

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Armin Saalmüller)
Fach: Virologie
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. vet. med. Till Rümenapf

**„Veränderung der SLA-I Expression auf porzinen Zellen nach Infektion
mit dem klassischen Schweinepestvirus und dem Porzinen Reproduktiven
und Respiratorischen Syndrom Virus“**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Isabelle Zickler

Wien, im Dezember 2019

Betreuer und Begutachter

Univ. Prof. Dr. vet. med. Till Rümenapf

Leiter des Institutes für Virologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

1 Inhaltsverzeichnis

<u>2</u> Abkürzungsverzeichnis	4
<u>3</u> Einleitung	6
<u>4</u> Literaturübersicht	7
4.1 Das Virus der Klassischen Schweinepest.....	7
4.1.1. Taxonomische Zuordnung und Eigenschaften	7
4.1.1.1. Die Familie <i>Flaviridae</i>	7
4.1.1.2. Das Genus Pestivirus.....	9
4.1.2. Struktur des Pestivirus	10
4.1.3. Durch Pestiviren hervorgerufene Krankheiten.....	12
4.1.3.1. Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease.....	12
4.1.3.2. Die klassische Schweinepest.....	13
4.2 Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV).....	15
4.2.1. Taxonomische Zuordnung und Eigenschaften.....	15
4.2.2. Struktur des PRRSV.....	15
4.2.3. Krankheitsbild des PRRSV	16
4.3. Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....	18
4.3.1. Einteilung und Struktur der MHC- Klassen.....	18
4.3.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex-I beim Menschen.....	20
4.3.3. Der Schweine-Leukozyten-Antigen-Komplex (SLA).....	21
<u>5</u> Material und Methoden.....	24
5.1. Material.....	24
5.1.1. Verbrauchsmaterialien	24
5.1.2. Medien, Puffer, Lösungen und Chemikalien.....	24

5.1.3. Antikörper.....	25
5.1.3.1. primäre Antikörper.....	25
5.1.3.2. sekundäre Antikörper.....	25
5.1.4. Kits.....	25
5.1.5. Geräte.....	25
5.1.6 Virusstämme.....	26
5.1.7 Eukaryotische Zellen.....	26
5.2 Methoden.....	27
5.2.1 Zellkultur.....	27
5.2.1.1. Kultivierung von SK-6 Zellen.....	27
5.2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	27
5.2.2 Infektion und Inkubation von SK-6 Zellen.....	28
5.2.3. Gewinnung und Infektion von porzinen, primären Alveolarmakrophagen.....	28
5.2.4. Antikörpermarkierung der SK-6 Zellen.....	29
5.2.5. Antikörpermarkierung der porzinen primären Alveolarmakrophagen.....	30
5.2.6. Messung im <i>AMNIS flow</i> Durchflusszytometer.....	31
<u>6 Ergebnisse.....</u>	32
6.1. Veränderung der SLA-I Expression auf porzinen Zellen nach Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus.....	32
6.2 Veränderung der SLA-I Expression auf porzinen Zellen nach Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus zu verschiedenen Zeitpunkten.....	34
6.3. Vergleich der möglichen Herunterregulierung der Oberflächenexpression von SLA-I durch PRRSV und KSPV in porzinen primären Alveolarmakrophagen.....	36
<u>7 Diskussion.....</u>	39
7.2. Nutzen der Arbeit.....	39
7.3. Expressionssystem des KSPV.....	39

7.4. Infektion von primären Zellen mit dem Virus der klassischen Schweinepest.....	40
7.5. Schwierigkeiten bei der Umsetzung der Experimente.....	41
<u>8 Zusammenfassung.....</u>	43
<u>9 Summary.....</u>	44
<u>10 Abbildungsverzeichnis</u>	45
<u>11 Literaturverzeichnis</u>	46

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
BD	Border Disease
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
°C	Grad Celsius
CSFV	Classical Swine Fever Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESP	Europäische Schweinepest
Fa	Firma
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
GFP	grünfluoreszierendes Markergen
GP	Glykoproteine
h	Stunden
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFT	Immunfluoreszenztest
Kb	Kilobase
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Klassisches Schweinepestvirus
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	Mucosal Disease

MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MSD	mystery swine disease
nm	Nanometer
ORF	Open reading frame
PAMs	Porzine primäre Alveolarmakrophagen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
p.i.	post infectionem
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
PRRSV	das Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom Virus
SK-6	„Swine Kidney 6“
SLA	swine leukocyte antigen
ssRNA	„single stranded Ribonucleinacid“, einzelsträngige Ribonukleinsäure
TCID50	50% Tissue Culture Infective Dose, Infektion in 50% der Zellkultur
ZNS	Zentralnervensystem

3 Einleitung

An der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen werden Moleküle, die im sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex-I kodiert sind, exprimiert, um das Immunsystem vor viral infizierten Zellen zu warnen. Diese können antigene Peptide präsentieren, welche wiederum von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und vernichtet werden können (Hewitt 2003).

In der Literatur lässt sich der Nachweis finden, dass es Viren gibt, bei denen eine Herunterregulierung der Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I) Expression stattfindet, um diesen Mechanismus zu hemmen.

In einer 2008 von der „*Mississippi State*“ Universität durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe Virus zu einer Veränderung der Expressionsrate von MHC-I und MHC-II führt. Neun der untersuchten MHC-I Moleküle wurden dabei herunterreguliert (Sang-Ryul Lee et al. 2008).

Eine andere Forschungsgruppe zeigte, dass auch das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus die Expression von MHC-I und MHC-II herunterreguliert (Wang et al. 2010).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass eine Infektion der Zelllinie SK-6 („Swine Kidney 6“) mit dem Virus der klassischen Schweinepest nicht zu einer Herunterregulierung der Oberflächenexpression von MHC-I (SLA-I) führt.

Des Weiteren wurden Experimente durchgeführt, bei denen primäre Alveolarmakrophagen mit dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus, sowie dem klassischen Schweinepestvirus infiziert wurden, um diese Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Es sollte gezeigt werden, dass das Protokoll, welches für die Infektion, Färbung und Auswertung der SK-6 Zellen auch auf primäre Zellen anwendbar ist.

4 Literaturübersicht

4.1 Das Virus der Klassischen Schweinepest

4.1.1. Taxonomische Zuordnung und Eigenschaften

Entsprechend des Gremiums des „International Committee on Taxonomy of Viruses“ werden Viren der Vertebrata, Invertebrata, Insecta und Plantae je nach chemischen, morphologischen und biologischen Eigenschaften klassifiziert. Jene Liste der klassifizierten Viren wird laufend vervollständigt. Bei der virologischen Systematik werden Ordnungen in Familien, Familien in Subfamilien, diese in Genera und jene schließlich in Spezies aufgeteilt. Ausschlaggebend für die erste Zuordnung sind die Nukleinsäure (DNA oder RNA), deren Struktur (z.B. einzel-, oder doppelsträngig) und die Polarität (positiv oder negativ). Für die genauere Einteilung in Familien werden beispielsweise Merkmale wie die Genomstruktur, der Nukleinsäuretyp und die Symmetrie des Viruskapsids herangezogen. Viren mit ähnlichen serologisch-immunologischen Beziehungen und pH-Stabilität werden einem Genus zugeordnet. Einzelne Spezies unterscheiden sich unter anderem schließlich in Genomsequenzen, Virulenzfaktoren, Wirts- und Zellspezifität, zellpathogenen Eigenschaften und Krankheitsspektrum (ICTV 2017, Büttner 2007).

4.1.1.1. Die Familie *Flaviridae*

Das Virus der klassischen Schweinepest gehört zur Familie der *Flaviridae*. Abgeleitet wurde der Name vom menschlichen Gelbfieber („flavus“= gelb). Da sie morphologische Ähnlichkeiten aufweisen, wurden sie bis 1985 den *Togaviridae* zugeordnet (Mayr und Kaaden 2007).

Es handelt sich um behüllte Viren, welche eine Größe zwischen 40-60 nm aufweisen. Außen befindet sich eine Lipiddoppelschicht, mit zwei oder mehreren Arten von Membran-assoziierten Proteinen („E“, „envelope glycoproteins“). Das Innere bildet ein Nukleokapsid, welches aus Kapsidproteinen („C“, „capsid proteins“) und einem RNA Genom besteht (Lindenbach et al. 2007, Simmonds et al. 2017).

Alle Spezies innerhalb der Familie *Flaviridae* besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität (+ssRNA) (Simmonds et al. 2017, Mayr und Kaaden 2007). Die Größe der

Genome umfasst eine Länge von 9,6 (*Hepaciviridae*) - 12,3 (*Pestiviridae*) Kilobasenpaaren (kb) (Lindenbach et al. 2007, Thiel et al. 2005).

Die Infektion der Zielzellen wird durch die Strukturproteine der Virionen über spezifische Zellwandrezeptoren initiiert. Nach Endozytose und der damit verbundenen Aufnahme in die Zielzelle, erfolgt die pH-abhängige Bindung der Virushülle an die Zellmembran und die ssRNA wird in das Zytoplasma freigesetzt. Die RNA der Flaviviren synthetisiert ein Polyprotein innerhalb der Zelle, welches anschließend kleinere Virusstrukturproteine aufspalten kann. Jene Aufspaltung des Polyproteins kann zellulär, aber auch durch virale Proteasen erfolgen (Lindenbach et al. 2007, Thiel et al. 2005). Durch diesen Vorgang wird zur Herstellung viraler Proteine nur messenger RNA (mRNA) benötigt. Die Replikationsenzyme setzen sich aus einer RNA-Helikase, einer Serinprotease und einer RNA-Polymerase zusammen. Nach der Knospenbildung mit Hilfe von intrazellulären Membranen, erfolgt die Freisetzung der Viruspartikel an der Zelloberfläche mittels Exozytose. Im N-terminalen Abschnitt des Virions befinden sich die Strukturproteine, den restlichen Anteil bilden die Nichtstrukturproteine (Lindenbach et al. 2007, Simmonds et al. 2017).

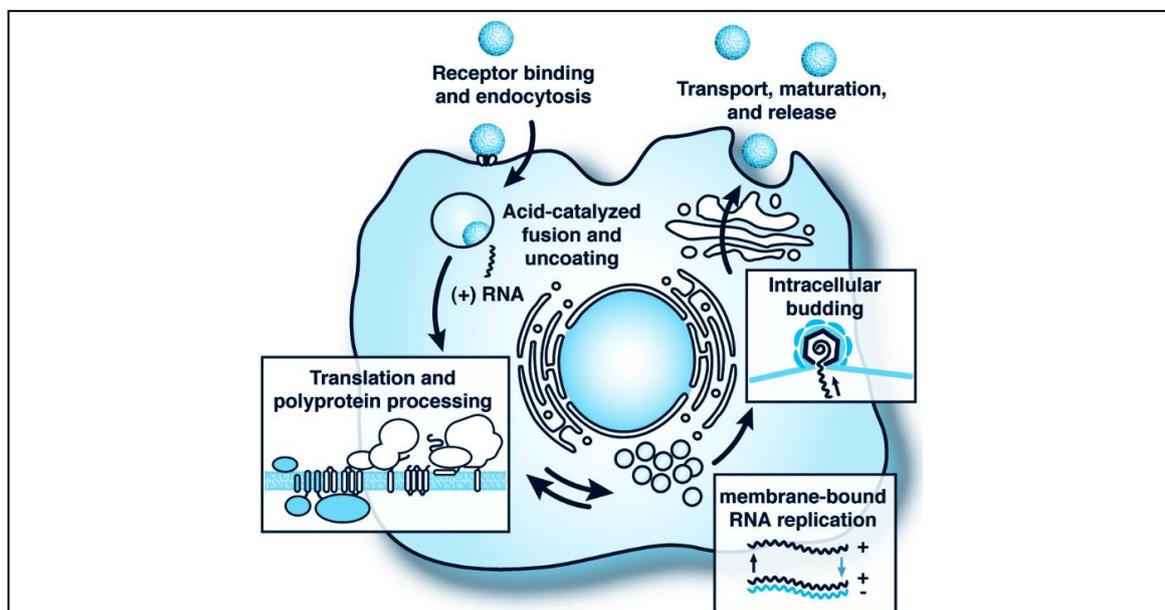


Abb. 1: Replikationszyklus der Familie Flaviridae

- 1) Rezeptorvermittelte Endozytose
- 2) pH-abhängige Membranfusion und Kapsidfreisetzung
- 3) Translation und Polyprotein Prozessierung
- 4) RNA Synthese
- 5) "Budding" in das endoplasmatische Retikulum (ER)
- 6) Exozytose via Golgi Vesikel

(Quelle: Lindenbach et al. 2007)

Innerhalb der Familie unterscheidet man zwischen den Genera Pestivirus, Flavivirus, Hepacivirus und Pegivirus. Insgesamt umfassen die *Flaviridae* 89 Spezies (Simmonds et al. 2017).

Die meisten Spezies des Genus *Flavivirus*, früher auch Arbo-B-Virus genannt, werden durch Zecken oder Stechmücken übertragen. Für gewöhnlich sind Säugetiere und Vögel die Primärwirte. Der Genus umfasst 53 Spezies, von denen viele human- und tierpathogen sind. Dazu zählen unter anderem das Gelbfieberevirus, das Zikavirus, das Dengue Virus, das Japanenzephalitisvirus, das Louping-ill Virus, das West Nile Virus und das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) (Simmonds et al. 2017, Mayr und Kaaden 2007).

Zur Subfamilie der Hepaciviren gehört das humanpathogene Hepatitis C Virus (HCV), das chronische Leberschäden verursacht. Es sind noch weitere Viren dieses Genus bekannt, die Pferde, Fledermäuse, Nagetiere, Rinder und Primaten infizieren können (Simmonds et al. 2017).

Pegiviren infizieren eine große Bandbreite von Säugetieren (Mensch, Schwein, Fledermäuse, Pferde, Nagetiere), jedoch konnten sie bis dato mit keiner Krankheit assoziiert werden (Simmonds et al. 2017).

4.1.1.2. Das Genus Pestivirus

Neben Hepaciviren, Flaviviren und Pegiviren, zählen auch Pestiviren zu den Vertretern der Familie *Flaviridae*. An diesem Genus erkranken vor allem Schweine, Rinder, Schafe und Ziegen (Simmonds et al. 2017). Bei wilden Wiederkäuern wie Antilopen, Giraffen, Hirschen und Kamelen wurden Viren der *Pestiviridae* nachgewiesen (Avalos-Ramirez et al. 2001). Auch Ratten und Fledermäuse können sich mit Pestiviren infizieren, jedoch wurde bisher keine Pathogenität festgestellt (Wu et al. 2012, Firth et al. 2014).

Die wichtigsten pestiviralen Krankheiten sind die klassische Schweinepest und die Bovine Virusdiarrhoe (Lindenbach et al. 2007). Tiere infizieren sich hauptsächlich über infektiöse Sekrete wie Speichel, Urin oder Faeces. Der Übertragungsweg kann aber auch diaplazentar, kongenital oder indirekt über verschmutzte Fahrzeuge und Instrumente erfolgen (Dahle et al. 1992, Ribbens et al. 2004).

Bei Pestiviren gibt es sowohl zytopathogene (cp), als auch nicht zytopathogene (ncp) Stämme. Während Erstere die Zielzellen zerstören, vermehren sich ncp Isolate im Infektionsverlauf, ohne die Wirtszellen morphologisch zu beschädigen (Nettleton und Entrican 1995).

4.1.2. Struktur des Pestivirus

Die behüllten Virionen des Genus Pestivirus weisen einen Durchmesser von 30-50 nm und eine ikosaedrale Symmetrie auf. Pestiviren sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, wodurch sie durch Hitze, Tenside und organische Lösungsmittel leicht zu inaktivieren sind (Rümenapf et al. 1991, Rümenapf et al. 2008). Im Gegensatz zu anderen Genera der Familie *Flaviridae*, sind Pestiviren widerstandsfähig gegen niedrige pH-Werte (Krey et al. 2005, Rümenapf et al. 2008).

In ihrer Genomstruktur weisen die nicht segmentierten Pestiviren eine Größe von 12 kB auf und haben eine ssRNA positiver Polarität. Die virale RNA hat, wie bei allen Flaviviren, eine 5'-3' Orientierung und besitzt nur einen open reading frame (ORF) von etwa 4000 Codons, welcher ein Polyprotein kodiert (Nettleton und Entrican 1995, Rümenapf et al. 2008).

Das Virion des Pestivirus besteht aus einem Kapsidprotein und den drei Oberflächenproteinen Erns, E1 und E2. Letzteres stellt das Hauptantigen dar und ist besonders wichtig für die Replikation und Infektion der Wirtszellen (König et al. 1995, Rümenapf et al. 2008). Die Translokation jener Proteine in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) erfolgt durch eine interne Signalsequenz am N-Terminus des Erns. Zusätzlich zu den vier Strukturproteinen besitzen Pestiviren acht Nichtstrukturproteine: Npro, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Rümenapf et al. 1993, Thiel et al. 1991).

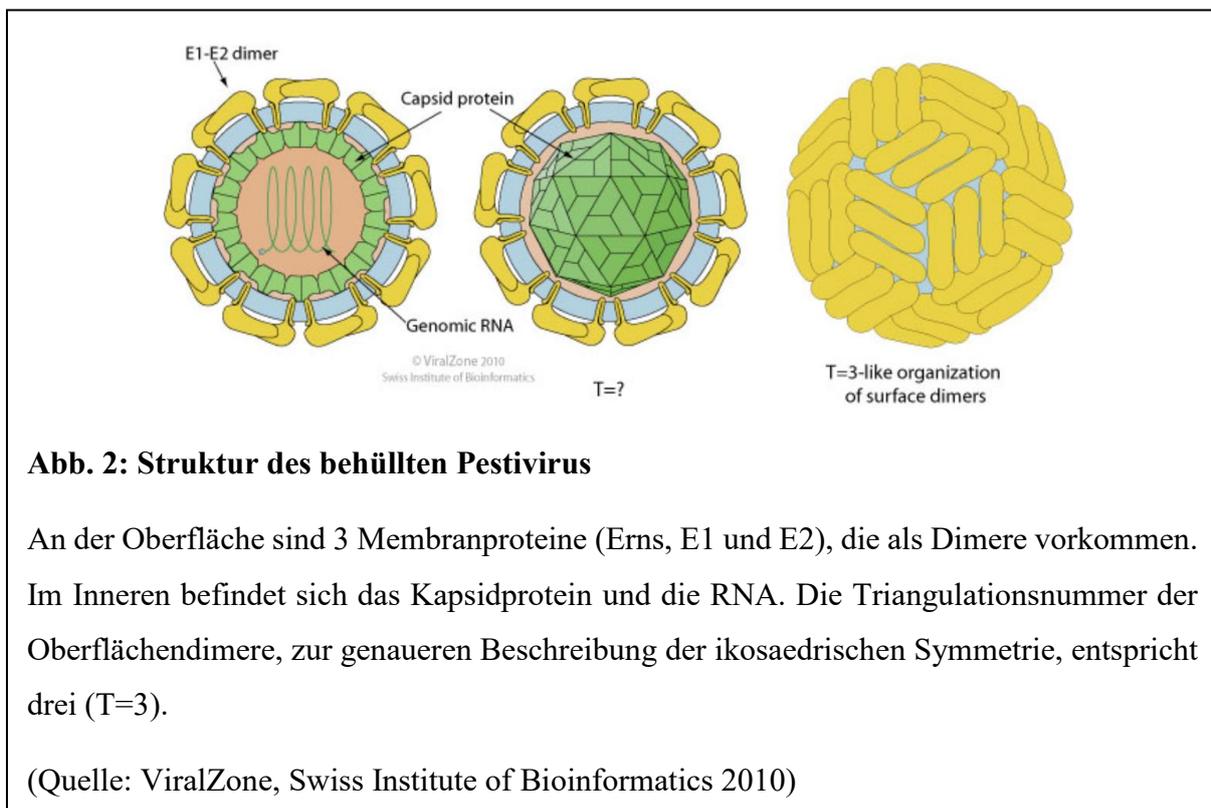
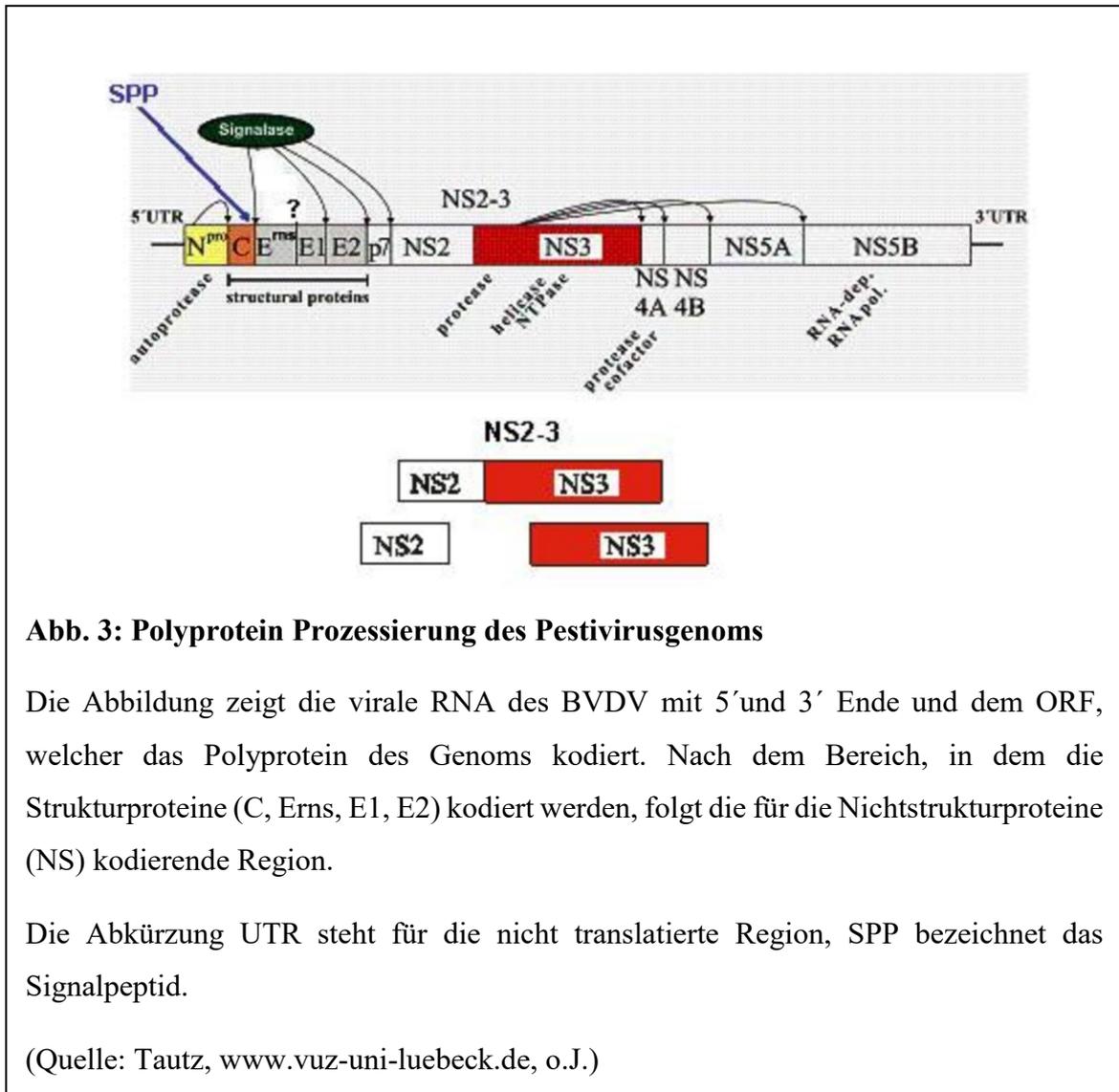


Abb. 2: Struktur des behüllten Pestivirus

An der Oberfläche sind 3 Membranproteine (Erns, E1 und E2), die als Dimere vorkommen. Im Inneren befindet sich das Kapsidprotein und die RNA. Die Triangulationsnummer der Oberflächendimere, zur genaueren Beschreibung der ikosaedrischen Symmetrie, entspricht drei (T=3).

(Quelle: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics 2010)



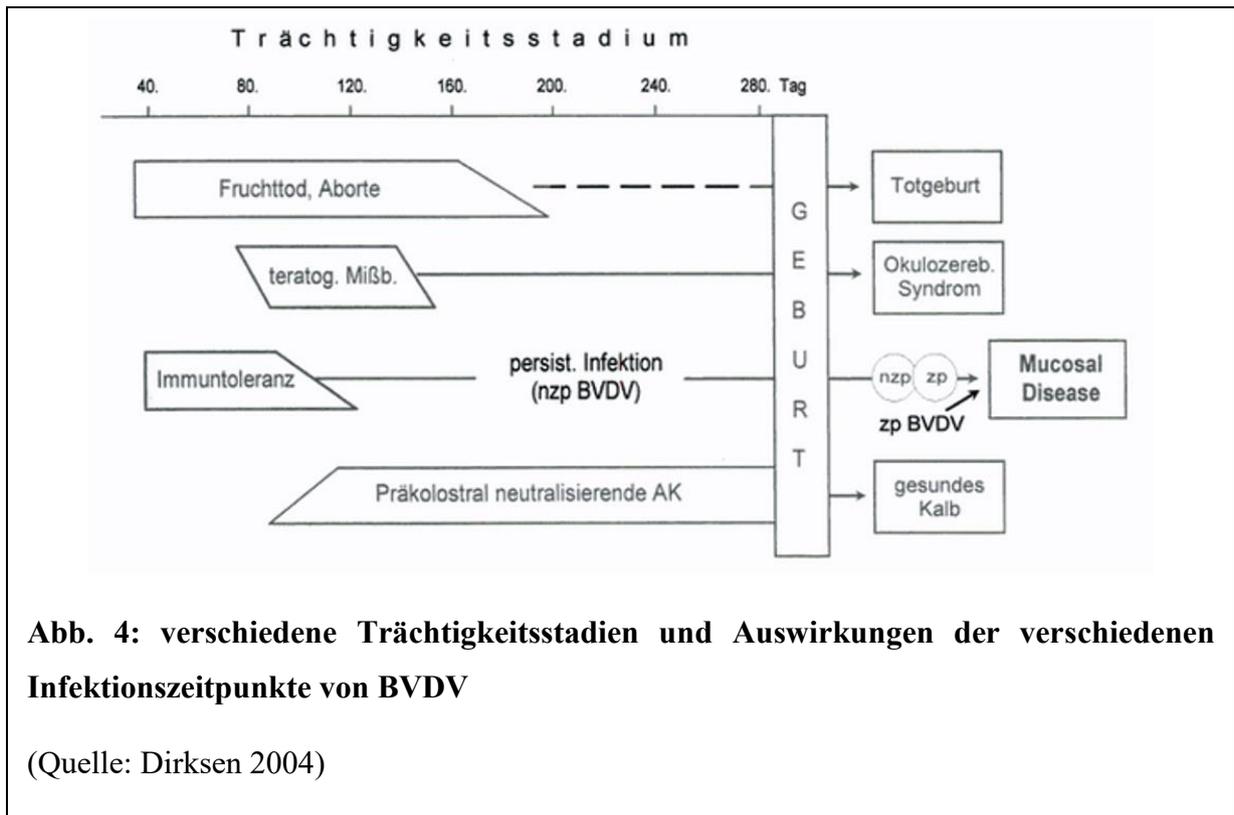
4.1.3. Durch Pestiviren hervorgerufene Krankheiten

Die wichtigsten Vertreter des Genus Pestivirus sind das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV, „Classical Swine Fever Virus“ (CSFV)) und das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV), Genotyp BVDV-1 und BVDV-2, da sie wirtschaftlich von großer Bedeutung sind (Avalos-Ramirez et al. 2001, Lindenbach et al. 2007).

4.1.3.1. Die Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease

Je nach Genotyp, Tier und Gesundheitsstatus werden bei der durch das bovine Virusdiarrhoe Virus hervorgerufenen Krankheit zwei unterschiedliche Krankheitsbilder differenziert. Wenn sich ein immunkompetenter Wiederkäuer mit BVDV infiziert, erfolgt der Verlauf meist mild oder subklinisch. Diarrhoe, Fieber, Sekundärinfektionen und Hämorrhagien sind möglich. Diese Form ist unter dem Namen Bovine Virusdiarrhoe (BVD) bekannt. Nach der Infektion kommt es zu einer vollständigen Viruselimination und Immunität. Die zweite Grundform entsteht durch eine Infektion *in utero*, welche je nach Trächtigkeitsstadium zu Abort, Missbildungen oder persistent-virämischen Kälbern führen kann. Jene Kälber bilden das wichtigste BVDV Reservoir und können zeitlebens an der Mucosal Disease (MD) erkranken, welche stets tödlich verläuft (Lanyon et al. 2013).

Der Nachweis des BVDV erfolgt anhand von Virusisolation in bovinen Zellkulturen, Antigennachweis mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder PCR. Um den Infektionszyklus zu unterbinden, sollten persistent infizierte Tiere ausgemerzt werden und prophylaktische Maßnahmen ergriffen werden (Moennig 2003).



4.1.3.2. Die klassische Schweinepest

Die klassische Schweinepest, auch Europäische Schweinepest (ESP) genannt, ist eine hochkontagiöse und fieberhafte Allgemeinerkrankung, die weltweit vorkommt und Haus- und Wildschweine infiziert (Edwards et al. 2000).

Die Übertragung der klassischen Schweinepest erfolgt sowohl vertikal, als auch horizontal. Die Einschleppung in den Betrieb erfolgt hauptsächlich durch Einbringung infizierter Tiere in den gesunden Bestand, sowie indirekt durch Verfütterung kontaminierter und ungenügend erhitzter Speise- oder Schlachtabfälle. Indirekte Übertragung durch mangelnde Hygiene (z.B. verunreinigte Fahrzeuge) haben bei der Verbreitung der ESP in Europa eine wichtige Rolle gespielt (Blome 2017). Aber auch Kontakte zu endemisch KSPV infizierten Wildschweinen waren bedeutsam. Im Zeitraum von 1993-1998 waren 59% der in der kommerziellen Schweinehaltung auftretenden primären Ausbrüche auf direkten oder indirekten Kontakt zu Wildschweinen beziehungsweise deren Fleisch zurückzuführen (Fritzemeier et al. 2000).

Zunächst findet die Sekretaufnahme (Speichel, Nasen-, Augensekret, Milch, Harn, Sperma, Kot) und anschließend die Vermehrungsphase im lymphoretikulären Gewebe, erst in den Tonsillen und in der Folge in den regionalen Lymphknoten statt. Anschließend kommt es zur virämischen Phase, an die sich die Organphase anschließt. Die variierende Erregervirulenz und die unterschiedliche Vitalität der Wirte haben Einfluss auf die klinische Manifestation (Blome 2017).

Die Verlaufsformen können von perakut bis chronisch ausfallen und unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. Akut an KSPV erkrankte Tiere zeigen in den ersten drei Wochen häufig zuerst unspezifische Anzeichen wie hohes Fieber, Apathie, Inappetenz, Konjunktivitis sowie gastrointestinale und respiratorische Symptome. Nach zwei bis vier Wochen kann es zu typischer ZNS-Symptomatik wie Ataxie, Paresen, aber auch zu Zyanosen aufgrund einer Kreislaufschwäche und petechialen Blutungen kommen. Auch Pneumonien und Enteritis können als sekundäre Infektionen auftreten (Blome 2017).

Bei der chronischen Form der klassischen Schweinepest kommt es nach einer Inkubationszeit von bis zu einem Monat zu unspezifischen Symptomen, die unter anderem Fieber, Apathie, Kümern, Hautentzündungen und respiratorische Symptome umfassen können. Wie auch bei der akuten Form können sekundäre Infektionen wie Pneumonien und Enteritiden auftreten (Blome 2017).

Pathologisch lassen sich häufig Milzinfarkte, marmorierte Lymphknoten und Petechien an Haut, Trachea, Nieren, Epiglottis, Epikard und Lunge feststellen. Des Weiteren sind diphteroid- nekrotisierende Enteritiden, Gallenblasenödeme, Aszites und Lungenentzündungen durch Sekundärinfektionen möglich (Blome 2017).

Differentialdiagnostisch kommen unter anderem die Afrikanische Schweinepest (ASP), die Ödemkrankheit, Schweinerotlauf und bakterielle Septikämien in Frage. Da die Symptome jedoch weitreichend und vor allem beim chronischen Verlauf sehr unspezifisch sind, sollte man bei einer akut verlaufenden Infektionskrankheit immer auch an KSP denken (Eich und Schmidt 2000).

Der Nachweis der ESP kann direkt oder indirekt erfolgen. Der direkte Nachweis aus Sekreten oder EDTA-Blut erfolgt mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR) (Blome 2017). Indirekte, serologische Verfahren wie zum Beispiel kommerziell erhältliche Antigen ELISAs dienen hauptsächlich der Überprüfung des gesundheitlichen Herdenstatus (Liess 2003).

Da es sich bei der klassischen Schweinepest um eine anzeigepflichtige Tierseuche handelt, muss im Fall eines Seuchenverdachtes unverzüglich ein/e Amtsveterinär/in benachrichtigt werden (Tierseuchengesetz, Fassung vom 27.05.2019). In Österreich ist eine Impfung bzw. eine Therapie verboten, seuchenverdächtige und infizierte Tiere werden ausgemerzt. Es müssen Schutz- und Überwachungszonen errichtet sowie umfassende epidemiologische Untersuchungen eingeleitet werden (Schweinepestverordnung 2003).

4.2 Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV)

4.2.1. Taxonomische Zuordnung und Eigenschaften

Das PRRSV zählt zur Ordnung der *Nidovirales* und zur Familie der *Arteriviridae*, deren Name sich von der viralen equinen Arteritis ableitet (Kuhn et al. 2016, Mayr und Kaaden 2007).

Innerhalb der Familie unterscheidet man fünf Genera: *Dipartevirus*, *Equartevirus*, *Nesartevirus*, *Rodartevirus* und *Simartevirus*. Zu den bedeutendsten Erregern zählen das equine Arteritisvirus (EAV), das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV), das lactatdehydrogenase-induzierende Virus der Maus (LaDV-1 und LaDV-2), das Simian-Hämorrhagische Fiebervirus (SHFV) bei Affen und das „wobbly possum disease virus“ (WPDV) bei Fuchskusus (Kuhn et al. 2016).

Der durch das PRRS Virus hervorgerufene Spätabort der Schweine trat erstmals 1987 in den USA und 1990 in Europa auf (Modrow et al. 2010).

Das Porzine Reproductive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) umfasst zwei Spezies, das *Suid 1 rodartevirus* (PRRSV-1, Europäischer/Lelystad Typ) und das *Suid 2 rodartevirus* (PRRSV-2, Nordamerikanischer Typ) (Kuhn et al. 2016).

4.2.2. Struktur des PRRSV

Es handelt sich um behüllte Viren mit einer Größe von 60 nm (Faaberg et al. 2011). Die ikosahedralen Virionen haben eine nicht segmentierte ssRNA mit positiver Polarität und einer Größe von circa 15 kb (Ackermann 2013). Im Inneren weisen die Virionen ein helikales Nukleokapsid auf, in der Peripherie befindet sich eine Lipiddoppelmembran, an deren Oberfläche sich ringförmige Strukturen befinden (Modrow et al. 2010).

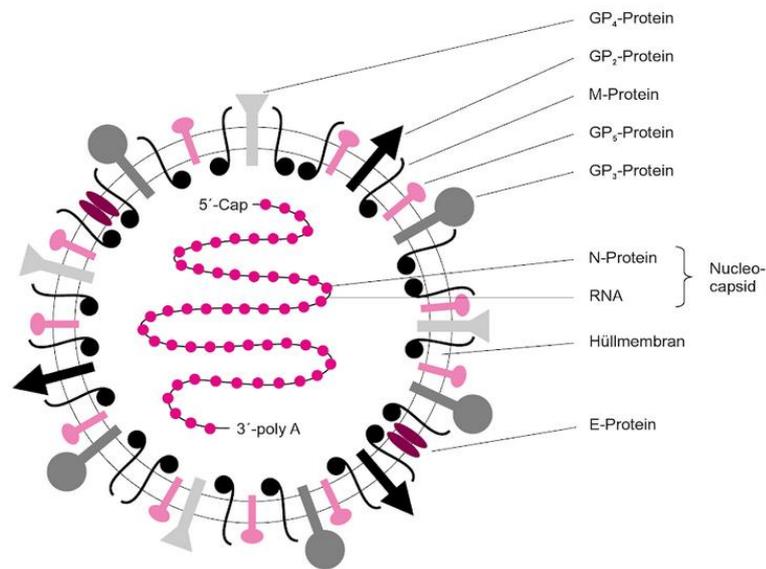


Abb. 5: Aufbau des PRRS- Virus

Gezeigt wird das Innere des Virions mit der helikalen Nukleokapsidstruktur. Des Weiteren sieht man das M-Protein und die vier Glykoproteine (GP), welche in einer Membranhülle liegen, die das Virus umgibt.

(Quelle: Modrow et al. 2010)

4.2.3. Krankheitsbild des PRRSV

Das Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom (PRRS), auch seuchenhafter Spätabort der Schweine (SSS) genannt, ist eine durch das PRRS Virus verursachte Krankheit, die in der Mitte der 1980er Jahre das erste Mal unter dem Namen *mystery swine disease* (MSD) auftrat (Kaaden 2003, Zimmerman et al. 1997). Die in 1990 erstmals in Deutschland gemeldete Seuche verursacht vor allem Gravitations- und Fertilitätsstörungen, die je nach Infektionszeitpunkt in der Trächtigkeit der Sauen zu Totgeburten, Aborten oder lebensschwachen Ferkeln führen (Eich et al. 2000).

Die Symptome der erkrankten Sauen können stark variieren, in etwa 5% der Fälle treten Zyanosen an Ohren und Vulva, Fieber oder Untertemperatur und Fressunlust auf (Heinritzi 2006, Sinn et al. 2016).

Werden Mastschweine mit dem Lelystad Virus infiziert, zeigen diese eine interstitielle Pneumonie, da das Virus sich hauptsächlich in den Lungenmakrophagen repliziert (Wensvoort et al. 1991).

Die Verbreitung des Virus erfolgt indirekt, direkt und über die Luft. Ausgeschieden wird es über alle Sekrete und Exkrete, Sperma, Abort- und Nachgeburtmaterial (Eich et al. 2000).

Um die klinische Verdachtsdiagnose zu bestätigen, kann eine RT-PCR durchgeführt werden. Auch histologische Färbemethoden und Virusisolation von infizierten primären porzinen Alveolarmakrophagen aus PRRSV-freien Schweinen sind möglich. PRRSV-Antikörper können mit dem ELISA analysiert werden (Sinn et al. 2016).

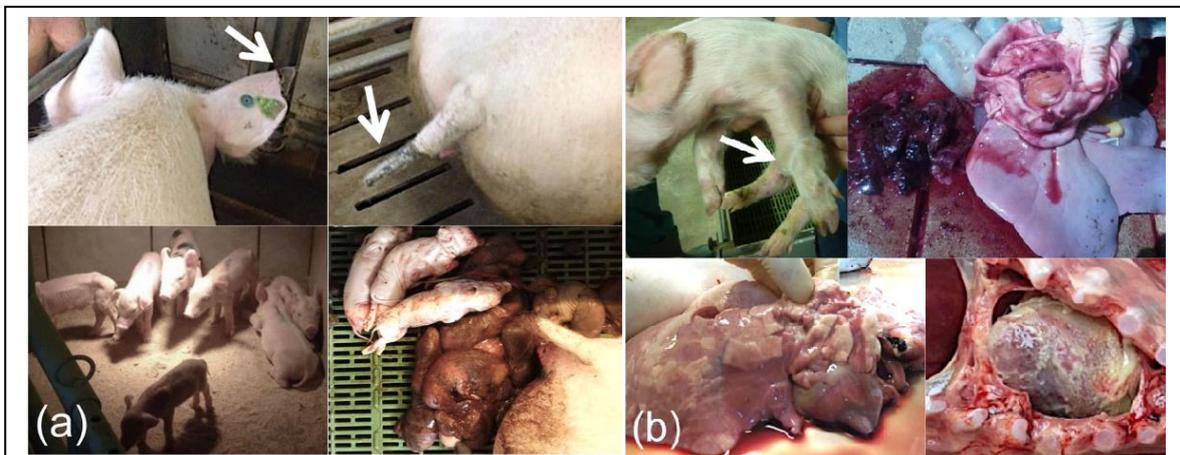


Abb. 6: Klinische Erscheinung des PRRSV in a) Sauen und b) Ferkel

Sauen zeigen Zyanosen an Ohren und Schwanz; Es werden tote oder lebensschwache Ferkel geboren

Ferkel, die noch gesäugt werden, zeigen unter anderem Gastritis, Magenulzerationen, Pneumonien, Perikarditis und geschwollene Gelenke

(Quelle: Sinn et al. 2016)

4.3. Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Es bestehen deutliche Unterschiede in der Antigenerkennung durch T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren und Antikörper. T-Zellen, die ein Teil des adaptiven Immunsystems sind, können, im Gegensatz zu Immunglobulinen, nur fremde Antigene erkennen, sofern diese an der Zelloberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Der Haupthistokompatibilitätskomplex, auch „major histocompatibility complex“ (MHC) genannt, ist eine Gengruppe, die Membranglykoproteine, sogenannte MHC-Moleküle, welche für die Oberflächenpräsentation der Antigene verantwortlich sind, kodiert. Jene Moleküle binden Peptide von Krankheitserregern, z.B. Viren, intrazelluläre Bakterien oder Pathogene, die aufgenommen wurden und wandern anschließend an die Zelloberfläche, wo sie präsentiert werden. T-Zell-Rezeptoren können Antigene aus infizierten Zellen nur erkennen, wenn sie aus einem MHC-Molekül und einem fremden Peptidantigen zusammengesetzt sind. Diese Tatsache wird als MHC-Restriktion bezeichnet (Murphy et al. 2009, Tizard 2013).

4.3.1. Einteilung und Struktur der MHC- Klassen

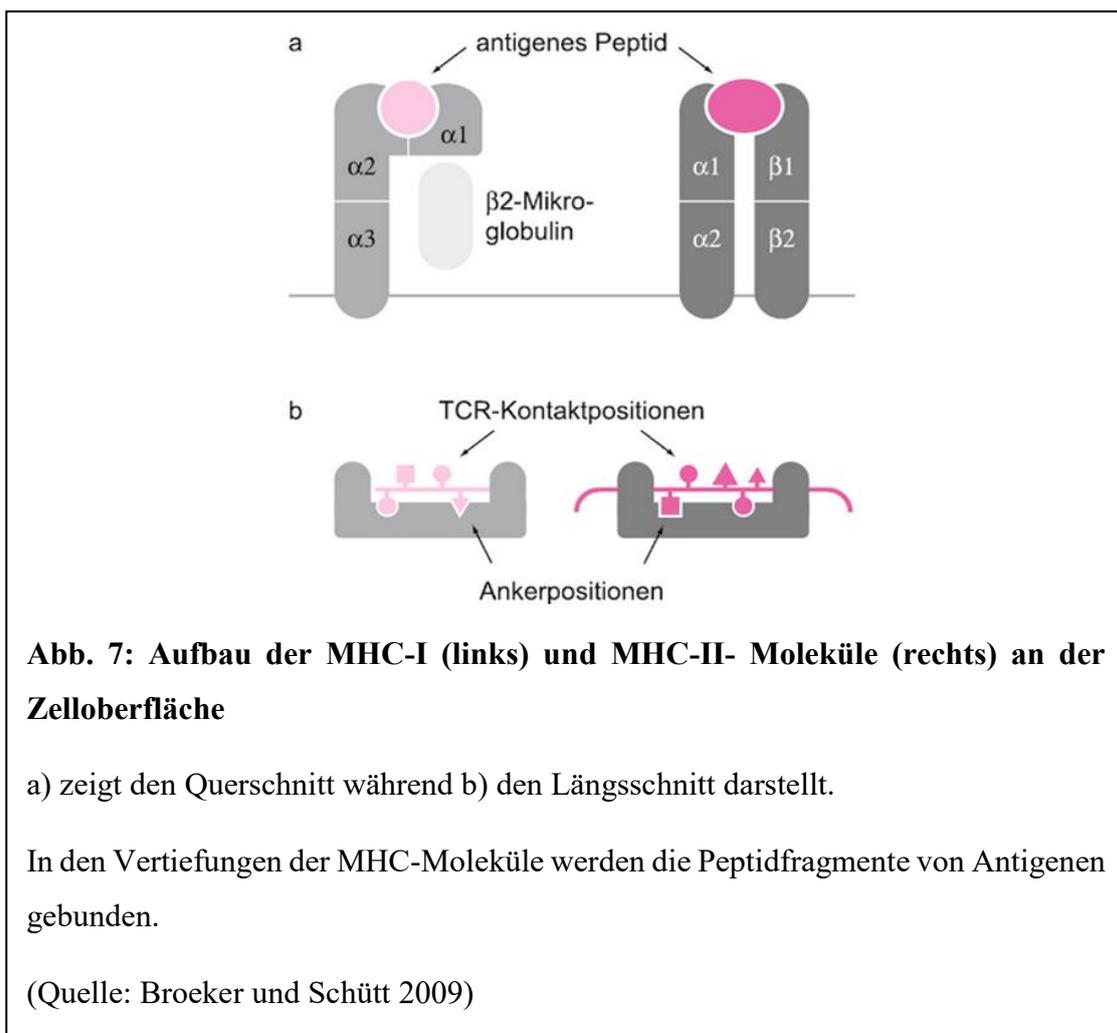
Aufgrund ihrer Funktion und ihrer unterschiedlichen Strukturierung, lassen sich bei den Haupthistokompatibilitätskomplexen drei Klassen unterscheiden: der MHC-I, der MHC-II und der MHC-III (Tizard 2013).

Der bedeutendste Unterschied zwischen der MHC- Klasse I und der MHC-Klasse II sind die an der Zelloberfläche präsentierten Peptide. Während die MHC-Klasse I Peptide sichtbar macht, die beim Abbau intrazellulärer Proteine entstehen, werden auf MHC-Klasse II Komplexen Peptide präsentiert, die von extrazelluläre Proteinen abstammen. Jene Peptide werden zum Beispiel durch unspezifische Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen (Murphy et al. 2009, Rock et al. 2016, Wieczorek et al. 2017).

Beide Klassen besitzen eine β -Faltblattstruktur in der Peptidbindungsfurche, in der die Peptide der Antigene präsentiert werden. Seitlich werden die Furchen von α -Helices abgegrenzt. Während bei den MHC-I Molekülen die Peptidvertiefung nur von α -Ketten gebildet wird, wird bei MHC-II die Furche von α - und β -Ketten geformt. Im Gegensatz zu der MHC-I Vertiefung, ist die MHC-II Furche an den Enden offen und somit nicht räumlich begrenzt, wodurch längere Peptide gebunden werden können (Tizard 2013, Wieczorek et al. 2017, York et al. 1996).

Während MHC-Klasse I auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, kommen MHC-Klasse II Moleküle ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen vor (Rock et al. 2016).

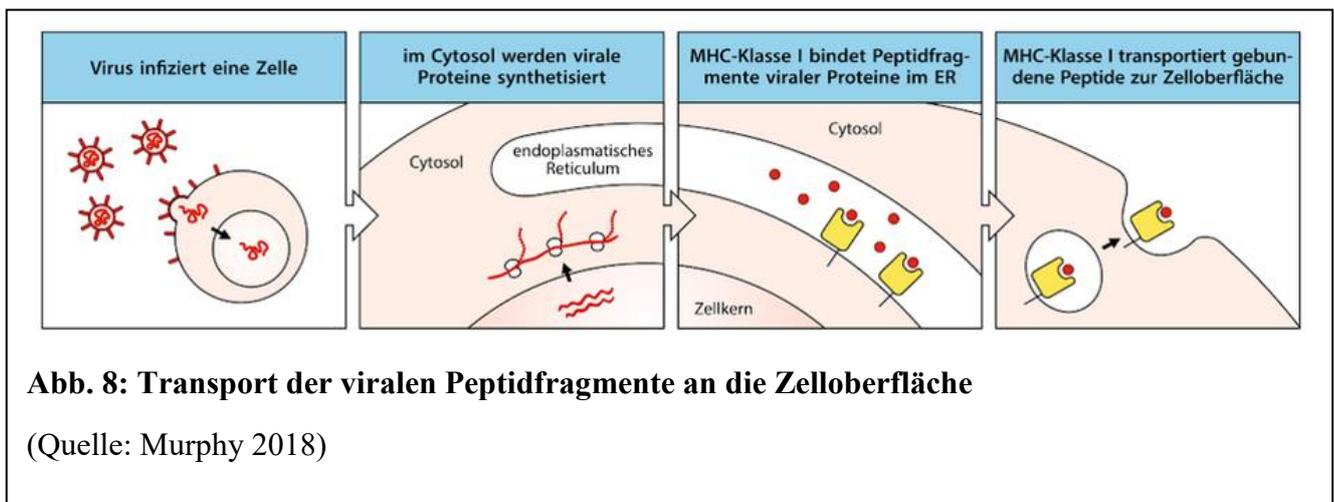
Die restlichen Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes, die nicht für die Klassen MHC-I und MHC-II kodieren, werden unter MHC-III zusammengefasst. Die von dieser Klasse kodierten Plasmaproteine sind an der angeborenen Immunabwehr beteiligt. Dazu gehören unter anderem der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), verschiedene Zytokine und die Komplementfaktoren C2, C4 und Bf (Tizard 2013).

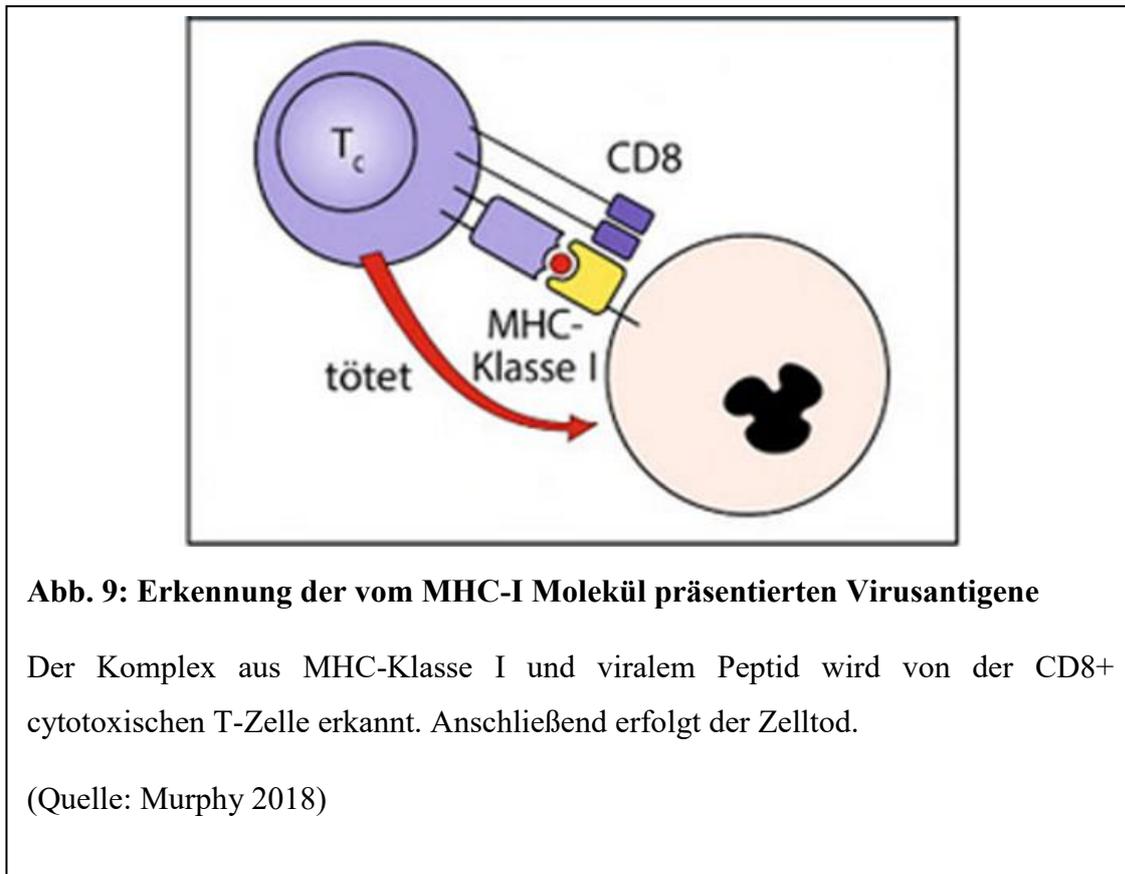


4.3.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex-I beim Menschen

Der auf dem Chromosom 6 gelegene MHC-Locus kodiert drei verschiedene MHC-I Moleküle, sogenannte *human leukocyte antigens* (HLA). Man unterscheidet zwischen HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die Expression der drei HLAs erfolgt in allen kernhaltigen Zellen und somit, abgesehen von Erythrozyten, auf allen Zellen (Schütt et al. 2009, Yewdell et al. 1992).

Im Falle einer Virusinfektion oder einer entarteten Zelle, präsentieren Moleküle der MHC-Klasse I Peptidfragmente von Tumorzellen oder Virusproteinen an der Zelloberfläche. Die Präsentation nach einer viralen Infektion geschieht, nachdem die Proteine im Zytosol synthetisiert wurden und die MHC-Klasse I sich im endoplasmatischen Retikulum an jene viralen Proteine gebunden hat (Hewitt 2003, Wieczorek et al. 2017, Yewdell et al. 1992). Die von MHC-Klasse I Molekülen präsentierten Antigene werden anschließend an die Oberfläche transportiert und von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkannt, gebunden sowie ein Destruktionsprozess eingeleitet (Hewitt 2003, Wieczorek et al. 2017, Yewdell et al. 1992).





4.3.3. Der Schweine-Leukozyten-Antigen-Komplex (SLA)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex beim Schwein wird Schweine-Leukozyten-Antigen-Komplex (*swine leukocyte antigen* oder kurz SLA) genannt und hat eine Größe von rund zwei Megabasen (Mb) an DNA. Der SLA-Locus sitzt auf Chromosom 7, wird vom Centromer geteilt und kodiert drei Hauptklassen, SLA-I, SLA-II und SLA-III. Die SLA-Klasse I und III sitzen auf dem kurzen Arm, während sich SLA-Klasse II auf dem langen Arm befindet (Lunnet et al. 2009, Vaiman et al. 1998).

Anhand der Struktur und der Zellen in denen sie exprimiert werden, unterscheidet man zwischen MHC-I und MHC-II Glykoproteinen. MHC-I werden assoziiert mit Peptiden, die von kernhaltigen Zellen aus dem Zytosol stammen und präsentieren diese zytotoxischen CD8+ Zellen, während MHC-II Moleküle exogene Antigene präsentieren und hauptsächlich CD4+ Zellen aktivieren. Bei Schweinen wurden MHC-I Moleküle, wie bei den Menschen, auf allen kernhaltigen Zellen gefunden (Chardon et al. 2000).

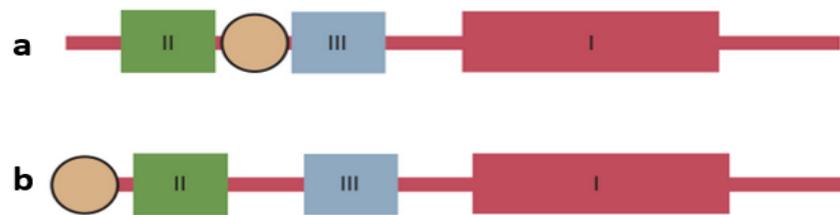


Abb 10: Anordnung der Genregionen innerhalb des MHC Locus bei Schwein und Mensch

a) SLA Komplex beim Schwein am Chromosom 7, geteilt durch das Centromer

b) HLA Komplex beim Menschen am Chromosom 6

(Quelle: Tizard 2013)

Innerhalb des Schweine-Leukozyten-Antigen-Komplexes auf dem Chromosom 7 unterscheidet man zwischen verschiedenen Haplotypen, die aus einer Kombination von Allelen von Genen bestehen (Lunney et al. 1994).

Durch die hohe Polymorphie entstehen eine Vielzahl an SLA-I Kombinationen, was die Darstellung einer breiten Palette antigener Peptide ermöglicht. Dadurch können unter anderem das Ansprechen auf einen Impfstoff oder die Krankheitsresistenz beeinflusst werden (Lunney et al. 2009).

Das SLA Nomenklatur Komitee, das 2002 in Göttingen, Deutschland gegründet wurde, entwickelte ein System, um SLA-Klasse I und II Haplotypen anhand von DNA Sequenzierung systemisch einzuordnen (Lunney et al. 2009).

Diese analysierten Sequenzen werden in der *Immunopolymorphism Database- Major Histocompatibility Complex (IPD-MHC)* Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/sla/>) gesammelt und dienen als primäre Informationsquelle für die polymorphen Gene des SLA Systems (Robinson et al. 2005).

Das Ziel dieser Diplomarbeit war herauszufinden, ob eine Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus zu einer Veränderung der SLA-I Expression auf SK-6 Zellen führt. Mit Hilfe von verschiedenen, teilweise mit Farbstoffen markierten Antikörpern und einem Durchflusszytometer sollte die Vermutung bestätigt werden, dass sich keine Herunterregulierung der Oberflächenexpression von SLA-I feststellen lässt.

Im anschließenden Teil sollte geklärt werden, ob und inwiefern unterschiedliche Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden mit dem KSPV einen Einfluss auf die SLA-I Expression von SK-6 Zellen haben.

Der dritte Teil der Versuchsreihe befasste sich mit porcinen primären Alveolarmakrophagen (PAMs), die teils mit KSPV und teils mit PRRSV infiziert wurden. Neben einem statistischen Vergleich der Messergebnisse sollte gezeigt werden, dass sich die Methoden der Infektion, Färbung und Auswertung von SK-6 Zellen auch auf PAMs anwenden lassen.

5 Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Einwegspritzen	Firma (Fa.) Braun
Handschuhe	Fa. Roth
Pipettenspitzen mit Filter	Fa. Braun
Pipettenspitzen ohne Filter	Fa. Braun
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Fa. Eppendorf
Zellkulturschalen (10 cm)	Fa. Falcon
Zellschaber	Fa. Bioswisstec
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Fa. Sarstedt

5.1.2. Medien, Puffer, Lösungen und Chemikalien

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Gibco
+ Penicillin 100 iU/ml	
+ Streptomycin 0,5 mg/ml	
AZ-Medium	
EDTA/Versen	
Fetal Calf Serum (FCS)	Fa. Bio&Sell
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	
PBS-Tween (PBS+ 0,1 % Tween) (v/v)	
Paraformaldehyd 4%	

Trypsin Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1:3 in PBS Fa. GE Healthcare

Triton X-100 1% (v/v)

Versen

5.1.3. Antikörper

5.1.3.1. primäre Antikörper

Anti-KSPV-E2 mAk A18 (Weiland et al. 1990)

Anti-PRRSV-N-Protein mAk (Anti-N) direkt markiert mit dem Farbstoff Cy3, (Weiland et al. 1990)

Anti- bovine MHC-I mAk PT85A, WS 0560B-100 Fa. Kingfisher

5.1.3.2. sekundäre Antikörper

Ziege Anti-Maus IgG, FITC-konjugiert Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

Ziege Anti-Maus IgG, Cy3 -konjugiert Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

5.1.4. Kits

Leucoperm™ Fa. Bio-Rad

5.1.5. Geräte

Amnis flow sight Durchflusszytometer Fa. Merck Millipore

+ Imagingsoftware „IDEAS“

Brutschränke mit 5% CO₂ Fa. Sanyo

Einkanalpipetten Fa. Eppendorf, Fa. Gilson

Kühl- und Gefrierschrank 4° C, - 20° C, - 80° C	Fa. Liebherr
Mikroskope	Fa. Olympus, Fa. Nikon
Pipette Research Plus 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Fa. Eppendorf
Rotationsschüttler	Fa. Benchmark Scientific
Sterilwerkbank HB2372KGS	Fa. Heraeus
Vortex	Fa. UniEquip
Waage	Fa. Mettler
Wasserbad mit Thermalkugeln	Fa. Braun
Zentrifugen	Fa. Heraeus, Fa. Eppendorf

5.1.6 Virusstämme

Virus der klassischen Schweinepest, ncp Stamm Alfort Tübingen, p447

Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom Virus, Stamm AUT15-33, PRRSV-1 Subtyp 1, Österreich, Feldisolat

5.1.7 Eukaryotische Zellen

Swine Kidney 6 Zellen (SK-6, RRID: CVCL_D296), Institut für Virologie, Giessen

Primäre porcine Alveolarmakrophagen, Veterinärmedizinische Universität Wien

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1. Kultivierung von SK-6 Zellen

Die verwendete Zelllinie, „Swine Kidney 6“ oder auch SK-6 genannt, wurde unter sterilen Bedingungen im CO₂-Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂ inkubiert und im Abstand von drei bis vier Tagen passagiert. Das verwendete Zellkulturmedium „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) beinhaltet Zusätze (+ Penicillin 100 iU/ml, + Streptomycin 0,5 mg/ml, Fetales Kälberserum 10%) für eukaryotische Zellen. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Um Zellen für die Infektion zu gewinnen, wurde das Medium zunächst abgenommen und der adhärente Zellrasen mit 5ml Trypsin (1:3 in PBS) abgespült, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach 20 Sekunden wurde das Trypsin, bis auf eine kleine Restmenge, die der Zellbeschichtung dient, abpipettiert und die 10 cm Zellkulturschalen für zehn Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen anschließend von der Platte lösen zu können. Nach der Inkubation wurden die SK-6 Zellen in 5 ml vorgewärmten Medium durch Pipettieren vereinzelt und anschließend jeweils 0,5 ml der Zellsuspension in sterile Schalen überführt, um die Zellreihen zu erhalten. Im Anschluss wurde das Volumen mit DMEM auf 10 ml pro Platte ergänzt.

Für die Versuchsreihe wurden jeweils 2 ml SK-6 Zellen ($1,7 \times 10^6$ pro ml) in sechs frische 10 cm Zellkulturschalen pipettiert und mit vorgewärmten DMEM Medium auf ein Gesamtvolumen von jeweils 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurden sie 24 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert, um einen homolog beschichteten Zellrasen zu erhalten. Abschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen infiziert.

5.1.1.2. Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde zunächst eine 1:100 Verdünnungsreihe mit 10 µl SK-6 Zellen in DMEM Medium und 990 µl PBS hergestellt. Anschließend wurde eine Neubauerzählkammer verwendet, um die Zellen unter dem Mikroskop auszählen zu können.

Dabei wurden nach der Resuspendierung der Zellen 10 µl vorsichtig in den Spalt zwischen Deckglas und Kammernetz pipettiert und anschließend unter ein Mikroskop gelegt. Es wurden vier Großquadrate der Kammer ausgezählt und darauffolgend ein Mittelwert von $1,7 \times 10^6$ Zellen pro ml errechnet.

5.2.2 Infektion und Inkubation von SK-6 Zellen

Um die SK-6 Zellen zu infizieren, wurden sie zunächst auf sechs 100 x 20 mm Zellkulturplatten ausgesät und mit 10ml Medium anschließend 24 Stunden im CO₂ Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem mikroskopisch kontrolliert wurde, ob sich ein konfluenten Zellrasen mit adhären und intakten Zellen gebildet hatte, wurden drei der sechs Schalen mit dem Virus der klassischen Schweinepest Alfort/Tü (p447) infiziert. Das gewählte Virus hatte einen Titer von 5×10^6 TCID₅₀/ml.

Nachdem das verbrauchte Medium durch Absaugen entfernt wurde, folgte die Infektion mit je 500 µl KSPV Alfort/Tü (p447) auf jeder der drei Zellkulturschalen. Die Platten wurden zurück in den Brutschrank gelegt und alle zehn Minuten, für die Dauer einer Stunde, langsam geschwenkt um das Virus gleichmäßig auf dem Zellrasen zu verteilen. Anschließend wurde frisches Medium hinzugefügt um das Volumen auf 10 ml zu ergänzen und die Zellen wie bisher im CO₂ Brutschrank inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde je eine infizierte und eine nicht infizierte Zellkulturschale entnommen und für die anschließende Auswertung mit verschiedenen Antikörpern markiert.

5.2.3. Gewinnung und Infektion von porzinen primären Alveolarmakrophagen

Die porzinen primären Alveolarmakrophagen (PAMs) wurden aus der Lunge von euthanasierten Schweinen (meist 12 Wochen) durch Spülung mit PBS gewonnen. Aus der Lavage wurden die PAMs durch zweimalige Zentrifugation bei 1.000 x g angereichert und durch Pufferwechsel gewaschen. Im Anschluss wurden die pelletierten Zellen in 90% fetalem Kälberserum und 10% DMSO in einer Dichte von 5×10^7 Zellen pro ml aufgenommen und langsam in einer Isopropanol Gefrierbox bei -150°C eingefroren.

Zur Infektion wurden 5×10^6 Zellen in eine 35 mm Zellkulturschale ausgesät und mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 1 entweder mit KSPV Alfort/Tü (p447) oder PRRSV AUT15-33 infiziert.

5.2.4. Antikörpermarkierung der SK-6 Zellen

Nach der Infektion der Zellen für 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Markierung mit einem monoklonalen Antikörper (mAk). Als primäre Antikörper für die SK-6 Zellreihe wurden A18, ein Anti-E2 Strukturprotein mAk und PT85A, ein Anti-MHC-I Antikörper, der gegen bovines MHC-I gerichtet ist, aber mit SLA-I kreuzregiert, ausgewählt.

Nach 24 Stunden wurden zwei Zellkulturplatten, je eine infiziert und eine nicht infiziert, vom Medium befreit, einmalig mit 5 ml EDTA/Versen gespült und anschließend 15 Minuten mit EDTA/Versen inkubiert, um die Zellen vom Boden der Platte zu lösen. Die gepoolten Zellen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1.670 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in 5 ml PBS+ BSA 1% (Bovines Serumalbumin) resuspendiert, unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und die Flüssigkeit entfernt. Zur Fixierung der Zellen wurden 300 µl des Reagenz A von Leucoperm hinzugefügt und bei 4°C am Rotationsschüttler inkubiert. Nach 10 Minuten wurden die Tubes auf 10 ml mit PBS+ BSA 1% aufgefüllt, resuspendiert, bei 2.000 rpm 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nachdem ein zweiter Wasch- und Zentrifugationsschritt mit PBS+ BSA 1% erfolgte, wurden die beiden 15 ml Tubes in jeweils zwei 1 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Jeweils ein Gefäß mit infizierten und eines mit nicht infizierten Zellen wurde mit 0,5 ml PBS+ BSA 1% und 1 µl PT85A (Verdünnung 1:500) inkubiert, um die an der Zelloberfläche befindlichen SLA-1 Moleküle zu markieren. In die anderen beiden Reaktionsgefäße wurden 200 µl Leucoperm Reagenz B, das die Zellmembran durchlässig macht, sowie 30 µl Anti- E2 A18 Antikörper zum Nachweis des intrazellulären E2 Proteins pipettiert.

Alle Proben kamen für 30 Minuten bei 4°C auf den Rotationsschüttler, um das Absetzen der Zellen zu verhindern.

Die Schritte für die Zellreihe der 48 und 72 Stunden erfolgten nach selbigem Protokoll.

Nach der Inkubation des ersten Antikörpers erfolgten zwei Waschungen mit PBS+ BSA 1%, nach vorangehender Zentrifugation bei 2.000 rpm für zwei Minuten. Als sekundärer Antikörper wurden 200 µl Ziege Anti-Maus IgG, FITC-konjugiert, in einer Verdünnung von 1:300 (mit PBS+ BSA 1%) pro Tube hinzugefügt.

Nach neuerlicher Inkubation für dreißig Minuten am Rotationsschüttler bei 4°C, und zwei Zentrifugations- und Waschschritten mit 500 µl PBS ohne BSA, wurden die Zellen in 50 µl

PBS resuspendiert, um die Messung mit dem Durchfluss- bzw. Imagingzytometer *AMNIS flow sight* durchzuführen.

5.2.5. Antikörpermarkierung der porzinen, primären Alveolarmakrophagen

Nach 24 Stunden wurden die PAMs mit 5 ml EDTA/Versen gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden in vier 15 ml Tubes pipettiert und bei 1.200 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 5 ml PBS+BSA 1% gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die Zellen in 300 µl des Reagenz A Leucoperm resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C am Rotationsschüttler bei zwei Umdrehungen pro Minute langsam geschwenkt. Im Anschluss wurden je Tube 9 ml PBS+BSA 1% hinzugefügt und 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert.

Nach dem erneuten Abkippen der Flüssigkeit und Überführen der Zellpellets in 1,5 ml Reaktionsgefäße, erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern.

Für die mit KSPV Alfort/Tü infizierten Proben und deren nicht infizierten Kontrollproben wurde jeweils ein Zellpellet mit 30 µl mAk A18 + 200 µl Reagenz B von Leucoperm inkubiert. Die andere, infizierte Probe und deren Vergleichsprobe wurden mit 1 µl mAk PT85A und 0,5 ml PBS+BSA 1% versehen.

Eine der mit dem PRRSV AUT15-33 infizierten Proben, sowie deren negative Kontrollprobe, wurden mit dem mAk Anti-PRRSV-N-Protein, in einer Verdünnung von 1:500 mit dem Reagenz B von Leucoperm inkubiert. Da dieser Antikörper bereits primär mit einem Cy3 Farbstoff markiert ist, war für diese Proben keine Markierung mit einem sekundären Antikörper notwendig.

Eine zweite, mit PRRSV AUT15-33 infizierte Probe und deren negative Vergleichsprobe wurden mit dem mAk PT85A in einer Verdünnung von 1:500 in 500 µl PBS+BSA1% inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, bei der die Zellen bei 4°C am Rotationsschüttler langsam geschwenkt wurden, wurden die Zellen zweimalig mit je 500 µl PBS+BSA 1% gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Jene sechs Proben, welche nicht mit dem mAk Anti-N inkubiert wurden, wurden mit dem sekundären Antikörper Ziege Anti- Maus IgG, Cy3 konjugiert, in einer Verdünnung von 1:300 (mit PBS+BSA 1%) versehen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C

am Rotationsschüttler, wurden die Zellen einmal in PBS+ BSA 1% und anschließend einmalig in reinem PBS gewaschen. Um die Messung im Durchflusszytometer durchzuführen, wurden die Zellen aller 8 Proben in 50 µl PBS resuspendiert.

5.2.6. Messung im *AMNIS flow sight* Durchflusszytometer

Das *AMNIS flow sight* Durchflusszytometer misst mit Hilfe von vier verschiedenen Exzitationslasern (405, 488, 561, 642 nm) die Fluoreszenz von durchlaufenen Zellen und erfasst währenddessen jede einzelne, um sie fotografisch festzuhalten. Des Weiteren beinhaltet das Gerät Forward- und Sidescatter, um die Größe und Granularität der Zellen zu messen. So ist es möglich, sowohl Fluoreszenz, Form, Granulation, Größe aber auch ein mikroskopisches Bild jeder Zelle darzustellen. Eine eingebaute Hochgeschwindigkeitskamera ermöglicht, bis zu 4.000 Aufnahmen pro Sekunde zu schießen und jede zu speichern. Mittels Imaging Programmen und anschließender Statistik können gesammelte Werte und Kriterien (z.B. Größe, Form) ausgewertet werden (Luminex Corporation, 2019).

Für die von mir durchgeführten Versuche, bei denen als sekundärer Antikörper Ziege Anti-Maus IgG, FITC-konjugiert verwendet wurde, wählte ich den 488 nm Exzitationslaser mit 30 mW und einer SSC von -8, 75. Als relevante Channel wurden der 01, 02, 06 und 12 ausgewählt.

Um ein genaueres Ergebnis zu erzielen, wurde ein Fenster („R1“) festgelegt, in welchem die durchlaufenen Zellen gezählt wurden, um Zellkonglomerate, Zellbruchstücke und *calibration beads*, die zur Kalibrierung des Gerätes verwendet wurden, von der Erfassung bestmöglich auszuschließen. Jener Bereich wurde für alle Proben gleich festgelegt und nicht verändert. Bei jedem Ansatz wurden 10.000 Zellen gezählt, um eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Vor jeder Messung mit dem Durchflusszytometer wurde das Gerät kalibriert und die Zellen in 50 µl PBS resuspendiert, um eine möglichst schnelle und fehlerfreie Messung zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Imaging Programm „*IDEAS*“ von *AMNIS* graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Es wurden Histogramme, bei dem die x-Achse *Intensity Ch2* entspricht, erstellt, um die Fluoreszenz zu sehen und messen zu können. *Intensity CH2* wurde ausgewählt, da in diesem Channel der verwendete, sekundäre FITC-konjugierte Antikörper fluoresziert. Des Weiteren wurde ein Scatterplot, bei dem die x-Achse *M01* und die y-Achse der *Intensity Ch2* entspricht, angefertigt, um eine weitere Darstellung zu erhalten.

6 Ergebnisse

6.1. Veränderung der SLA-I Expression auf porzinen Zellen nach Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus

Nach der Messung von 10.000 Zellen jeder Probe wurden die Werte mit der „*IDEAS*“ Software von *AMNIS flow* graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Jedes der Experimente wurde zweifach wiederholt, um das Ergebnis zu bestätigen.

Eine Zelle wurde als positiv gewertet, wenn das Fluoreszenzsignal, auf der x-Achse als Intensity CH2 bezeichnet, über $1e^4$ hinausgeht.

In der Abbildung 11a stellen sich die infizierten (rot) und nicht infizierten (grau) SK-6 Zellen dar, die mit mAk A18 inkubiert wurden. Es ist ableitbar, dass die Zellen, die nicht infiziert wurden, nur aufgrund der Autofluoreszenz leuchten und kein deutliches Signal sichtbar ist, das eine Infektion bestätigen würde. Diese Zellprobe stellt die Negativkontrolle des Experiments dar. Als Positivkontrolle sind die permeabilisierten, mit mAk A18 und mAk FITC markierten Zellen anzusehen. In der Grafik 11a ist ersichtlich, dass 24 h p.i. nahezu alle SK-6 Zellen ein E2 positives Fluoreszenzsignal zeigen (rot). Nur wenige Zellen befinden sich im Überschneidungsbereich mit den nicht infizierten Zellen (grau). Abbildung 11c zeigt die Analyse als Scatterplot dargestellt. Auch hier wird der Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Zellen deutlich.

Im Histogramm 11b sieht man den Nachweis von oberflächenständigem SLA-I auf nicht infizierten (grau) und KSPV Alfort/Tü infizierten Zellen (grün). Die Abbildung 11d veranschaulicht dieselben Proben als Scatterplot Darstellung. Diese Zellproben wurden mit dem mAk PT85A inkubiert. Die Intensitätskurven für den SLA-I Nachweis zeigen keine deutlichen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen auf. Das bedeutet, dass keine Herunterregulierung am SLA-I zu beobachten ist.

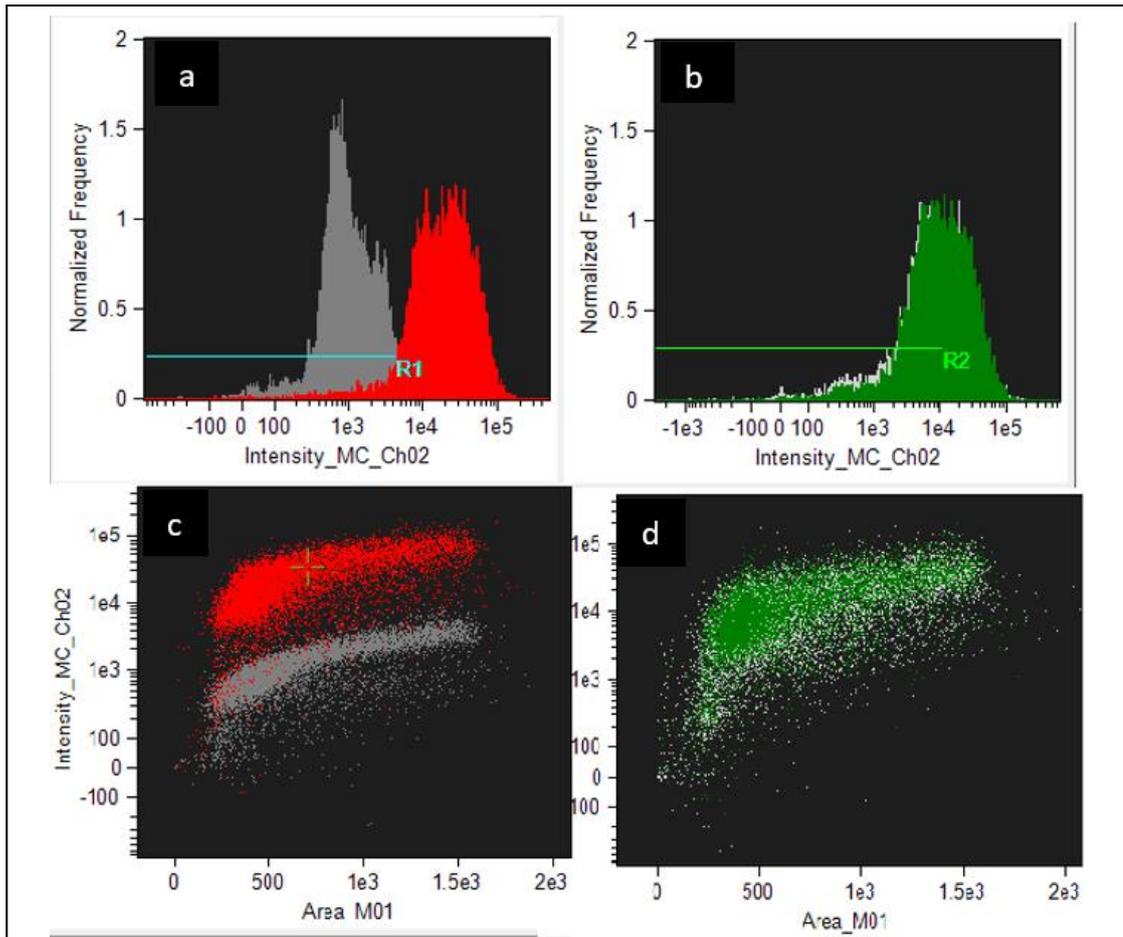


Abb. 11: Nachweis der E2 (links) und der SLA-I (rechts) Expression in infizierten und nicht infizierten SK-6 Zellen nach einer Infektion mit KSPV Alfort/Tü (p447) 24 Stunden post infectionem (p.i.) mit Hilfe der „IDEAS“ Software von *Amnis flow*.

Intensity_MC_CH02 steht für die Intensität des Fluoreszenzsignals im Channel 2. *Normalized Frequency* steht für die Zellhäufigkeit in den einzelnen Proben

R1 sowie R2 wurden bestimmt, um die nicht infizierten Zellen ausfiltern zu können.

Abb.11 a und c: Messergebnisse der mit mAk A18 inkubierten SK-6 Zellreihe. Der graue Graph bzw. Scatterplot stellt die nicht infizierten SK-6 Zellen dar (Negativkontrolle), die infizierten Zellen sind rot gekennzeichnet (Positivkontrolle).

Abb.11 b und d: Der Nachweis von oberflächenständigem SLA-I erfolgte durch den mAk PT85A. Die mit KSPV Alfort/Tü infizierten SK-6 Zellen sind grün dargestellt, die nicht infizierten Vergleichsproben sind grau markiert. Da sich keine Herunterregulierung beobachten lässt und das Fluoreszenzsignal somit annähernd gleich ist, sind die Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht infizierten Zellen schwer zu differenzieren.

6.2 Veränderung der SLA-I Expression auf porzinen Zellen nach Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus zu verschiedenen Zeitpunkten

Im Anschluss an die Fragestellung, ob es durch eine Infektion mit KSPV eine Herunterregulierung am SLA-I gibt, wurde überprüft, wie der Infektionsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten aussieht. Daher fanden die verschiedenen Messungen nach einer Virusinkubation im CO₂ Brutschrank von 24, 48 und 72 Stunden statt. Die Einstellungen für die Messungen wurden wie im vorherigen Experiment beibehalten und wiederholt durchgeführt.

In allen abgebildeten Grafiken der Abbildung 12 sind alle nicht infizierten Zellen grau abgebildet. Jene Zellen, die mit dem mAk A18 markiert wurden, sind rot dargestellt. Die grünen Graphen repräsentieren jene Proben, die mit dem mAk PT85A markiert wurden.

Auch bei diesen Proben wurden 10.000 Zellen jeder Probe gemessen und anschließend mit der „*IDEAS*“ Software von *AMNIS flow* graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet.

Auch diesmal wurden Zellen dann als positiv gewertet, wenn das Fluoreszenzsignal, auf der x-Achse als Intensity CH2 bezeichnet, über $1e^4$ hinausging.

Für jeden Tag, an dem Messungen durchgeführt wurden, also nach 24, 48 und 72 Stunden, gab es eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Diese sind in der Abbildung 12, in den Grafiken a, c, e, g, i und k in rot und grau dargestellt, wobei die Positivkontrollen rot eingefärbt sind.

Die Ergebnisse dieser Grafiken zeigen, dass die Versuchsreihe funktioniert hat, da ein deutlicher Unterschied zwischen den infizierten und somit fluoreszierenden und den nicht infizierten Zellen sichtbar ist. Sowohl nach 24, 48 und 72 Stunden zeigten nahezu alle SK-6 Zellen ein positives E2 Fluoreszenzsignal. Zwischen den einzelnen Positiv- und Negativkontrollen ist jedoch kein deutlicher Unterschied erkennbar.

Die Grafiken der Abbildung 12 zeigen die Histogramme bzw. die dazugehörigen Scatterplots nach 24 (b, d), 48 (f, g) und 72 (j, l) Stunden. Dargestellt wurde der Nachweis von oberflächenständigem SLA-I auf mit KSPV Alfort/Tü infizierten (grün), sowie nicht infizierten SK-6 Zellen (grau). Diese Versuchsproben wurden mit dem Anti-bovinen MHC-I Antikörper PT85A inkubiert.

Die Intensitätskurven für den SLA-I Nachweis in den Histogrammen 12b, 12f und 12j weisen keine deutlichen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen auf. Das bedeutet, dass keine Herunterregulierung am SLA-I zu beobachten ist.

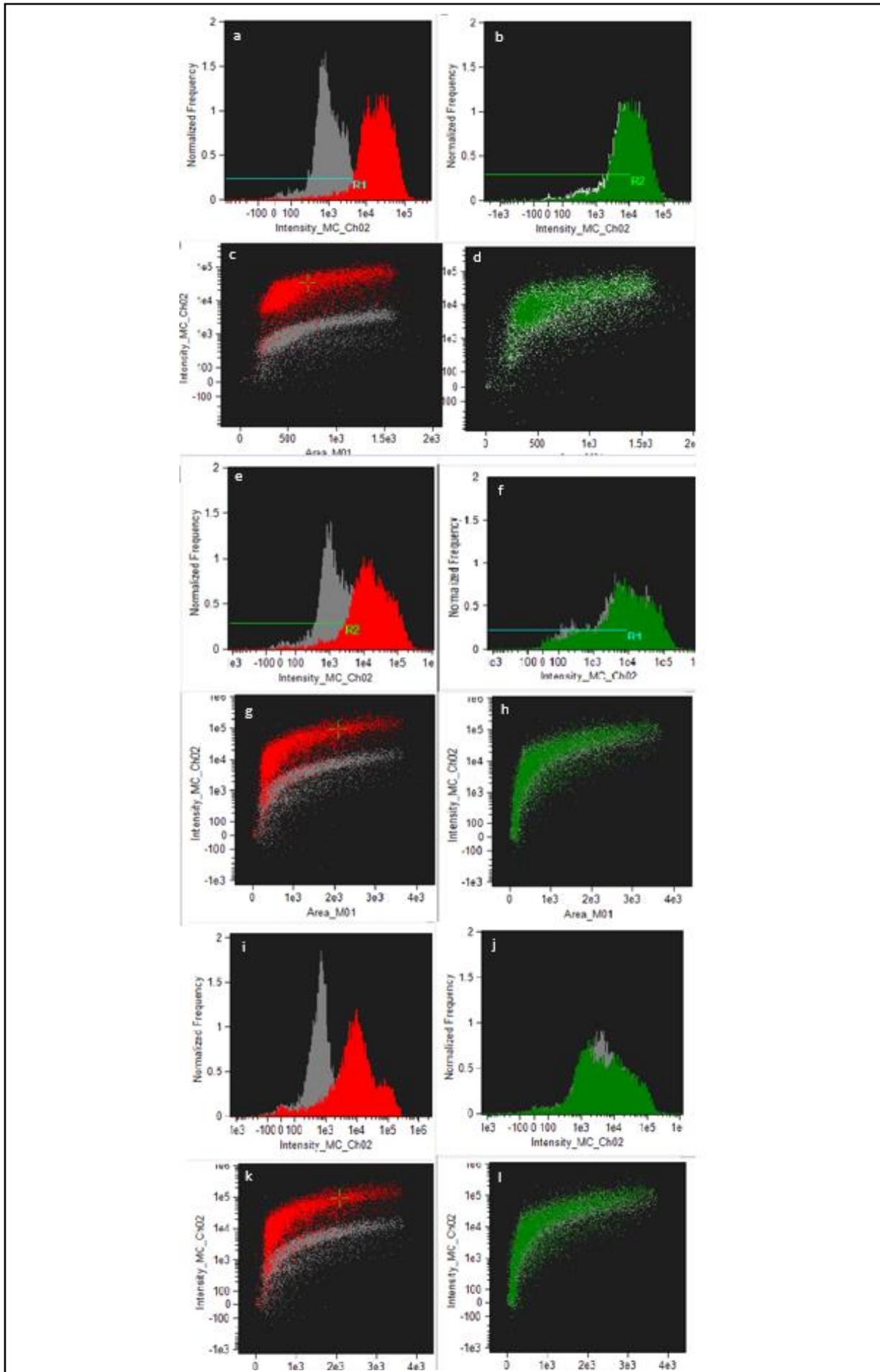


Abb. 12: Graphische Darstellung der infizierten und nicht infizierten SK-6 Zellen nach einer Infektion mit KSPV Alfort/Tü nach 24 (a-d),48 (e-h) und 72 (i-l) Stunden p.i.

Linke Seite (a,c,e,g,i,k): Darstellung der Zellreihen, die mit mAk A18 markiert wurden mittels Histogrammen und Scatterplots. Zellen die mit KSPV infiziert wurden sind rot (Positivkontrollen), nicht infizierte Zellen sind grau (Negativkontrollen) dargestellt.

Rechte Seite (b,d,f,h,j,l): Die SK-6 Zellreihe wurde mit mAk PT85A markiert, um oberflächenständige SLA-I Komplexe nachzuweisen. In den Histogrammen und Scatterplots sind die mit KSPV Alfort/Tü (p447) infizierten SK-6 Zellen grün und die nicht infizierten Vergleichsproben grau gekennzeichnet.

R1 sowie R2 wurden festgelegt, um die Anzahl der nicht infizierten Zellen abschätzen zu können.

6.3. Vergleich der möglichen Herunterregulierung der Oberflächenexpression von SLA-I durch PRRSV und KSPV in porzinen primären Alveolarmakrophagen

Bei porzinen primären Alveolarmakrophagen (PAMs) handelt es sich um Makrophagen, die in der Lunge anzutreffen sind. Die Vermehrung des Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus Typ-1 ist außerhalb des Schweineorganismus ausschließlich in Makrophagen möglich. Nach der Einschleusung wird die RNA des Virus in das Zytoplasma freigesetzt, woraufhin zuerst die open reading frames (ORF) 1a und 1b in ein Polyprotein translatiert werden, das anschließend durch Autoproteasen in die einzelnen Nichtstrukturproteine gespalten wird (Ackermann, 2013).

Daher wurden für die folgenden Versuche PAMs ausgewählt. Diese Zielzellen wurden infiziert und nach 24 Stunden mit primären und sekundären Antikörpern markiert und schließlich im Durchflusszytometer gezählt und gemessen.

Eine Zellschale wurde mit KSPV Alfort/Tü mit einer MOI von 1 infiziert, die andere mit dem PRRSV AUT15-33. Zwei weitere wurden nicht infiziert und gelten als Negativkontrolle. Alle Experimente wurden zweifach durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Wie zuvor

beschrieben, wurde das E2 Protein des KSPV mit mAk A18 und SLA-I mit PT85A nachgewiesen. Um die Infektion der PAMs mit PRRSV nachzuweisen, wurde der primäre mAk N1 eingesetzt, der gegen das Nukleokapsidprotein N gerichtet ist. Für jede der vier Proben wurde eine nicht infizierte Vergleichsprobe mit den jeweiligen Antikörpern markiert.

Als sekundärer Antikörper, der an die mAk A18 bzw. PT85A markierten Proben bindet und im Durchflusszytometer für den Farbausschlag verantwortlich ist, wurde FITC markiertes Ziege Anti Maus IgG in einer Verdünnung von 1:300 verwendet. Der primäre Antikörper Anti- N war bereits mit Cy3 farblich markiert und benötigte keine weitere Inkubation mit einem sekundären Antikörper.

In den Histogrammen 13a und 13b sind jene Zellen dargestellt, die mit KSPV Alfort/Tü infiziert wurden. Die Grafik 13a zeigt die Inkubation mit dem mAk A18, während das Histogramm 13b die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper PT85A zeigt. Die Darstellungen 13c und 13d veranschaulichen jene Proben, die mit dem PRRSV AUT15-33 inkubiert wurden. Während in der Abbildung 13c PAMs zu sehen sind, die mit dem Antikörper Anti-N inkubiert wurden, zeigt die rechte Grafik 13d jene Proben, die mit PT85A inkubiert wurden.

Die Abbildung 13a zeigt die Ergebnisse, die mit dem mAk PT85A und somit an den SLA-I Komplex bindenden, markierten Zellen. Es lässt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Proben feststellen.

In Grafik b der Abbildung 13 sieht man die mit dem mAk A18 markierten Zellen, welcher an das E2 Glykoprotein an SLA-I im inneren der Zelle bindet. Hier lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Zellen erkennen. Jedoch sieht man, dass nahezu alle Zellen positiv bzw. gefärbt sind. Als positiv wurden Messergebnisse $> 1e^4$ interpretiert. Vergleicht man beide Histogramme miteinander, lässt sich daraus ableiten, dass an dem SLA-I Komplex an der Oberfläche keine Herunterregulierung der SLA-I Expression stattfindet.

Vergleicht man die Abbildungen 13c und 13d miteinander, lässt sich erkennen, dass ein deutlicher Unterschied in der Zellzahl zwischen den infizierten und nicht infizierten Zellen sichtbar ist.

Die mit mAk Anti-N und mit dem PRRSV Stamm AUT15-33 dargestellten PAMs, sind deutlich positiv, was an dem Rechtsshift der Intensity ab $1e^4$ auf der x-Achse zu erkennen ist. Die linken, mit mAk PT85A markierten und mit AUT15-33 infizierten, Zellen zeigen diese deutliche

Veränderung nicht, woraus sich schließen lässt, dass es hier zu einer Herunterregulierung am SLA-I Komplex kommt.

Somit wurden beschriebene Ergebnisse bestätigt, die zeigen, dass es bei PRRSV zu einer verminderten Expression am SLA-I kommt (Wang et al. 2010).

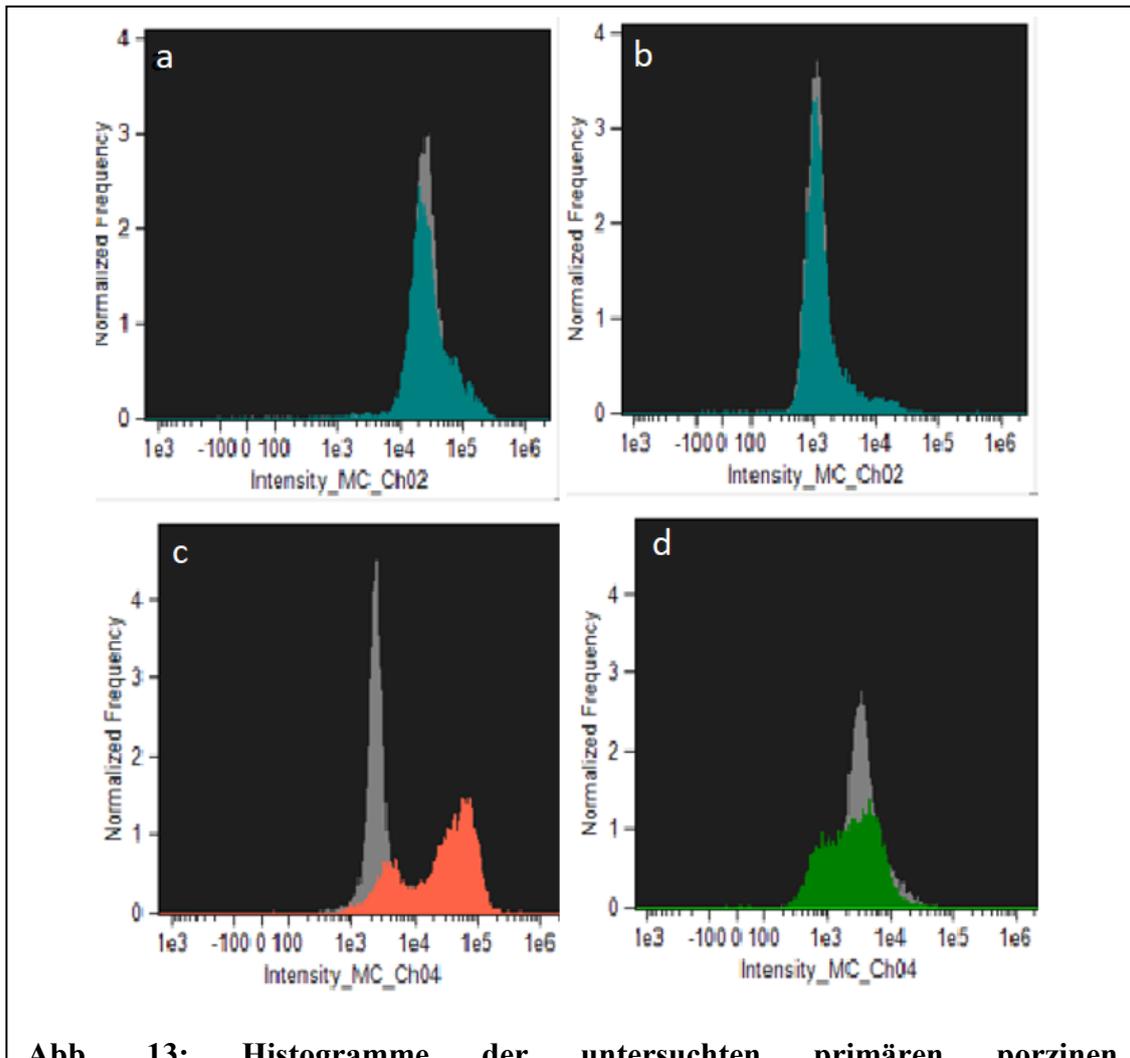


Abb. 13: Histogramme der untersuchten primären porzinen Alveolarmakrophagen

Abbildung 13a und 13b: PAMs markiert mit mAk PT85A (links) und mAk A18 (rechts). Es wurde jeweils eine Probe mit KSPV Alfort/Tü infiziert (türkis) und zwei Vergleichsproben nicht infiziert (grau).

Abbildung 13c und 13d: PAMs markiert mit Anti-N (links) und PT85A (rechts), jeweils eine Probe infiziert (mit PRRSV AUT15-33 in orange bzw. grün) und nicht infiziert (grau).

7 Diskussion

7.1. Nutzen der Arbeit

Um die Replikation des Virusgenoms und die Translation von Virusprotein zu ermöglichen, nutzen Viren die Biosynthesemechanismen der Wirtszellen. Um das Immunsystem vor viral infizierten Zellen zu warnen, werden MHC-I Komplexe an der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert, welche antigene Peptide präsentieren. Zytotoxische T-Lymphozyten können diese Epitope auf infizierten Zellen erkennen und deren Apoptose einleiten. Mittlerweile wurden bei vielen Viren Proteine nachgewiesen, die diesen Mechanismus verhindern oder hemmen, um der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten zu entgehen (Hewitt 2003).

Infektionen mit dem BVDV, ein naher Verwandter des KSPV, führen dazu, dass bei bovinen Monozyten die Expressionsrate von MHC-I und MHC-II Molekülen verändert wird, wobei MHC-I Moleküle herunterreguliert werden (Sang-Ryul Lee et al. 2008).

Da das Virus der klassischen Schweinepest ebenso zur Familie der *Pestiviridae* gehört, beschäftigt sich diese Arbeit damit, herauszufinden, ob es bei diesem Virus ebenso zu einer Veränderung der MHC-I Moleküle kommt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Infektion mit dem Virus der klassischen Schweinepest zu keiner Herunterregulierung der SLA-I Expression führt.

Die von mir gezeigten Ergebnisse bekräftigen die Theorie der Überlebensstrategie des klassischen Schweinepestvirus, dessen Ziel in persistenten Infektionen in immuntoleranten Tieren liegt, welche das virale Antigen nicht als fremd erkennen.

7.2. Expressionssystem des KSPV

Die in dieser Diplomarbeit dargestellten Untersuchungen stehen im Zusammenhang mit der im Jahr 2017 an der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführten Experimenten, bei der ein Insert aus einem grünfluoreszierenden Markergen (GFP) und Ubiquitin verwendet wurde, um das Expressionssystem von KSPV näher zu charakterisieren (Jehle und Szameitat 2017).

Das GFP kann in der Fluoreszenzmikroskopie direkt nachgewiesen werden, wodurch visuelle Darstellungen in lebenden Zellen und Proteininteraktionen nachgewiesen werden können (Ehrenberg 2008).

Das Fremdprotein Ubiquitin spielt eine wichtige Rolle im Proteinmetabolismus, unter anderem beim Abbau und der Faltung und ist außerdem wichtig in Bezug auf die Abwehr von Viruserkrankungen (Thelander 2004, Hicke und Riezman 1996).

Eingefügt wurde das Insert in das Genom zwischen dem Core Protein und der N-terminalen Autoprotease Npro der klassischen Schweinepest. Untersucht und teilweise bestätigt wurde die proteasomale Degradation des getesteten Antigens GFP durch das fusionierte Ubiquitin (Jehle und Szameitat, 2017).

Dadurch entsteht ein Zusammenhang, da das klassische Schweinepestvirus T-Zell Antigene als Ubiquitininfusion über SLA-I an der Zelloberfläche exprimieren könnte. Um diese Verbindungen zu bestätigen, müssen jedoch zuerst weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

7.3. Infektion von primären Zellen mit dem Virus der klassischen Schweinepest

Grundlage für diese Untersuchung war eine Publikation, in der die Herunterregulierung der oberflächenständigen SLA-I Komplexe bereits publiziert wurde (Wang et al. 2010).

Als Positivkontrolle diente eine Zellprobe, die 24 Stunden mit PRRSV AUT15-33 infiziert und mit Anti-N Cy3 konjugiert inkubiert wurde.

Die Abbildung 13a und 13b dargestellten Histogramme zeigen die Ergebnisse jener PAMs, die mit mAk PT85A und mAk A18 inkubiert wurden. Es wurde jeweils eine Probe mit KSPV Alfort/Tü infiziert (türkis) und zwei Vergleichsproben nicht infiziert (grau).

Da die in dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuche mit primären, porzinen Alveolarmakrophagen nach selbigem Protokoll, das für die Infektion, Färbung und Auswertung der SK-6 Zellen durchgeführt wurde, konnte die Anwendung auf primäre Zellen bestätigt werden.

Des Weiteren konnte durch die Versuchsreihe festgestellt werden, dass PRRSV bereits 24 Stunden p.i. zu einem hohen Verlust der Zellzahl führt. Da das Hauptaugenmerk dieser Diplomarbeit jedoch auf der Infektion der SK-6 Zellen und der Fragestellung der SLA-I Expression lag wurden hier keine weiteren Versuche durchgeführt. Um genaue Zahlen zu

erhalten, müssten weitere Infektionen mit PRRSV durchgeführt werden um eine aussagekräftige Statistik erstellen zu können.

7.4. Schwierigkeiten bei der Umsetzung der Experimente

Trotz der relativ einfachen Fragestellung dieser Diplomarbeit, gab es technische Schwierigkeiten bei der Umsetzung dieser Versuchsreihe. So wurden zahlreiche Vorversuche durchgeführt, um die geeigneten Bedingungen zu finden.

Nach der Fixierung mit 4°C kaltem Paraformaldehyd 4%, PH 7.0, für 20 Minuten, klebte eine hohe Anzahl an Zellen an den Reaktionsgefäßen fest. Selbst eine Erhöhung der Zentrifugationszahl auf 2.000 rpm für zwei Minuten brachte keine Besserung der Zellzahlen. Des Weiteren zeigten sich trotz sorgfältiger Resuspendierung und *vortexen* zwischen den einzelnen Inkubationsschritten eine große Anzahl an Zellklumpen bei der Messung im Durchflusszytometer.

Bevor die Zellreihen mit dem mAk A18 inkubiert werden konnten, mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. In den ersten Versuchen wurden die Zellen zunächst fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1% Triton X-100 bedeckt, in den folgenden Versuchsreihen mit 0,5 % Triton X-100 für 10 Minuten auf Eis gelegt. Leider führten beide Verdünnungen zu hohen Zellverlusten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das 1% Triton X-100 die Zellen bei der Permeabilisierung zu stark zerstörte.

Auch der Umstieg von 6-Well Platten auf 10 cm Zellschalen, wobei von einer Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen pro ml ausgegangen wurde, brachte nicht die gewünschte Steigerung in der Zellzahl.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die Verklumpung der Zellen auf nicht gut durchgeführte Resuspendierung der Zellen während der Waschungsschritte zurückzuführen ist, da die Probleme der Zellverluste mit der Verwendung des Testkits endeten.

Um die Zellen zusätzlich zu schonen, wurde nach den Vorversuchen auf reines PBS nach der Virusinfektion verzichtet. Bei der Durchführung der in dieser Arbeit festgehaltenen Versuche, wurde während der Inkubationsschritte mit den verschiedenen Antikörpern sowie während der Waschschrte, PBS+ BSA 1% verwendet. Dies sollte dazu führen, dass weniger Zellen für die später durchgeführte Zellzählung zur Verfügung stehen.

Erst mit der Verwendung eines kommerziellen Fixierungs- und Permeabilisierungskits (Leucoperm von Biorad) funktionierte die Fixierung sowie die Permeabilisierung der Zellen einwandfrei. Bei der Zellmessung im *AMNIS flow* Durchflusszytometers zeigten sich weniger Zellklumpen und deutlich weniger Zellverluste.

Um jene Experimente ohne Testkit durchzuführen, müsste man erneut Versuche durchführen, um die Schritte der Fixierung sowie der Permeabilisierung zu optimieren. Möglich wäre eine längere Fixierung in 4%igem PFA 4°C und eine Erhöhung der Zentrifugationszahl, wobei hier mit höheren Zellverlusten durch zerstörte Zellen zu rechnen ist. Auch eine Änderung in der Konzentration bzw. der Inkubationszeit von Triton X-100 wäre möglich, wobei es auch hier zu erhöhten Zellbeschädigungen oder nicht ausreichend permeabilisierte Zellen kommen könnte.

8 Zusammenfassung

Pestiviren aus der Familie der *Flaviridae* führen zu Krankheiten, die bei Nutztieren eine wichtige Rolle spielen und wirtschaftlich von großem Interesse sind.

Eine Forschungsgruppe zeigte bereits, dass das Bovine Virusdiarrhoe Virus die Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen verändert (Sang-Ryul Lee et al. 2008).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie eine Infektion mit dem klassischen Schweinepestvirus (KSPV) die Expression der SLA-I Moleküle beeinflusst.

Dabei wurden „Swine Kidney 6“ Zellen in der Zellkultur mit dem KSPV infiziert. Anschließend wurden die Proben mit primären und sekundären Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Ein zweites Experiment beschäftigt sich mit dem Vergleich der SLA-I Expression von KSPV und dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV). Da sich PRRS Viren Typ 1 nur in primären Alveolarmakrophagen außerhalb des Wirtes vervielfältigen, wurden diese Zellen für die zweite Versuchsreihe gewählt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit KSPV in SK-6 Zellen nicht zu einer Herunterregulierung am SLA-I führt.

Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse bereits bekannte Ergebnisse (Wang et al. 2010), wonach es bei PRRSV zu einer verminderten Expression am SLA-I kommt.

9 Summary

Pestiviruses from the family *Flaviridae* lead to diseases that play an important role in livestock and are economically of great interest.

A research group has already shown that bovine virus diarrhea virus (BVDV) alters the expression of MHC-I and MHC-II molecules (Sang-Ryul Lee, et al. 2008).

This work deals with the question how an infection with the classical swine fever virus (CSFV) influences the expression of the SLA-I molecules.

In the process, "Swine Kidney 6" cells were cultured and infected with CSFV. Subsequently, the samples were labeled with primary and secondary antibodies and measured by flow-cytometry.

A second experiment deals with the comparison of the downregulation of SLA-I expression in classical swine fever virus (CSFV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected cells. Since PRRSV Type 1 multiplies only in primary alveolar macrophages outside the host, these cells were chosen for the second series of experiments.

The results show that infection with CSFV in SK-6 cells does not lead to downregulation of SLA-I Expression.

Furthermore, the results confirm previously known research (Wang et al. 2010) that reduced expression of SLA-I occurs in PRRSV infected cells.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Replikationszyklus der Familie Flaviridae, Bildquelle: Lindenbach et al. aus „Fields Virology 5th Edition“, 2007, Kapitel 33, S. 1003

Abbildung 2: Struktur des behüllten Pestivirus, Bildquelle: ViralZone 2010, Swiss Institute of Bioinformatics., Von: <https://viralzone.expasy.org/39> (01.09.2019)

Abbildung 3: Polyprotein Prozessierung des Pestivirusgenoms, Bildquelle: N. Tautz Von: www.vuz-uni-luebeck.de (29.08.2019)

Abbildung 4: verschiedene Trächtigkeitsstadien und Auswirkungen der verschiedenen Infektionszeitpunkte von BVDV, Bidquelle: Gerrit Dirksen, aus „Innere Medizin und Chirurgie des Rindes“, 2006, Kapitel 6.10., S. 575

Abbildung 5: Aufbau des PRRS- Virus, Bildquelle: Susanne Modrow et al. aus „Molekulare Virologie“, 2010, Kapitel 14, S. 240

Abbildung 6: Klinische Erscheinung des PRRSV in a) Sauen und b) Ferkel, Bildquelle: Sinn, L. et al. 2016, Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria, Porcine health management 2:28

Abbildung 7: Aufbau der MHC-I (links) und MHC-II Moleküle (rechts) an der Zelloberfläche, Bildquelle: Christine Schütt und Barbara Broecker, Aus Grundwissen Immunologie, 2009, 3.Auflage, Kapitel 2, S. 25

Abbildung 8: Transport der viralen Peptidfragmente an die Zelloberfläche, Bildquelle: Kenneth Murphy et al. Aus „Janeway Immunologie“, 2018, Kapitel 1, S. 44

Abbildung 9: Erkennung der vom MHC-I Molekül präsentierten Virusantigene, Bildquelle: Kenneth Murphy et al. Aus „Janeway Immunologie“, 2018, Kapitel 1, S. 45

Abbildung 10: Anordnung der Genregionen innerhalb des MHC Locus bei Schwein und Mensch, Bildquelle: Ian R. Tizard aus „Veterinary Immunology“, 2013, Kapitel 11, S. 107

Abbildung 11: Messung der SK-6 Zellen nach Infektion von 24 Stunden

Abbildung 12: Graphische Darstellung der infizierten SK-6 Zellen

Abbildung 13: Histogramme der porzinen primären Alveolarmakrophagen

11 Literaturverzeichnis

Literaturquellen:

Ackermann M., 2013, RNA- Viren; In: Virus- Handbuch für Veterinärmediziner, Mathias Ackermann (Hrsg.), Bern: Haupt Verlag, S. 105- 313

Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.-J., Becher P., 2001, Evidence for the presence of two novel pestivirus species., *Virology* 286, S. 456-465

Büttner M., 2007, Allgemeine Virologie, In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Rolle, M. und Mayr A. (Hrsg.), 8. überarbeitete. Auflage, Stuttgart: Enke Verlag, S. 60-135

Chardon P., Remard C., Rogel Gaillard C., Vaiman M., 2000, The porcine Major Histocompatibility Complex and related paralogous regions: a review, *EDP Genetics Selection Evolution* Vol. 32, S. 109-128

Dahle J., Liess B., 1992, A review of classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology, *Comparative Immunology, Microbiology& Infectious Diseases* Vol. 15. 3, S. 203-2011

Edwards S., Fukusho A., Lefevre P. C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehle P., 2000, Classical swine fever: the global situation., *Veterinary Microbiology*, Vol. 73, S. 103–119

Ehrenberg M., 2008, Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2008: The green fluorescent protein: discovery, expression and development., Stockholm, Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften

Eich K.- O., U. Schmidt, 2000, fieberhafte Allgemeinerkrankungen; Fruchtbarkeitsstörungen In: Handbuch Schweinekrankheiten, K.-O Eich (Hrsg.), U. Schmidt, Münster: Landwirtschaftsverlag GmbH, S. 55-66; S. 112-132

Faaberg. K.S., Balasuriya, U.B., Brinton, M.A., Gorbalenya, A.E., Leung, F.C-C., Nauwynck, H., Snijder, E.J., Stadejek, T., Yang, H. and Yoo, D, 2011, ICTV 9th Report

Firth C., Bhat M., Firth M. A., Williams S. H., Frye M. J., Simmonds P., Conte J., Ng J., Garcia J., Bhuva N.P., Lee B., Che X. Quan P.-L., Lipkin W. I., 2014, Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City, *mBio*, e01933-14

Fritzemeier J., Teuffert J., Greier-Wilke I., Staubach Ch., Schlüter H., Moennig V., 2000, Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s, *Veterinary Microbiology*, Vol. 77, S. 29-41

Heinritzi K., 2006, Virale Infektionskrankheiten In: Schweinekrankheiten, Heinritzi, Gindele, Reiner, Schnurrbusch, Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, S. 111-114

Hewitt E., 2003, The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion, *Immunology* 110, S. 163-169

Hicke L., Riezman H., 1996, Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, Vol. 84, S. 277–287

Jehle M., Szameitat M., 2017, Konstruktion und Evaluation eines Vektorsystems auf der Basis des Klassischen Schweinepestvirus: a.) Szameitat: Konstruktion und Anwendung des Vektorsystems b.) Jehle: Evaluation der metabolischen Stabilität der Expressionsprodukte., Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien

Kaaden O.R., 2003, Seuchenhafter Spätabort der Schweine, In: Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren, Bernd Liess und Oskar-Rüger Kaaden (Hrsg.), 2. Aktualisierte und erweiterte Auflage, Hannover: Schlütersche GmbH, S. 86-87

König M., Lengsfeld T., Pauly Thomas, Stark R., Thiel H.-J., 1995, Classical Swine Fever Virus: Independent Induction of Protective Immunity by Two Structural Glycoproteins, *Journal of Virology*, Vol. 69, S. 6479–6486

Krey T., Thiel H. J., Rügenapf T., 2005, Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry., *Journal of Virology*, Vol. 79, S.4191-4200

Kuhn J.H., Lauck M., Bailey A.L., Shchetinin A.M., Vishnevskaya T.V., Bào Y., Ng T.F., LeBreton M., Schneider B.S., Gillis A., Tamoufe U., Dikko Jle. D., Takuo J.M., Kondov N.O.,

Coffey L.L., Wolfe N.D., Delwart E, Clawson A.N., Postnikova E, Bollinger L, Lackemeyer M.G., Radoshitzky S.R., Palacios G, Wada J, Shevtsova Z.V., Jahrling P.B., Lapin B.A., Deriabin P.G., Dunowska M, Alkhovsky S.V., Rogers J, Friedrich T.C., O'Connor D.H., Goldberg T.L., 2016, Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Archives of Virology*, S. 755-768

Lanyon R., Hill F. I., Reichel M. P., Brownlie J., 2014, Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis, *The Veterinary Journal*, Vol. 199, S. 201-209

Liess B., 2003, Europäische Schweinepest, In: *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren*, Bernd Liess und Oskar- Rürger Kaaden (Hrsg), 2. Aktualisierte und erweiterte Auflage, Schlütersche GmbH, S. 78-80

Lindenbach B.D., Thiel H.J., Rice C.M., 2007, *Fields Virology*, 5th Edition, D.M. Knipe and P.M. Howley, Philadelphia: Eds. Lippincott-Raven Publishers

Lunney J. K., 1994, Current status of the swine leukocyte antigen, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 43, S. 19-28

Lunney J.K., Ho C.S., Wysocki M., Smith D. M., 2009, Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex, *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 33, S. 362–374

Mayr A., O.-R. Kaaden, 2007, Viruskrankheiten der Tiere, In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Rolle, M. und Mayr A. (Hrsg.), 8. Überarbeitete Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 136- 343

Moening V., 2003, Bovine Virusdiarrhoe oder Mucosal Disease, In: *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren*, Bernd Liess und Oskar-Rürger Kaaden (Hrsg.), 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, Hannover, Schlütersche GmbH, S. 34- 37

Modrow S., 2010, Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Pulsstrangorientierung; In: Molekulare Virologie; Susanne Modrow, Dietrich Falke, Uwe Truyen, Hermann Schätzl, 3. Illustrierte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, S. 145-261

Murphy K., Weaver C., 2018, Die Erkennung von Antigenen, In: Janeway Immunologie, Kenneth Murphy, Casey Weaver, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum Verlag, 9. Auflage, S.175-327

Nettleton P.F., Entrican G., 1995, Ruminant Pestiviruses, British Veterinary Journal, Vol. 151, S. 615

Ribbens S., Dewulf J., Koenen F., Laevens H., de Kruif A., 2004, Transmission of classical swine fever. A review., Veterinary Quarterly, Vol. 26:4, S.146-155

Robinson J, Waller M.J., Stoehr P, Marsh S.G., 2005, IPD- the Immuno Polymorphism Database., Nucleic Acids Research Vol. 33, S. 523–526

Rock K. L., Reits E., Trends J. N., 2016, Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules, Trends Immunology, Vol. 37, S. 724–737

Rümenapf T., Meyers G., Stark R., Thiel H. J., 1991, Molecular characterization of hog cholera virus, Archives of Virology Supplementa, Vol. 3, S. 7-18.

Rümenapf, T., Unger G., Strauss J.H., Thiel H.J. Thiel, 1993, Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses, Journal of Virology, Vol. 67, S. 3288-3294

Rümenapf, T., Thiel, H. J., 2008, Molecular Biology of Pestiviruses, In: T. C. Mettenleiter and F. Sobrino. Animal viruses: molecular biology, Wymondham, Caister Academic, S. 39-96

Sang- Ryul L., Nanduri B., Pharr T.G., Stokes J.V., Pinchuk L. M., 2008, Bovine Viral Diarrhea infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes, Biochimica et Biophysica Acta , Vol.1796, S. 14-22

Schütt C., Broeker B., 2009, Wie erkennen die Immunzellen ein Antigen, In: Grundwissen Immunologie, Christine Schütt,(Hrsg.), Barbara Broeker, 2. Illustrierte Ausgabe, Spektrum akademischer Verlag, S. 22-33

Simmonds P., Becher B., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T., and ICTV Report Consortium 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, Journal of General Virology, Vol. 98, S.2–3

Sinn L. J., Klingler E., Lamp, B., Brunthaler R., Weissenböck H., Rumenapf T., Ladinig A., 2016, Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria, Porcine health management Vol. 2, S. 28.

Thelander L., 2004, Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2004: Ubiquitin-mediated proteolysis, Stockholm, Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften

Thiel H. J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Houghton M., Meyers G., Purcell R.H., Rice C.M., 2005, Family Flaviviridae. In: C. Fauquet. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford: Elsevier/Academic Press, S. 981-998

Tizard I.R., 2004, Acquired immunity: Antigen-Presenting Receptors, In: veterinary Immunology, Elsevier/Saunders Verlag, 7. Auflage, S. 67-77

Tizard I. R., 2013, The Major Histocompatibility Complex, In: Veterinary Immunology- E book, Elsevier/Saunders Verlag, 9.Auflage, S. 102-113

Vaiman M., Chardon P., Rothschild M.F., 1998, Porcine major histocompatibility complex, Revue scientifique technique, International Office of Epizootics, Vol. 17, S. 95-107

Wang X., Eaton M., Mayer M., Li H., He D., Nelson E., Christopher-Hennings J., 2007, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derive dendritic

cells and compromises their antigen-presenting ability, *Archives of Virology*, Vol. 152 2, S. 289–303

Weiland E., Stark E., Haas B., Rüménapf T., Meyers G., Thiel H.J., 1990, Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of a Disulfide-Linked Heterodimer, *Journal of Virology*, Vol. 64, S. 3563- 3569

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.N.A., ter Laak E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J.M., Moonen P.L.J.M., Zetstra T., de Boer E.A., Tibben H.J., de Jong M.F., van 't Veld P., Greenland G.J.R., van Gennep J.A., Voets M.Th., Verheijden J.H.M., Braamskamp J., 1991, Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus, *Veterinary Quarterly*, Vol.13:3, S. 121-130

Wieczorek M., Abualrous E., Sticht J., Alvaro-Benito M., Stolzenberg S., Noé F., Freund Ch., 2017, Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation, *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, S. 292

Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., Zhang J., Dong J., Sun L., Du J., Liu L., Xue Y., Wang J., Yang F., Zhang S., Jin Q., 2012, Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology*, Vol. 86, S. 10999–11012

Yewdell J. W., Bennink J. R., 1992, Cell Biology of Antigen Processing and presentation to major Histocompatibility Complex Class I Molecule-Restricted T Lymphocytes, *Advances in Immunology* , Vol. 52, S. 1-12

York I. A., Rock, K. L, 1996, Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex, *Annual Review of Immunology*, Vol. 14, S. 369-396

Zimmerman J.J., Yoon K.-J., Wills R.W., Swenson S.L., 1997, General overview of PRRSV: A perspective from the United States, *Veterinary Microbiology*, Vol. 55, S.187- 196

Gesetzesquellen:

Verordnung des Bundesministers für soziale Sicherheit und Generationen über Schutz- und Tilgungsmaßnahmen zur Bekämpfung der Klassischen Schweinepest bei Hausschweinen (Schweinepest-Verordnung 2003), StF: BGBl. II Nr. 199/2003

Gesetz vom 6. August 1909, betreffend die Abwehr und Tilgung von Tierseuchen (Tierseuchengesetz TSG), StF: RGBl. Nr. 177/1909

Sonstige Quellen:

ICTV, veröffentlicht 2017, überarbeitet 2019, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (zuletzt eingesehen am 12.10.2019)

Luminex Corporation, 2019, Amnis®Imaging Flow Cytometers, Microscopy in Flow www.luminexcorp.com/wp-content/uploads/2019/06/BR168187.FlowCyt.Amnis_.WR_.pdf (zuletzt eingesehen am 23.09.2019)