dendritic cells in tonsil, blood, and spleen of infected pigs. *Veterinary Research* 39(1), 7.
- Javid, B., MacAry, P. A. & Lehner, P. J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(4), 2035-2040.
- John, T. J. (2003). Dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 361(9352), 181-182.
- Knoetig, S. M., Summerfield, A., Spagnuolo-Weaver, M. & McCullough, K. C. (1999). Immunopathogenesis of classical swine fever: role of monocytic cells. *Immunology* 97(2), 359-366.
- Knoetig, S. M., McCullough, K. C. & Summerfield, A. (2002). Lipopolysaccharide-induced impairment of classical swine fever virus infection in monocytic cells is sensitive to 2-aminopurine. *Antiviral Research* 53(1), 75-81.
- La Rocca, S. A., Herbert, R. J., Crooke, H., Drew, T. W., Wileman, T. E. & Powell, P. P. (2005). Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro. *Journal of Virology* 79(11), 7239-7247.
- Laddomada, A. (2000). Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Veterinary Microbiology* 73(2-3), 121-130.
- Lee, F., Chiu, C. P., Wideman, J., Hodgkin, P., Hudak, S., Troutt, L., Ng, T., Moulds, C., Coffman, R. & Zlotnik, A. (1989). Interleukin-6. A multifunctional regulator of growth and differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557, 215-228, discussion 228-229.
- Leifer, I., Lange, E., Reimann, I., Blome, S., Juanola, S., Duran, J. P. & Beer, M. (2009). Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine* 27(47), 6522-6529.
- Levy, A., Valero, N., Espina, L. M., Añez, G., Arias, J. & Mosquera, J. (2010). Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104(1), 16-23.



- Li, J., Yu, Y., Feng, L., Cai, X., Tang, H., Sun, S., Zhang, H., Liang, J. & Luo, T. R. (2010). Global transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cell during classical swine fever virus infection. *Virus Research* 148(1-2), 60-70.
- Liess, B., Frey, H.-R. & Prager, D. (1977). Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera and bovine viral diarrhea virus. *Comm. Europ. Commun. Publ. No. EUR 5904*, 23-33.
- Liess, B. (1987). Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Annales De Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research* 18(2), 139-145.
- Liu, L., Hoffmann, B., Baule, C., Beer, M., Belák, S. & Widén, F. (2009). Two realtime RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *Journal of Virological Methods* 159(1), 131-133.
- Lukashevich, I. S., Maryankova, R., Vladyko, A. S., Nashkevich, N., Koleda, S., Djavani, M., Horejsh, D., Voitenok, N. N. & Salvato, M. S. (1999). Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *Journal of Medical Virology* 59(4), 552-560.
- Mahanty, S., Bausch, D. G., Thomas, R. L., Goba, A., Bah, A., Peters, C. J. & Rollin, P. E. (2001). Low levels of interleukin-8 and interferon-inducible protein-10 in serum are associated with fatal infections in acute Lassa fever. *The Journal of Infectious Diseases* 183(12), 1713-1721.
- Mahanty, S., Hutchinson, K., Agarwal, S., McRae, M., Rollin, P. E. & Pulendran, B. (2003). Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170(6), 2797-2801.
- Mahanty, S. & Bray, M. (2004). Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *The Lancet Infectious Diseases* 4(8), 487-498.
- Malavige, G. N., Ranatunga, P. K., Jayaratne, S. D., Wijesiriwardana, B., Seneviratne, S. L. & Karunatilaka, D. H. (2007). Dengue viral infections as a cause of encephalopathy. *Indian Journal of Medical Microbiology* 25(2), 143-145.
- Martínez-Salas, E., Pacheco, A., Serrano, P. & Fernandez, N. (2008). New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *The Journal of General Virology* 89(Pt 3), 611-626.

- Mengeling, W. L. & Packer, R. A. (1969). Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. *American Journal of Veterinary Research* 30(3), 409-417.
- Meyer, H., Liess, B., Frey, H. R., Hermanns, W. & Trautwein, G. (1981). Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 28(8), 659-668.
- Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171(2), 555-567.
- Meyers, G. & Thiel, H. J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research* 47, 53-118.
- Mittelholzer, C., Moser, C., Tratschin, J. D. & Hofmann, M. A. (2000). Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Veterinary Microbiology* 74(4), 293-308.
- Modi, W. S., Dean, M., Seuanez, H. N., Mukaida, N., Matsushima, K. & O'Brien, S. J. (1990). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Human Genetics* 84(2), 185-187.
- Moennig, V. & Plagemann, P. G. (1992). The pestiviruses. *Advances in Virus Research* 41, 53-98.
- Moennig, V. (2000). Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology* 73(2-3), 93-102.
- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G. & Greiser-Wilke, I. (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 165(1), 11-20.
- Monath, T. P. (2001). Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 1(1), 11-20.
- Moreno-Altamirano, M. M. B., Romano, M., Legorreta-Herrera, M., Sánchez-García, F. J. & Colston, M. J. (2004). Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. *Scandinavian Journal of Immunology* 60(6), 631-638.
- Moulin, H. R., Seuberlich, T., Bauhofer, O., Bennett, L. C., Tratschin, J., Hofmann, M. A. & Ruggli, N. (2007). Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical

- swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* 365(2), 376-389.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3), 355-365. Narita, M., Kawashima, K., Kimura, K., Mikami, O., Shibahara, T., Yamada, S. & Sakoda, Y. (2000). Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Veterinary Pathology* 7(5), 402-408.
- Neill, J. D. & Ridpath, J. F. (2003a). Gene expression changes in BVDV2-infected MDBK cells. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 31(2), 97-102.
- Neill, J. D. & Ridpath, J. F. (2003b). Gene expression changes in MDBK cells infected with genotype 2 bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 96(4), 301-312.
- Núñez, A., Gómez-Villamandos, J. C., Sánchez-Cordón, P. J., Fernández de Marco, M., Pedrera, M., Salguero, F. J. & Carrasco, L. (2005). Expression of proinflammatory cytokines by hepatic macrophages in acute classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology* 133(1), 23-32.
- Pankraz, A., Thiel, H. & Becher, P. (2005). Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology* 79(14), 9119-9127.
- Paton, D. J., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J. Y., Liou, P. P., Stadejek, T., Lowings, J. P., Björklund, H. & Belák, S. (2000). Genetic typing of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 73(2-3), 137-157.
- Paton, D. J. & Greiser-Wilke, I. (2003). Classical swine fever--an update. *Research in Veterinary Science* 75(3), 169-178.
- Pauly, T., König, M., Thiel, H. J. & Saalmüller, A. (1998). Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *The Journal of General Virology* 79 ( Pt 1), 31-40.
- Peters, C. J. & Zaki, S. R. (2002). Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Critical Care Medicine* 30(5 Suppl), 268-273.
- Plateau, E., Vannier, P. & Tillon, J. P. (1980). Atypical hog cholera infection: viral isolation and clinical study of in utero transmission. *American Journal of Veterinary Research* 41(12), 2012-2015.

- Pringle, C. R. (1999). Virus taxonomy-1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Archives of Virology* 144(2), 421-429.
- Qu, L., McMullan, L. K. & Rice, C. M. (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *Journal of Virology* 75(22), 10651-10662.
- Quezada, M., Cayo, L., Carrasco, L., Islas, A., Lecocq, C., Gómez-Villamandos, J. C. & Sierra, M. A. (2000). Characterization of lesions caused by a South American virulent isolate ('Quillota') of the hog cholera virus. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47(6), 411-422.
- Raghupathy, R., Chaturvedi, U. C., Al-Sayer, H., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., Nagar, R., Kapoor, S., Misra, A., Mathur, A., Nusrat, H., Azizieh, F., Khan, M. A. & Mustafa, A. S. (1998). Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology* 56(3), 280-285.
- Reimann, I., Depner, K., Utke, K., Leifer, I., Lange, E. & Beer, M. (2010). Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Veterinary Microbiology* 142(1-2), 45-50.
- Ressang, A. A. (1973). Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 20(4), 272-288.
- Ridpath, J. F. & Bolin, S. R. (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Research* 50(2), 237-243.
- Ridpath, J. F., Bendfeldt, S., Neill, J. D. & Liebler-Tenorio, E. (2006). Lymphocytopathogenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Research* 118(1-2), 62-69.
- Röhler, H. & Pehl, K.-H. (1960). Atlas der pathologisch-anatomischen und histopathologischen Diagnostik der Schweinepest. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Rubins, K. H., Hensley, L. E., Wahl-Jensen, V., Daddario DiCaprio, K. M., Young, H. A., Reed, D. S., Jahrling, P. B., Brown, P. O., Relman, D. A. & Geisbert, T. W. (2007). The temporal program of peripheral blood gene expression in the

- response of nonhuman primates to Ebola hemorrhagic fever. *Genome Biology* 8(8), R174.
- Ruggli, N., Tratschin, J., Schweizer, M., McCullough, K. C., Hofmann, M. A. & Summerfield, A. (2003). Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *Journal of Virology* 77(13), 7645-7654.
- Ruiz-Villamor, E., Quezada, M., Bautista, M. J., Romanini, S., Carrasco, L., Salguero, F. J. & Gómez-Villamandos, J. C. (2001). Classical swine fever: pathogenesis of glomerular damage and immunocharacterization of immunocomplex deposits. *Journal of Comparative Pathology* 124(4), 246-254.
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. & Thiel, H. J. (1991). Molecular characterization of hog cholera virus. *Archives of Virology. Supplementum* 3, 7-18.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)* 230(4732), 1350-1354.
- Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Núñez, A., Bautista, M. J., Jover, A. & Gómez-Villamos, J. C. (2002). Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology* 127(4), 239-248.
- Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2003). A histopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of the intestine in pigs inoculated with classical swine fever virus. *Veterinary Pathology* 40(3), 254-262.
- Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Salguero, F. J., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2005a). Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *Journal of Comparative Pathology* 132(4), 249-260.
- Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Salguero, F. J., Pedrera, M., Fernández de Marco, M. & Gómez-Villamandos, J. C. (2005b). Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. *Veterinary Pathology* 42(4), 477-488.
- Sato, M., Mikami, O., Kobayashi, M. & Nakajima, Y. (2000). Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 75(1), 1-9.

- Schnittler, H. & Feldmann, H. (2003). Viral hemorrhagic fever--a vascular disease? *Thrombosis and Haemostasis* 89(6), 967-972.
- Scott, E. P. & Aronson, J. F. (2008). Cytokine patterns in a comparative model of arenavirus haemorrhagic fever in guinea pigs. *The Journal of General Virology* 89(Pt 10), 2569-2579.
- Shi, Z., Sun, J., Guo, H. & Tu, C. (2009). Genomic expression profiling of peripheral blood leukocytes of pigs infected with highly virulent classical swine fever virus strain Shimen. *The Journal of General Virology* 90(Pt 7), 1670-1680.
- Staeheli, P. (1990). Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Advances in Virus Research* 38, 147-200.
- Summerfield, A., Hofmann, M. A. & McCullough, K. C. (1998a). Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63(3), 289-301.
- Summerfield, A., Knötig, S. M. & McCullough, K. C. (1998b). Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *Journal of Virology* 72(3), 1853-1861.
- Summerfield, A., Knoetig, S. M., Tschudin, R. & McCullough, K. C. (2000). Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology* 272(1), 50-60.
- Summerfield, A., McNeilly, F., Walker, I., Allan, G., Knoetig, S. M. & McCullough, K. C. (2001). Depletion of CD4(+) and CD8(high+) T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 78(1), 3-19.
- Summerfield, A., Alves, M., Ruggli, N., de Bruin, M. G. M. & McCullough, K. C. (2006). High IFN-alpha responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26(4), 248-255.
- Sun, J., Jiang, Y., Shi, Z., Yan, Y., Guo, H., He, F. & Tu, C. (2008). Proteomic Alteration of PK-15 Cells after Infection by Classical Swine Fever Virus. *Journal of Proteome Research* 7(12), 5263-5269.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. & Damrongwatanapokin, S. (2001). The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical

- swine fever virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83(3-4), 177-189.
- Susa, M., König, M., Saalmüller, A., Reddehase, M. J. & Thiel, H. J. (1992). Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *Journal of Virology* 66(2), 1171-1175.
- Talavera, D., Castillo, A. M., Dominguez, M. C., Gutierrez, A. E. & Meza, I. (2004). IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *The Journal of General Virology* 85(Pt 7), 1801-1813.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. & Thiel, H. J. (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *Journal of Virology* 71(7), 5415-5422.
- Tautz, N., Kaiser, A. & Thiel, H. J. (2000). NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273(2), 351-363.
- Trautwein, G. (1988). Pathology and pathogenesis of the disease. In: B. Liess (Ed.): *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston/Dordrecht/Lancaster, 27-54
- Trottier, M. D., Lyles, D. S. & Reiss, C. S. (2007). Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection. *Journal of Neurovirology* 13(5), 433-445.
- van Oirschot, J. T. (1979). Experimental production of congenital persistent swine fever infections. Clinical, pathological and virological observations. *Vet. Microbiol.* 4, 117-132 Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 3<sup>rd</sup> Ed., S. 177-239.
- van Oirschot, J. T. (1999). Classical swine fever (Hog cholera). In: W. L. Mengeling (Hrsg.): *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 8th Ed., S. 159-172
- van Oirschot, J. T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Veterinary Microbiology* 96(4), 367-384.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science (New York, N.Y.)* 270(5235), 484-487.

- Vilcek, S., Paton, D. J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmann, W., Vega, S., Scicluna, M. T. & Paifi, V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology* 146(1), 99-115.
- Webb, P. A., McCormick, J. B., King, I. J., Bosman, I., Johnson, K. M., Elliott, L. H., Kono, G. K. & O'Sullivan, R. (1986). Lassa fever in children in Sierra Leone, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80(4), 577-582.
- Wehrle, F., Renzullo, S., Faust, A., Beer, M., Kaden, V. & Hofmann, M. A. (2007). Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines. *The Journal of General Virology* 88(Pt 8), 2247-2258.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. & Thiel, H. J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *Journal of Virology* 66(6), 3677-3682.
- Wengler, G., Bradley, M. S., Collett, M. S., Heinz, F. X., Schlesinger, R. W. & Strauss, J. H. (1995) - Family Flaviviridae. In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (Hrsg.): *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*, Springer Verlag, Wien, New York, 415 - 427.
- Wiskerchen, M. & Collett, M. S. (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184(1), 341-350.
- Zampieri, C. A., Sullivan, N. J. & Nabel, G. J. (2007). Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nature Immunology* 8(11), 1159-1164.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H. & Lenardo, M. J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377(6547), 348-351.



## 7 Anhang

### 7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

#### EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) pH 7,0

EMEM-Pulvermedium	9,6 g	Gibco BRL, Eggenstein
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g	VWR, Darmstadt
Penicillin G	0,06 g	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycinsulfat	0,05 g	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	0,016 g	VWR, Darmstadt
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml	

#### RPMI 1640 Medium für die Kultivierung der PBMCs

mit L-Glutamin		Gibco BRL, Eggenstein
----------------	--	-----------------------

#### Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %), pH 7,0

NaCl	8,0 g	Merck, Darmstadt
KCl	0,2 g	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g	Merck, Darmstadt
Trypsin (3 U/mg)	1,25 g	Serva, Heidelberg
EDTA (Versen)	1,25 g	Merck, Darmstadt
Penicillin G	50 mg	Sigma, Deisenhofen
Streptomycinsulfat	60 mg	Sigma, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g	Sigma, Deisenhofen
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000,00 ml	

#### Seren für die Zellkultur

Fetales Kälberserum	Biochrom, Hamburg
Schweineserum	PAA Laboratories, Cölbe

## 7.2 Sonstige Puffer und Lösungen

### PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung), pH 7,0 – 7,2

NaCl	8,00 g	Merck, Darmstadt
KCl	0,20 g	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,10 g	Sigma, Deisenhofen
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml	

### PBS/Tween

1x PBS	1000 ml	
Tween <sup>®</sup> 20	100 µl	Serva, Heidelberg

### PBSM (PBS ohne Kalzium und Magnesium), pH 7,0 – 7,2

NaCl	8,00 g	Merck, Darmstadt
KCl	0,20 g	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml	

### 10 x TBE-Puffer für die Gelelektrophorese, pH 8,0

TRIS	108 g	Merck, Darmstadt
Borsäure	53,4 g	Roth, Karlsruhe
EDTA	7,4 g	AppliChem, Darmstadt
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

### 10 x TAE-Puffer für das Ethidiumbromidbad, pH 8,0

TRIS	40 mM	Merck, Darmstadt
Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O	20 mM	Merck, Darmstadt
EDTA	2 mM	AppliChem, Darmstadt

Aqua bidest. ad 1000 ml

5 x Probenpuffer zum Beladen von Agarose-Gelen

Glyzerin 25 %  
EDTA 0,5 mM  
Bromphenolblau 0,2 %

Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid 0,05 g Sigma-Aldrich, Hamburg  
1 x TAE-Puffer 250 ml

AEC-Lösung für den PLA

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) 20,00 mg Sigma-Aldrich, Hamburg  
Dimethylformamid 3,00 ml Merck, Darmstadt  
Natriumazetat-Puffer  
(0,05 M, pH 5,0) ad 50 ml Merck, Darmstadt  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %) 0,40 ml Merck, Darmstadt

Lymphocyte Separation Medium LSM 1077 PAA Laboratories, Cölbe

**7.3 Sonstige Reagenzien**

Agar Agar Roth, Karlsruhe  
Agarose Biozym, Hess. Oldendorf  
Ethanol Merck, Darmstadt  
Tween<sub>20</sub> Merck, Darmstadt  
LPS Sigma-Aldrich, Hamburg

**7.4 Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten**

dNTPs Roche, Penzberg  
MgCl<sub>2</sub> Sigma-Aldrich, Hamburg  
Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer Promega, Mannheim  
RNase-Inhibitor (5 U) Invitrogen, Karlsruhe

## **7.5 Kommerziell erhältliche Kits und Antikörper**

1.1 Thermo-Start PCR Mastermix (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)

Kat. Nr.: AB-0938/15/A

ABgene, Hamburg

*QuantiTect<sup>®</sup> SYBR Green PCR Kit*

Kat. Nr.: 204145

QIAGEN, Hilden

*RNeasy Mini Kit*

Kat. Nr.: 74106

QIAGEN, Hilden

M-MLV Reverse Transkriptase

Kat. Nr.: 28025-021

Invitrogen, Karlsruhe

Streptavidin-Peroxidase (HRP)-Komplex

GE Healthcare, München

## **7.6 Marker**

peqGold 100 bp DNA-Leiter Plus

Kat. Nr.: 25-2021

Peqlab - Biotechnologie  
GmbH, Erlangen

## **7.7 Geräte und Verbrauchsmittel**

### Agarose-Gelelektrophoresesystem

Mini Sub Cell

Bio-Rad, München

Wide Mini Sub Cell

Bio-Rad, München

Spannungsquelle Power Supply

Bio-Rad, München

Mikrowellengerät

Privileg

UV-Transilluminator

UVP, USA

Bildverarbeitungssystem

MWG, Ebersberg

### Autoklaven

Autoklav 17

Melag, Berlin

Typ A5

Webeco, Bad Schwartau

### Inkubatoren

CO<sub>2</sub>-Inkubator

Binder, Tuttlingen

CO<sub>2</sub>-Inkubator Typ B 5060 EK/CO<sub>2</sub>

Heraeus, Hanau

Hämatologieanalysator

Abacus Vet Junior

Diatron,  
Bad Oeynhausen

Mikroskopie

Inverses Mikroskop (715075)

Leitz, Wetzlar

Photometer

Ultraspec 2000

Pharmacia Biotech,  
Freiburg

Pipetten und Pipettierhilfen

12-Kanal-Pipette (Transferpette<sup>®</sup> S-12)  
2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

Brand, Wertheim  
BioHit, Rosbach v. d.  
Höhe

accu-jet<sup>®</sup>  
Pipetboy acu

Brand, Wertheim  
Integra Biosciences,  
Fernwald

Pipettenspitzen

Volumen 1000 µl  
Volumen 200 µl  
Volumen 10 µl  
Filterspitzen

MBT, Gießen  
Ratiolab, Dreieich  
Ratiolab, Dreieich  
Biozym, Hessisch  
Oldendorf

Glaspipetten

Landgraf, Hannover

Reaktionsgefäße

Volumen 0,5 ml  
Volumen 1,5 ml  
Volumen 2,0 ml  
Glasgefäße 25 ml bis 3 l  
Strip Tube, 8 × 0,2 ml Format  
Optical Cap, 8 × Strip

Landgraf, Hannover  
Landgraf, Hannover  
Landgraf, Hannover  
Landgraf, Hannover  
  
Agilent Technologies

Sicherheitswerkbänke

NUAIRE™ Klasse II Typ A/B3

NUAIRE, Plymouth,  
Minnesota, USA

Nunc Mikroflow adv. biosafety cabinet

Schnakenberg, Bremen

Thermocycler und real-time PCR

Trio Thermoblock 9609311

Biometra, Göttingen

Mx 3005™ QPCR System

Agilent Technologies

Vakuumpumpe

Vacunsafe

Integra Biosciences,  
Chur, Schweiz

Verbrauchsmittel Blutentnahme

Kabavette® G EDTA 7,5

Kabe, Nümbrecht

Kabavette® G Serum 7,5

Kabe, Nümbrecht

Adapter zur Mehrfachentnahme mit Luer-Konus

Kabe, Nümbrecht

Terumo® Einmalkanülen 18 G

Heiland, Hamburg

Terumo® Einmalkanülen 20 G

Heiland, Hamburg

Terumo® Einmalkanülen 22 G

Heiland, Hamburg

Terumo® Einwegspritzen, 5 ml

Heiland, Hamburg

Terumo® Einwegspritzen, 10 ml

Heiland, Hamburg

Terumo® Einwegspritzen, 20 ml

Heiland, Hamburg

Vortex

Modell K-550-GE

Bender & Hobein, Zürich

Waage

1213 MP

Sartorius, Göttingen

Analysenwaage 1712 MP 8

Sartorius, Göttingen

Wasserbäder

Type 1003

Gesellschaft für  
Labortechnik, Burgwedel

Zählkammer

Thomakammer  
Neubauer, improved

Heiland, Hamburg  
Landgraf Laborgeräte,  
Langenhagen

Zellkultursysteme

Gewebekulturflaschen 50 ml/25 cm<sup>2</sup>  
Gewebekulturflasche 250 ml/75 cm<sup>2</sup>  
Falcon Röhrchen (15 ml und 50 ml)  
Mikrotiterplatten

Greiner, Nürtingen  
Greiner, Nürtingen  
Greiner, Nürtingen  
Corning Life Sciences

Zentrifugen

Biofuge pico  
Labofuge 400R

Heraeus, Hanau  
Heraeus-Christ,  
Osterode/Harz

Multifuge 3 S-R

Heraeus- Christ,  
Osterode/Harz

SAGE: Verwendete Reagenzien

*Superscript Choice System cDNA Synthesis Kit*  
Dynabeads M-280 Streptavidin Slurry  
Magnet  
BsmFI  
Nlall  
Sph 1  
Klenow  
*T4 Ligase High Concentration (5U / µl)*  
*T4 Ligase Regular Conentration (1U / µl)*  
Platinum Taq  
Glycogen  
pZERO-1 Plasmid  
10mM dNTPs  
DMSO  
7.5 M NH<sub>4</sub>OAc

GibcoBRL  
Dynal  
Dynal  
NEB  
NEB  
NEB  
Pharmacia/USB  
GibcoBRL  
GibcoBRL  
BRL  
Boehringer Mannheim  
Invitrogen  
GibcoBRL  
Sigma  
Sigma

2 x B+W Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)  
1 mM EDTA  
2.0 M NaCl

LoTE

3 mM Tris-HCl (pH 7.5)

0.2 mM EDTA (pH 7.5)

in H<sub>2</sub>O aufnehmen

PC8

480 ml Phenol

320 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)

640 ml Chloroform

10 x PCR Buffer

166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

670 mM Tris pH 8.8

67 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM Beta-mercaptoethanol

**7.8 Primersequenzen**

Aus Borca et al. (2008):

IL-1 $\beta$	<i>Forward-Primer:</i>	5'-AACGTGCAGTCTATGGAGT-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-GAACACCACTTCTCTCTTCA-3'
IL-6	<i>Forward-Primer:</i>	5'-CTGGCAGAAAACAACCTGAACC-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC-3'
IL-8	<i>Forward-Primer:</i>	5'-AAGCTTGTCAATGGAAAAGAG-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-CTGTTGTTGTTGCTTCTCAG-3'
TNF- $\alpha$	<i>Forward-Primer:</i>	5'-AACCTCAGATAAGCCCGTCCG-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-ACCACCAGCTGGTTGTCTTT-3'
IFN- $\beta$	<i>Forward-Primer:</i>	5'-AGTGCATCCTCCAAATCGCT-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-GCTCATGGAAAGAGCTGTGGT-3'

Aus Duvigneau et al. (2005):

$\beta$ -Aktin	<i>Forward-Primer:</i>	5'-CTCGATCATGAAGTGCGACGT-3'
	<i>Reverse-Primer:</i>	5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'

Primer für SAGE (aus MicroSAGE Detailed Protocol; Croix et al., 2000):

Linker 1 A:

5'-TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG-3'



Linker 1 B:

5'-TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC C[amino mod. C7]-3'

Linker 2 A:

5'-TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG-3'

Linker 2 B:

5'-TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG[amino mod. C7]-3'

Primer 1: 5'-GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA-3'

Primer 2: 5'-CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT-3'

## 7.9 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 2-1: Genomorganisation von Pestiviren. ....	4
Abb. 2-2: Aktuelle Ausbrüche der KSP aus dem Zeitraum Januar bis Juli 2009. ....	6
Abb. 2-3: Pathogenetische Mechanismen der hämorrhagischen Fieber am Beispiel einer Infektion mit dem Ebolavirus.....	18
Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Seriellen Analyse der Genexpression.....	20
Abb. 4-1: Replikation des hoch virulenten KSPV-Stamms CSF0382 auf PBMCs. ...	46
Abb. 4-2: Änderungen der IL-1 $\beta$ Genexpression in <i>in vitro</i> infizierten PBMCs. ....	47
Abb. 4-3: Änderungen der IL-6 Genexpression in <i>in vitro</i> infizierten PBMCs.....	49
Abb. 4-4: Änderungen der IL-8 und TNF- $\alpha$ Genexpression in <i>in vitro</i> infizierten PBMCs. ....	50
Abb. 4-5: Fieberkurve der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren (V2008/3).....	52
Abb. 4-6: Fieberkurve der Tiere, die mit dem moderat virulenten KSPV-Stamm CSF0864 infiziert waren (V2008/3).....	52
Abb. 4-7: Petechiale Blutungen in der Niere (Tier Nr. 233).....	53
Abb. 4-8: Änderungen der IL-8 Genexpression in <i>in vivo</i> infizierten PBMCs.....	54
Abb. 4-9: Fieberkurve der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren (V2009/2).....	56
Abb. 4-10: Leukozytenzahlen der Tiere, die mit dem hoch virulenten KSPV-Stamm CSF0382 infiziert waren. ....	57
Abb. 4-11: Änderungen der IL-8 Genexpression in <i>in vivo</i> infizierten PBMCs.....	58

## 7.10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Thermisches Profil für die Reverse Transkription.....	29
Tabelle 3-2: Verwendete Primer für das Gen $\beta$ -Aktin.....	29
Tabelle 3-3: Thermisches Profil der $\beta$ -Aktin PCR.....	30
Tabelle 3-4 Auswahl der Primer für die zu untersuchenden Zytokine.....	30
Tabelle 3-5: Verwendete positive Kontrollen für jede PCR.....	31
Tabelle 3-6 Thermisches Profil der real-time PCR für alle getesteten Zytokine.....	32
Tabelle 3-7 SAGE: Ansatz der cDNA-Synthese Teil 1.....	34
Tabelle 3-8: SAGE: Ansatz der cDNA-Synthese Teil 2.....	34
Tabelle 3-9: SAGE: Ansatz der Ligation der Linker an die cDNA-Fragmente.....	36
Tabelle 3-10: SAGE: Ansatz für die Amplifikation der <i>Ditags</i> mittels PCR.....	37
Tabelle 3-11: SAGE: Thermisches Profil für die Amplifikation der <i>Ditags</i> .....	38
Tabelle 3-12: SAGE: Ansatz für das 12 %ige Polyacrylamidgel zur Kontrolle der <i>Ditags</i> -Amplifikation.....	38
Tabelle 3-13: SAGE: Temperaturprofil der Kolonie-PCR.....	40
Tabelle 4-1: Gesamtzahl der <i>tags</i> in vier sequenzierten Bibliotheken.....	42
Tabelle 4-2: Kategorisierung ausgesuchter <i>tags</i> und deren analysierte Anzahl.....	42
Tabelle 4-3: N-fache Änderungen der Genexpression von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ bei PK15(A) und ST-Zellen.....	44

## 8 Wissenschaftliche Beiträge

1. A. Lange<sup>1</sup>, I. Greiser-Wilke<sup>1</sup>, S. Bendfeldt<sup>1</sup>, L. C. Miller<sup>2</sup>, J. D. Neill<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Virologie, Zentrum für Infektionskrankheiten, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, <sup>2</sup>*National Animal Disease Center*, ARS, USDA, Ames, Iowa.

*In vitro* and *in vivo* determination of cytokine gene expression profiles after infection with Classical swine fever virus. *New generation researchers in pig viral diseases: building bridges from labs to policy and the farm*. Madrid. Vortrag. Juli **2010**.

2. A. Lange<sup>1</sup>, I. Greiser-Wilke<sup>1</sup>, S. Bendfeldt<sup>1</sup>, L. C. Miller<sup>2</sup>, J. D. Neill<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Virologie, Zentrum für Infektionskrankheiten, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, <sup>2</sup>*National Animal Disease Center*, ARS, USDA, Ames, Iowa.

Determination of the Cytokine Gene Expression Profile after Infection of Porcine Cells with Classical swine fever virus. *8<sup>th</sup> International Congress of Veterinary Virology*. Budapest, Ungarn. Posterpräsentation. August **2009**.

3. A. Lange, I. Greiser-Wilke, S. Bendfeldt

Determination of Cytokine Gene Expression Profiles after Infection of Porcine Cells with Classical swine fever virus. *7<sup>th</sup> ESVV Pestivirus Symposium*. Uppsala, Schweden. Posterpräsentation. September **2008**.

4. J.D. Neill<sup>1</sup>, J.F. Ridpath<sup>1</sup>, A. Lange<sup>2</sup>, R.L. Zuerner<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Virus and Prion Diseases of Livestock Research Unit, National Animal Disease Center, USDA/ARS, Ames, Iowa, USA, <sup>2</sup> Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany, <sup>3</sup> Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, National Animal Disease Center, USDA/ARS, Ames, Iowa, USA.

Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection Alters Global Transcription Profiles in Bovine Endothelial Cells. *Dev. Biol.* 132: 93-8, **2008**.

5. A. Lange<sup>1,2</sup>, I. Greiser-Wilke<sup>1</sup>, S. Bendfeldt<sup>1</sup>, L. C. Miller<sup>2</sup>, J. D. Neill<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Virologie, Zentrum für Infektionskrankheiten, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, <sup>2</sup>*National Animal Disease Center*, ARS, USDA, Ames, Iowa.

Determination of the Cytokine Gene Expression Profile after Infection of PK-15 Porcine Cells with Classical swine fever virus. *Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD)*. Chicago, USA. Posterpräsentation. Dezember **2007**.

## 9 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name, Vorname: Lange, Anastasia  
Geburtsdatum und -ort: 25. Oktober 1981 in Lipezk/Russland  
Nationalität: deutsch

### **Hochschulausbildung**

10/2001 - 04/2002 Studium an der Universität Osnabrück, Fachbereich Biologie  
04/2002 - 08/2006 Studium an der Leibniz Universität Hannover, Fachbereich Biologie  
10/2006 Universitätsabschluss: Dipl.-Biol.  
Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie,  
Nebenfächer: Biochemie, Virologie  
2006 – 2010 Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover  
01/2007 - 12/2007 Auslandsaufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit:  
*National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA*

### **Schulbildung**

08/1989 - 07/1992 Grundschule Lüneburger Damm, Hannover  
08/1992 - 07/1994 Orientierungsstufe Nackenberger Straße, Hannover  
08/1994 - 06/2001 Gymnasium Schillerschule (Abitur), Hannover

---

## 10 Danksagung

*Wie sagt man „Dankeschön“, wenn man so vielen Menschen zu danken hat?*

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. I. Greiser-Wilke für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche und engagierte Betreuung der Arbeit sowie die stets fachliche Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. V. Moennig danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Virologie. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Koreferats.

Zu den Menschen, die mir darüber hinaus mit Rat und Tat zur Seite standen, gehört Prof. Dr. B. Grummer. Besonders für die konstruktiven Vorschläge für die Überarbeitung dieser Arbeit und die fachliche Diskussion danke ich ihr.

Ich danke Dr. J. D. Neill dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, einen Teil dieser Doktorarbeit in Ames, Iowa bearbeiten zu können.

Für die Unterstützung während meines USA-Aufenthaltes danke ich Frau Dr. Stefanie Bendfeldt.

Ein großes Dankeschön gilt auch Holger Mosch für seine Hilfe in allen computertechnischen Angelegenheiten.

Weiterhin ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Günter Thiem und Monika Berg für den hervorragenden Einsatz bei den Tierversuchen.

Ich danke Denise Henrych, Inga Grotha, Dr. Alexandra Meindl-Böhmer und Stefanie Schmeiser für die wertvolle Hilfe, die moralische Unterstützung und die zahlreichen aufmunternden Worte.

Katrin Pannhorst, Christine Bächlein, Hanna Gerss-Dülmer, Markus Hoffmann, Ester Barthel (danke für die „Fahrdienste“), Gabriele Müller, Karin Ruthenberg, Brigitte Bianco und allen MitarbeiterInnen des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die vielen schönen Momente.

Ganz besonders danke ich Anna Trincone für ihre Freundschaft und ihren motivierenden Zuspruch.

Meiner Familie und vor allem meinem Freund Sebastian gilt es abschließend ebenfalls ein großes Dankeschön auszusprechen. Mit ihrer Ruhe, Ausdauer und Geduld haben sie mir stets zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgemuntert, wenn die Arbeit nur schleppend voranging.