

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
(Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner)

Interaktion von Influenza A Virus Subtypen mit primären porcinen Fibrozyten

Inaugural-Dissertation

zu Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Stephanie Maier
aus Mannheim

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Sutter

Korreferent: Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
I. Einleitung	1
Zielsetzung	3
II. Literaturübersicht	4
1. Fibrozyten	4
1.1 Ursprung und Morphologie.....	4
1.2 Die Differenzierung von Fibrozyten beeinflussende Faktoren	5
1.3 Differenzierung der Fibrozyten anhand ihrer Oberflächenmarker.....	7
1.4 Oberflächenmarker und sezernierte Proteine	9
1.5 Funktion	13
1.5.1 Fibrozyten und Wundheilung.....	13
1.5.2 Fibrozyten und Immunabwehr	15
1.6 Schweinefibrozyten.....	17
1.7 Fibrozyten in pathologischen Prozessen	19
2. Interaktion von Influenza A Virus Subtypen mit Schweinezellen.....	21
III. Material und Methoden	25
1. Material	25
1.1 Zellen.....	25
1.1.1 Zelllinien	25
1.1.2 Primärzellen	25
1.2 Zellkulturmedien	25
1.3 Antikörper	25
1.3.1 ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot Test).....	25
1.3.2 Immunhistologie	26
1.3.3 Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting, FACS).....	26
1.4 Viren.....	27
1.4.1 Laborvirusstämme.....	27
1.4.2 Feldvirusisolate	27
1.5 Nukleinsäuren und Oligonukleotide	28
1.5.1 Primer.....	28
1.5.2 Sonden für die PanInfluenza RT-Real-Time-quantitative PCR (RT-qPCR) .	30
1.6 Chemikalien und Reagenzien.....	30
1.7 Zusätze für Zellkulturmedium.....	32
1.8 Enzyme und Kits	32
1.8.1 Enzyme.....	32

1.8.2 Kits	33
1.9 Verbrauchsmaterial	33
1.10 Geräte und Laborhilfsmittel	34
1.10.1 Zentrifugen	35
1.10.2 Software	35
2. Methoden	35
2.1 Zellen.....	35
2.1.1 Zellkulturen	35
2.1.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)	36
2.1.3 Fibrozyten (Fb)	37
2.1.4 Hühnerembryofibroblasten (HEF)	37
2.2 Virologische Methoden.....	38
2.2.1 Virusvermehrung.....	38
2.2.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen und Zelllysaten.....	39
2.2.3 Virustitration	39
2.2.4 Hämagglutinationstest.....	40
2.3 Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1 Primerauswahl.....	40
2.3.2 Extraktion von Nukleinsäure.....	41
2.3.3 Reverse Transkription (RT)	42
2.3.4 Konventionelle PCR	43
2.3.5 Agarosegelelektrophorese.....	45
2.3.6 Real-Time-quantitative PCR.....	46
2.4 Immunologische Methoden.....	48
2.4.1 Interferon- α ELISPOT (Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Test)	48
2.4.2 Vesikulärer Stomatitis Virus-Hemmtest	49
2.4.3 Immunhistologie	52
2.5 Durchflusszytometrische Analysen.....	53
2.5.1 Markierung von Zelloberflächenantigen.....	54
2.5.2 Intrazellulärer Kollagennachweis.....	55
IV. Ergebnisse.....	58
1. Gewinnung der Influenza Virus Isolate	58
2. Lichtmikroskopische Morphologie von porcinen peripheren Fibrozyten.....	62
3. Virusnachweis	70
3.1 Vermehrungsfähigkeit der Influenza A Virussubtyp Isolate	70
3.1.1 Vermehrung in Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK).....	70
3.1.2 Vermehrung in Fibrozyten	72
3.1.3 Zellspektrum des Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	78
3.2 Vermehrungsfähigkeit im Hühnerei.....	79

3.3 Genomnachweis in Zellkulturüberständen und Zelllysaten.....	80
4. Interferon- α Nachweis und antivirale Wirksamkeit.....	84
4.1 Interferon- α Sekretion	84
4.1.1 Interferon- α Sekretion von porcinen PBMC.....	85
4.1.2 Interferon- α Sekretion von porcinen Fibrozyten.....	88
4.1.3 Vergleich der Interferon- α Sekretion von porcinen PBMC und Fibrozyten..	90
4.2 Ermittlung antiviraler Wirksamkeit gegen Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) .	92
4.3 Vergleich der Sekretion antiviraler Substanzen im ELISPOT und VSV-Test	96
V. Diskussion	99
1. Charakterisierung porciner Fibrozyten	99
2. Vermehrungsfähigkeit von Influenzaviren in porcinen Fibrozyten.....	101
3. Antivirale Aktivität der Fibrozytenüberstände.....	105
VI. Zusammenfassung	112
Interaktion von Influenza A Virus Subtypen mit primären porcinen Fibrozyten	112
VII. Summary	114
Interaction of Influenza A virus subtypes with primary porcine fibrocytes	114
VIII. Literaturverzeichnis	116
IX. Anhang	127
1. Genomsequenzen	127
1.1 Gesamtgenomsequenz des Influenza A Virus A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	127
1.2 Sequenzen Schweineinfluenza H1N1 140	133
2. Abbildungsverzeichnis.....	134
3. Tabellenverzeichnis.....	135
X. Danksagung	137

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Smooth muscle actin
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
avi	aviär
Bic.	Bikarbonat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaar
Ca	Kalzium
CaCo-2	humane Adenokarzinomzelllinie
CCR/ CXCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpE	zytopathogener Effekt
CSFV	klassisches Schweinepestvirus
C _t	cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EID	Eiinfektiöse Dosis
EK	Erythrozytenkontrolle
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked-immuno Spot Technique
ESK	embryonale Schweinenierenzellen
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fb	Fibrozyten
FBS	Fetales Bovines Serum
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
for.	forward
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
GRO	Growth-related-oncogene
GV	Gebrauchsverdünnung
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HAE	hämagglutinierende Einheit

HEF	Hühnerembryofibroblasten
HeLa	humane Zervikalkarzinomzelllinie
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HRP	Horse Radish Peroxidase
IB-RS-2	Schweinenierenzelllinie
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	Incorporate
KID	Kulturinfektiöse Dosis
KG/KGaA	Kommanditgesellschaft/Kommanditgesellschaft auf Aktien
KoV	Kontrollvirus
LMU	Ludwig Maximilians Universität
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
mAb	monoklonaler Antikörper
mAmp	Milliampere
MEM	Minimal Essential Medium
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MDBK	Madin Darby bovine kidney
MDCK	Madin Darby canine kidney
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility molecule
Min.	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Stichprobenanzahl
NA	Neuraminidase
n. d.	nicht durchgeführt
NDV	Newcastle Disease Virus
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NIP	natural interferon producing cells
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
n. m.	nicht messbar
NPTr	Trachealzellen neugeborener Schweine
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NSF	Nephrogene Systemische Fibrose
NSK	Nierenzellen neugeborener Schweine
ORFV	ovines Parapoxvirus D 1701
PA	Polymerase acid

PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Strukturen
PB2	Polymerase Basic 2
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphathaltige Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pDC	plasmazytäre Dendritische Zellen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFT	Schweineeileiterzellen
pg	Pikogramm
p. i.	post inoculationem
PK-15	Schweinenierenzellen 15
porc.	porcin
qPCR	quantitative PCR
rev.	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RIG-1/IPS-1	Retinoic acid-inducible gene I/ IFN promoter-stimulating factor 1
SAP	Serum Albumin P
Sek.	Sekunde
sPBS	steriles PBS
SPF	spezifisch pathogen-frei
SJPL	St. Jude porcine Lungenzellen
SK	Schweinenierenzellen
SLC	Secondary lymphoid tissue chemokin
SSC	Side-Scatter
ST	Schweinehodenzellen
Sw.	Schwein
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-receptor, toll-ähnliche Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehung/ Unit
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
W2	Waschlösung 2

I. Einleitung

Influenza A Viren, wie der zuletzt aufgetretene humane H1N1 Pandemiestamm, machen deutlich, dass die Familie Orthomyxoviridae Virusspezies enthält, von denen ein erhebliches Gefahrenpotential für Mensch und Tier ausgeht. Influenza A Viren sind behüllte Viren, deren Genom in acht einzelsträngige RNA-Segmente gegliedert ist. Aufgrund ihrer Hüllmembranproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) werden sie in 16 verschiedene HA- und neun verschiedene NA-Subtypen eingeteilt (Fouchier et al., 2005).

Durch das Entstehen neuer, antigenetisch verschiedener Influenzasubtypen gegen die keine ausreichende Immunität in der Wirtspopulation vorhanden ist, kann es zu pandemischen Ausbrüchen kommen. Das Schwein kann bei der Entstehung neuer Influenzavirussubtypen eine besondere Rolle spielen, da es in seinem Respirationstrakt Rezeptoren besitzt, die von humanen und auch von aviären Influenzaviren bevorzugt werden. Diese Glykoproteinrezeptoren, an die das Influenza A Virus bindet, unterscheiden sich in der Position der Sialinsäurereste (human: α 2-6 und aviär: α 2-3) (Rogers und Paulson, 1983). Aus diesem Grund besteht somit in seltenen Fällen die Möglichkeit, dass das Schwein gleichzeitig mit einem humanen und einem aviären Influenza A Virussubtyp infiziert ist und als sogenanntes ‚Mixing-Vessel‘ fungiert (Brown, 2008; Ito et al., 1998; Scholtissek et al., 1985). Wird eine Schweinezelle auf diese Weise koinfiziert, kann es zu einem Antigen-Shift, d. h. zur Neuordnung und Mischung ganzer Gensegmente der beiden Virussubtypen kommen. Durch das genetische Reassortment zweier Virussubtypgenome kann ein völlig neuer Influenza A Virussubtyp entstehen, der Genomsegmente beider „Elternviren“ enthält.

Fibrozyten sind Zellen die, funktionell einer Kombination aus Fibroblasten und Leukozyten entsprechen. Sie haben antigenpräsentierende Eigenschaften und ähneln in ihrer Funktion Dendritischen Zellen (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997). Durch ihre Eigenschaft Fremdartigene aufzunehmen und zu präsentieren, haben porcine Fibrozyten ein besonders hohes Potential zur

Aufnahme von Mikroorganismen, u.a. auch Viren. Ob sich Influenza A Viren produktiv in porcinen Fibrozyten vermehren können, gilt es zu klären. Fibrozyten sezernieren eine Reihe pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (Chesney et al., 1998) und sind somit ein wichtiger Teil der unspezifischen Immunantwort. Die antivirale Abwehrfunktion porciner Fibrozyten wurde bisher nur nach der Infektion mit dem Klassischen Schweinepestvirus (CSFV) durch die Stimulation zytotoxischer T-Zellen zur Produktion von Interferon gamma (IFN- γ) gezeigt (Balmelli et al., 2005). Neuere Untersuchungen von Balmelli et al. (2007) auf eine mögliche Produktion und Sekretion von IFN- γ und des höchst potenten, antiviralen Interferon alpha (IFN- α) durch porcine Fibrozyten ergaben keine messbaren Interferonwerte nach der Stimulation mit CSFV und selbst genverändertes CSFV (CSFV^{Npro}) führte bei porcinen Fibrozyten nach Kontakt mit CSFV lediglich zu einer geringen Produktion von Interferon- α / β (Balmelli et al., 2007). Die Interferonproduktion, bzw. die Produktion antiviraler Substanzen durch porcine Fibrozyten nach Influenza A Viruskontakt ist bislang unbekannt.

Zielsetzung

Folgende Ziele wurden mit dieser Arbeit verfolgt:

Die erfolgreiche Etablierung der Kulturbedingungen und die Charakterisierung von porcinen Fibrozyten waren Voraussetzung für alle Versuche. Die Permissivität von porcinen Fibrozyten für ausgewählte Influenza A Virussubtypen ist nicht bekannt. Sie ist speziell für diesen Zelltyp aber ein wichtiges Kriterium, sowohl als möglicher Ort einer Virusvermehrung mit der Reassortanten-Entstehung als auch zur Definition der Influenza A Virus-spezifischen Abwehrfunktion.

Die Untersuchung der Infektionsfähigkeit und die Überprüfung einer produktiven oder abortiven Vermehrung von verschiedenen Influenza A Virusisolaten in primären porcinen Fibrozyten war ein Ziel dieser Studie. Dieses wurde anhand von Zellkulturüberständen und Zelllysaten, durch Einfeldion sowie mit immunhistologischen und molekularbiologischen Methoden erreicht.

Eine Vergleichsanalyse der Sekretion antiviraler Stoffe von primären porcinen Fibrozyten und homologen – vom gleichen Individuum stammenden - porcinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) sollte Aufschluss über die antivirale Kapazität der Zellen geben. Mit Hilfe eines IFN- α ELISPOT und mit einem Vesikulären Stomatitis Virus-Hemmtest (VSV-Hemmtest) wurde nach der Stimulation mit verschiedenen Influenza A Virussubtypen und Kontrollviren die antivirale Kapazität der Zellen anhand von Zellkulturüberständen in Parallelexperimenten untersucht.

Die Zielsetzung der Untersuchung schließt zwei innovative Ansätze ein: A) die Frage nach produktiver oder abortiver Infizierbarkeit porciner Fibrozyten mit Influenza A Viren und B) direkt damit verbunden die Frage nach der Fähigkeit porciner Fibrozyten zur Produktion antiviral wirksamer Zytokine. Damit sollte geklärt werden, ob Fibrozyten durch ihre Abwehrfunktion in der Lage sind eine homologe (porcine) bzw. eine heterologe (aviäre) Influenza A Virusinfektion zu kontrollieren oder ob eine produktive Infektion möglich ist.

II. Literaturübersicht

1. Fibrozyten

1.1 Ursprung und Morphologie

Humane periphere Fibrozyten wurden 1994 von Bucala und seiner Arbeitsgruppe bei einem Forschungsprojekt zur Wundheilung entdeckt. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Zellen, die subkutan implantierte Wundkammern von Mäusen infiltrieren, fielen spindelförmige Zellen auf (Bucala et al., 1994). Bis heute wurden Fibrozyten bei Menschen, Mäusen, Makaken und Schweinen beschrieben (Balmelli et al., 2005; Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Zhu et al., 2000).

Fibrozyten machen in etwa 0,5 % der peripheren Blutleukozyten aus und haben einen Durchmesser von 18,5 μm (Yang et al., 2002).

Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass diese Zellen die extrazellulären Matrixproteine Kollagen I, Kollagen III sowie Fibronektin und Vimentin exprimieren. Ebenfalls werden auf ihrer Oberfläche der Gesamtleukozytenmarker CDRO 45, das hämatopoetische Stammzellantigen CD 34 (cluster of differentiation) und der Panmyeloidmarker CD 13 exprimiert (Bucala et al., 1994).

Kapillarendothelzellen sind Zellen, auf deren Oberfläche CD 34 nachgewiesen wurde und die keine hämatopoetischen Stammzellen sind (Fina et al., 1990). Durch die Expression des Gesamtleukozytenmarkers, sowie des Panmyeloidmarkers auf humanen Fibrozyten und der fehlenden Expression des Endothelzellmarkers von Willebrandfaktor (Bucala et al., 1994) kann jedoch von einem Ursprung aus dem Knochenmark ausgegangen und ein endothelialer Ursprung der Fibrozyten ausgeschlossen werden. Anhand von Versuchen mit radioaktiv markierten Knochenmarkzellen bei chimären Mäusen sollte der myeloide Ursprung der Fibrozyten nachgewiesen werden. Durch die negative Markierung der Fibrozyten gelangten Bucala et al. (1994) zu der Ansicht, dass Fibrozyten entweder von gegen Radioaktivität resistenten Knochenmarkzellen

oder von mesenchymalen Vorläuferzellen abstammen müssen (Bucala et al., 1994).

Bei der Kultivierung von, aus humanem Blut gewonnenen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) entwickeln sich nach ein bis zwei Wochen Fibrozyten (Bucala et al., 1994). Dies veranlasste Abe et al. (2001) zu der Annahme, dass sich Fibrozyten aus einer Subpopulation der kultivierten PBMC entwickeln müssen. Später bewiesen Abe et al. (2001), dass sich aus PBMC gewonnene kultivierte Fibrozyten aus einer Population von CD 14+ Zellen differenzieren.

1.2 Die Differenzierung von Fibrozyten beeinflussende Faktoren

Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Differenzierung von humanen Fibrozyten aus CD 14+ peripheren Monozyten.

Bei der Untersuchung welche Faktoren CD 14+ Monozyten dazu veranlassen, sich zu Fibrozyten zu differenzieren, zeigten Abe et al. (2001), dass der direkte Kontakt von CD 14+ Monozyten mit CD 14- T-Zellen in einem Verhältnis von 1:3 die Differenzierung zu Kollagen+ CD 11b+ Fibrozyten steigert. Die Forschungsgruppe um Yang beschreibt dagegen ein Jahr später, dass der direkte Kontakt zu T-Lymphozyten nicht nötig ist, sondern dass Zellkulturüberstände und das in ihnen enthaltenden Zytokin Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) von CD 14- Kulturen ausreichen, um die Differenzierung von Fibrozyten zu stimulieren (Yang et al., 2002).

Nachdem bekannt war, dass T-Zellen durch ein von ihnen sezerniertes Zytokin CD 14+ Monozyten zur Differenzierung zu Fibrozyten stimulieren können, untersuchten Shao et al. (2008) den Einfluss T-Helfer-Zell-sezernierter Zytokine auf die Differenzierung von humanen Fibrozyten. Diese lassen sich in eine Th1 (IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-10, TNF- β) und eine Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) Zytokingruppe unterteilen. Da die Th2 Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und IL-13 bei Fibroblasten zu einer gesteigerten Kollagenproduktion und

Kollagenablagerung führen und deren Differenzierung zu Myofibroblasten stimulieren (Powell et al., 1999), wurde ihr Einfluss auf die Fibrozytendifferenzierung untersucht. Bei der Kultivierung von humanen PBMC steigerten diese Zytokine die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten. Die Th1 Zytokine IFN- γ und IL-12 hingegen hemmten die Ausdifferenzierung von Monozyten (Shao et al., 2008). IL-12 wirkt dabei nicht direkt auf die Monozyten, sondern es stimuliert die natürlichen Killerzellen zur Produktion von IFN- γ und hemmt somit indirekt die Fibrozytendifferenzierung (Bogdan und Schleicher, 2006; Cooper et al., 2001; Schleicher et al., 2005).

Die Ausschüttung von Th2 Zytokinen spielt aufgrund der im oberen Abschnitt erwähnten Steigerung der Kollagenproduktion von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten, eine große Rolle bei fibrosierenden Erkrankungen (Tredget et al., 2006; Wynn, 2004). Patienten mit fibrosierenden Erkrankungen haben im Gegensatz zu gesunden Menschen einen geringeren Gehalt an Serum Amyloid P (SAP) im Serum (Pilling et al., 2003). SAP ist ein im Blut zirkulierendes Protein, das zur Familie der Pentraxine zählt und bei der Immunantwort eine Rolle spielt (Noursadeghi et al., 2000). Da bei vielen fibrosierenden Erkrankungen Fibrozyten nachgewiesen wurden (Bellini und Mattoli, 2007; Moore et al., 2005; Phillips et al., 2004), könnte es einen Zusammenhang zwischen dem geringen Gehalt an SAP und dem gesteigerten Auftreten von Fibrozyten geben. Pilling et al. (2003) beschrieben den hemmenden Einfluss von SAP auf die Entwicklung von Fibrozyten aus PBMC. Schon geringe Änderungen in der Konzentration von SAP hatten große Auswirkungen auf die Differenzierung von Fibrozyten (Pilling et al., 2003). Patienten mit fibrosierenden Erkrankungen fehlt diese inhibierende Wirkung von SAP für die Ausdifferenzierung von Fibrozyten aus Monozyten (Pilling et al., 2003) damit kann es zu einer überschießenden Produktion und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen kommen (vgl. Abschnitt II 1.7). Die hemmende Wirkung von SAP kann nicht durch die differenzierungsfördernden Zytokine IL-4 und IL-13 aufgehoben werden (Shao et al., 2008).

SAP bindet an Fc-Rezeptoren und gibt auf diesem Weg gebundene Proteine und Bakterien an phagozytierende Zellen weiter (Bharadwaj et al., 2001). Da auch Immunglobulin G (IgG) an Fc-Rezeptoren bindet, untersuchten Pilling et al. (2006) in einer Folgestudie, ob IgG ebenfalls einen Einfluss auf die Fibrozytendifferenzierung hat. Die Fc γ RI bzw. Fc γ RII Rezeptoren auf Monozyten können sowohl von SAP als auch von quervernetztem oder Hitze-aggregiertem monomeren IgG aktiviert werden, was sich negativ auf die Differenzierung der Monozyten zu Fibrozyten auswirkt (Pilling et al., 2006). Die Vernetzung von IgG entsteht durch die Bildung von Immunkomplexen, bei der Bindung von Pathogenen. Bei einer Infektion liegt IgG in größeren Mengen gebunden vor und hemmt somit die Differenzierung der Fibrozyten aus Monozyten. Wie im Abschnitt II 1.5.1 genauer beschrieben, sind Fibrozyten an der Wundheilung beteiligt. Ist eine Wunde infiziert, wird primär eine Beseitigung der Infektion angestrebt und nicht der Wundverschluss durch eine Stimulation der Fibrozytendifferenzierung. Die Vernetzung von IgG aufgrund der vorliegenden Pathogene hemmt die Differenzierung der Fibrozyten, verzögert den Wundschluss und erhält die Anzahl an Monozyten zur angeborenen Immunreaktion.

1.3 Differenzierung der Fibrozyten anhand ihrer Oberflächenmarker

Die Abgrenzung der Fibrozyten von anderen peripheren Blutzellen erfolgt durch ihre Oberflächenmarker und ihre Morphologie. Die Besonderheit der Fibrozyten ist die gleichzeitige Expression der Marker hämatopoetischer Stammzellen CD 34, des Panleukozytenmarkers und die Expression von Kollagen I und weiteren extrazellulären Matrixproteinen.

Die ersten erkennbaren Unterschiede von sich aus Monozyten differenzierenden Fibrozyten zu Monozyten sind morphologische Merkmale, bevor eine Unterscheidung anhand charakteristischer Oberflächenmoleküle möglich ist. Im Gegensatz zu der runden Morphologie der Monozyten mit ihrem

bohnenförmigen Zellkern sind Fibrozyten lichtmikroskopisch als spindelförmige Zellen mit ovalem Zellkern zu erkennen (Pilling et al., 2009a).

Im späteren Entwicklungsverlauf exprimieren Fibrozyten im Gegensatz zu peripheren Monozyten den Stammzellmarker CD 34 auf ihrer Oberfläche. Wohingegen Monozyten unter anderem die Antigene CD 33, CD 35 und CD 93 exprimieren, die sowohl bei Fibrozyten als auch bei Makrophagen nicht oder nur sehr schwach detektierbar sind (Pilling et al., 2009a) und daher der Unterscheidung zwischen diesen Zellpopulationen dienen können.

Die Unterscheidung von Fibrozyten und Makrophagen kann auch anhand des Oberflächenmarkers PM-2K erfolgen, welcher nur von Makrophagen exprimiert wird. Andere Makrophagenmarker wie nicht-spezifische Esterasen werden in geringerem Ausmaß auch von Fibrozyten exprimiert (Pilling et al., 2009a). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von Fibrozyten zu anderen Zellen, die das Gesamtleukozytenantigen CD45RO auf ihrer Oberfläche besitzen, ist die gleichzeitige Expression von Kollagen. Eine Unterscheidung von Makrophagen und Fibrozyten anhand der Kollagenproduktion ist nicht möglich, da auch Makrophagen in einem gewissen Umfang positiv auf Kollagen I getestet wurden (Vaage und Lindblad, 1990). Unklar ist, ob es zu einer eigenständigen Produktion von Kollagen I in Makrophagen kommt oder ob sie durch Aufnahme von Kollagen falsch positiv reagieren (Lucattelli et al., 2003; Vaage und Lindblad, 1990).

Fibroblasten produzieren Kollagen und können daher nicht mit diesem Antigen unterschieden werden. Um Fibrozyten von Fibroblasten zu unterscheiden, können die Proteine TE-7 oder HA-BP sowie zelluläres Fibronektin herangezogen werden, da sie nur von Fibroblasten exprimiert werden (Pilling et al., 2009a).

Im Verlauf der Kultivierung von humanen Fibrozyten wird die Expression von einigen Oberflächenmarkern wie des CD 34 Antigens schwächer. In der Studie von Bellini und Mattoli (2007) wird der Verlust von CD 45 und CD 34 beschrieben, wogegen Pilling et al. (2009a) in ihrer Studie nur von einem CD 34

Verlust sprechen. Auch porcine Fibrozyten - vor allem solche, die durch Subkultivierung aus primären Fibrozyten entstehen, sogenannte sekundäre Fibrozyten - exprimieren die Antigene MHC Klasse II, CD 1, CD 14, und CD 16 nicht länger auf ihrer Oberfläche (Balmelli et al., 2005).

1.4 Oberflächenmarker und sezernierte Proteine

Die Fibrozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche eine Reihe von charakteristischen Oberflächenmarkern. Eine Zusammenfassung, der auf der Oberfläche von primären humanen Fibrozyten exprimierten Antigene gibt die folgende Tabelle wieder.

Tab. 1: Expression auf primären humanen Fibrozyten in vitro

Marker	Funktion	Nachweis auf anderen Zellen
CD 11a	Adhensionsmolekül	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten
CD 11b	Adhensionsmolekül	Monozyten, Granulozyten, natürliche Killer-Zellen (NK)
CD 11c	Integrin alpha X	Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, B-Lymphozyten,
CD 13	Panmyeloidmarker	Myeloide und Dendritische Zellen
CD 18	β 2-Integrin	Myeloide und Dendritische Zellen
CD 29	β 1-Integrin	Epithelzellen
CD 34	Hämatopoetischer Stammzellmarker	Hämatopoetische Stammzellen, embryonale Fibroblasten
CD 40 schwach		B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Endothelzellen
CDRO45	Panleukozytenmarker	Leukozyten
CD 49 a	α 1-Integrin	
CD 49 b	α 2-Integrin	

Fortsetzung der Tab. 1		
Marker	Funktion	Nachweis auf anderen Zellen
CD 49 e	$\alpha 3$ -Integrin	
CD 54	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül	Monozyten, Lymphozyten
CD 58	Adhäsionsmolekül	Antigenpräsentierende Zellen, Makrophagen
CD 61	$\beta 3$ -Integrin	Thrombozyten
CD 71	Transferrinrezeptor	Makrophagen, aktivierte Zellen
CD 80	Ko-Stimulator von CD 28	Antigenpräsentierende Zellen
CD 86	Ko-Stimulator von CD 28	Antigenpräsentierende Zellen
CD 105	Endoglin, Teil des TGF β Rezeptorkomplex	Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen
CD 148	Rezeptor-Typ Tyrosin-Protein Phosphatase η	Leukozyten
CD 162	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1	Zirkulierende Leukozyten
MHC II Moleküle HLA-DR HLA-DP HLA-DQ	Major histocompatibility molecule zur Antigenpräsentation	Antigenpräsentierende Zellen
Chemokinrezeptoren: CCR1 CCR3 CCR4 CCR5 CCR7 CCR9 CXCR1 CXCR3 CXCR4		Lymphozyten promyeloide Zellen aktivierte Lymphozyten unreife CD 34+ Zellen

Fibrozyten produzieren und sezernieren eine Reihe von Proteinen. In der folgenden Tabelle werden die von primären humanen Fibrozyten produzierten und sezernierten Proteine zusammenfassend aufgelistet.

Tab. 2: Proteine, die von primären humanen Fibrozyten produziert und sezerniert werden

Protein	Funktion	Sekretion von anderen Zellen
Angiogenin	Angiogenese	Fibroblasten, Tumorzellen
Basic fibroblast growth factor (bFGF) <i>Sekretion</i>	Angiogenese, Chemotaxis und Mitogen für Endothelzellen; Wund- und Gewebeheilung; stimuliert Endothelzellen und neuronale Zellen	Fibroblasten, Tumorzellen
Fibronectin	Perizelluläre Matrix	Mesenchymale Zellen, lymphoide Zellen
Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) <i>Sekretion</i>	Stimuliert Wachstum und Differenzierung von myeloiden, monozytären Zellen und Dendritischen Zellen	Makrophagen, T-Lymphozyten
Growth-related-oncogene α (GRO α) <i>Sekretion</i>	Chemotaxis und Aktivierung neutrophiler, basophiler Granulozyten	Fibroblasten, Monozyten, Melanozyten, Epithelzellen
Interleukin-1 α (IL-1 α) <i>Sekretion</i>	T-Lymphozyten und Makrophagen Aktivierung	Makrophagen, Epithelzellen
Interleukin-6 (IL-6) <i>Sekretion</i>	Lymphozyten Aktivierung in Wundreparation; Abwehr, Akute-Phase-Reagent, Immunantwort, Hämatopoese	T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Hepatozyten, Endothelzellen
Interleukin-8 (IL-8) <i>Sekretion</i>	Chemotaxis von neutrophilen, basophilen, eosinophilen Granulozyten, T-Lymphozyten	Keratinozyten, neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten
Interleukin-10 (IL-10) <i>Sekretion</i>	Antiinflammatorisches Zytokin	Monozyten, Th2-Zellen
Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) <i>Sekretion</i>	Makrophagen/Monozyten Aktivierung bei der Wundheilung	Glatte Muskelzellen

Fortsetzung Tab. 2		
Protein	Funktion	Sekretion von anderen Zellen
Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) <i>Sekretion</i>	Aktiviert T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, basophile Granulozyten, unreife Dendritische Zellen, Knochenmarkzellen; Chemotaxis für B-Lymphozyten, zytotoxische T Zellen, eosinophile Granulozyten	T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Langerhans Zellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen
Macrophage inflammatory Protein 2 (MIP-2) <i>Sekretion</i>	Aktivierung von Granulozyten, Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen	Makrophagen
Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) <i>Sekretion</i>	Abbau von Matrix	Keratinocyten, Makrophagen, Monozyten
Monocyte chemotactic protein (MCP-1) <i>Sekretion</i>	Chemotaxis von Monozyten, Dendritischen Zellen, T-Gedächtniszellen	Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothel, Monozyten, Makrophagen
Platelet-derived growth factor A (PDGF- α) <i>Sekretion</i>	Proliferation und Migration von endothelialen Zellen; aktiviert Zellen mit mesenchymalem Ursprung	Thrombozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen
Smooth muscle actin (α -SMA)	Kontraktiler Element	Myofibroblasten
Tumor necrosis factor- α (TNF- α) <i>Sekretion</i>	Lokale Entzündungsreaktion, Endothelzellaktivierung	Makrophagen, NK-Zellen, T-Lymphozyten
Transforming growth factor- α (TGF- α)	Steigert die Expression und Ablagerung der extrazellulären Matrix; reduziert MMP Aktivität	Fibroblasten, Makrophagen
Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) <i>Sekretion</i>	Hemmt Zellwachstum, anti-inflammatorisch, induziert IgA Sekretion	Chondrozyten, T-Lymphozyten, Monozyten
Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) <i>Sekretion</i>	Angiogenese; Mitogen für vaskuläres Endothel	Fibroblasten, Epithelzellen, Tumorzellen
Vimentin	Intermediäres Filament	Fibroblasten

1.5 Funktion

Wie der, sich aus einer Kombination der Begriffe Fibroblast und Leukozyt zusammengesetzte Name Fibrozyt bereits andeutet, haben diese Zellen ein breites Aufgabenfeld, das man grob in die Bereiche Wundheilung und Immunabwehr untergliedern kann.

1.5.1 Fibrozyten und Wundheilung

Der Prozess der Wundheilung lässt sich in vier Phasen unterteilen: einer ersten Phase der Blutstillung, Hämostase genannt, folgt die Exsudation- bzw. Entzündungsphase, in der Keime und zerstörte Zellen beseitigt werden. Die dritte Phase, in der es durch die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen zur Neubildung des zerstörten Gewebes und zur Angiogeneese kommt, wird als Proliferationsphase bezeichnet. In der abschließenden Regenerationsphase kommt es zur Reepithelialisierung (Midwood et al., 2004).

Etwa 10 % aller Zellen, die bei einer akuten Gewebsverletzung auftreten, sind Fibrozyten (Bucala et al., 1994). Durch ihre Fähigkeit Kollagen I und weitere extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen III, Fibronectin und Vimentin zu produzieren, tragen sie zur Neubildung des zerstörten Gewebes bei und sind aus diesem Grund auch in Narbengewebe nachweisbar (Bucala et al., 1994). Die Fibrozyten sind nur an der Entzündungs- und Proliferationsphase des Wundheilungsprozesses beteiligt.

In der Exsudationsphase werden Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten und Monozyten, durch die Freisetzung bestimmter Chemokine und die Reaktionen mit ihren Zellrezeptoren zur Migration in die Wundgebiete angeregt. Humane Fibrozyten sezernieren einige solcher Chemokine, wie MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein; CCL3) MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein; CCL4) und MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1; CCL2), die zu einer Migration von Leukozyten in die Wundregion führen, um dort mögliche

eingedrungene Pathogene und Zellfragmente zu beseitigen (Chesney et al., 1998).

Auch die Migration humaner Fibrozyten in die Wundregionen erfolgt chemokinvermittelt. Humane Fibrozyten besitzen vier Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche: CCR3, CCR5, CCR7 und CXCR4. Murine Fibrozyten verfügen anstatt über CCR3 und CCR5 über den CCR2 Rezeptor (Abe et al., 2001). Abe et al. (2001) zeigten, dass vor allem der Chemokinrezeptor CCR7 und das entsprechende sekundäre lymphoide Gewebeschemokin (secondary lymphoid tissue chemokin (SLC)) die Migration von Fibrozyten in das Wundgebiet induzieren. SLC entstammt dem Endothel von Blutgefäßen, was erklären könnte, weshalb sich die Zahl der Fibrozyten in einem Wundgebiet um die neugebildeten Blutgefäße akkumuliert (Abe et al., 2001).

In der Proliferationsphase werden die Bindegewebszellen durch die Ausschüttung der Zytokine TGF- β 1 und TNF- α , den ersten Mediatoren bei Wundheilungsprozessen, zur Teilung und Produktion von extrazellulären Matrixproteinen angeregt (Kovacs und DiPietro, 1994). Diese Zytokine haben auch einen Einfluss auf Fibrozyten. TGF- β 1 steigert die Anzahl aus humanen PBMC gewonnener Fibrozyten und führt zu einer um 30 – 40 % gesteigerten Expression von Kollagen I (Abe et al., 2001). TNF- α und IL-1 β hingegen, die von Fibrozyten in einem höheren Maß als von Monozyten oder T-Lymphozyten ausgeschüttet werden, führen zur Ausschüttung weiterer Chemokine und hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, die bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen (Abe et al., 2001; Chesney et al., 1998).

Bei der Neubildung von zerstörtem Gewebe ist die Bildung neuer Blutgefäße wichtig, um die Versorgung zu gewährleisten. Auch auf diese Phase der Wundheilung haben Fibrozyten einen Einfluss, wie Hartlapp et al. (2001) in ihrer Studie beschreiben. Die Angiogenese kann in drei Phasen unterteilt werden: Zuerst erfolgt die Verdauung des umgebenden Bindegewebes, darauf folgt die Migration von Endothelzellen und abschließend kommt es in der dritten Phase zur Proliferation der eingewanderten endothelialen Zellen. Das von Fibrozyten

exprimierte Enzym Matrixmetalloproteinase (MMP-9) führt zur Zerstörung der Basalmembran und ermöglicht damit die Einwanderung der Endothelzellen in das Wundgebiet. Die Sekretion der Faktoren bFGF, VEGF, PDGF und weiteren Angiogenesefaktoren durch Fibrozyten führt zur Migration und Proliferation der Endothelzellen. Die Förderung der Angiogenese durch Fibrozyten konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Hartlapp et al., 2001).

Die Kontraktion der Wundränder ist wichtig, um einen schnellen Verschluss der Wunde zu gewährleisten. Myofibroblasten sind Zellen, die neben der Produktion von Kollagen, kontraktile Proteine wie α -SMA exprimieren und somit die Wundränder kontrahieren können. Humane Fibrozyten können sich zu Myofibroblasten differenzieren (Hong, 2007; Phillips et al., 2004; Schmidt et al., 2003) und Abe et al. (2001) zeigten *in vitro*, die Fähigkeit von Fibrozyten Kollagengele zu kontrahieren. Dies lässt darauf schließen, dass Fibrozyten auch *in vivo* bei der Wundkontraktion eine Rolle spielen (Abe et al., 2001).

Durch die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, der Kontraktion der Wundränder und der Beteiligung an der Bildung neuer Blutgefäße sind Fibrozyten an vielen Stellen im Wundheilungsprozess von Bedeutung.

1.5.2 Fibrozyten und Immunabwehr

Anhand der auf den Fibrozyten exprimierten Oberflächenantigene wird deutlich, dass sie eine wichtige Funktion in der Immunabwehr spielen. Antigenpräsentierende Zellen, die über den Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Komplex T-Lymphozyten aktivieren, besitzen auf ihrer Oberfläche die Antigenpaare CD 11a/18 - CD 54, CD 58 - CD 2 und CD 86 - CD 28. Humane Fibrozyten exprimieren CD 11a, CD 54, CD 58 und CD 86 auf ihrer Oberfläche, wobei die Ausprägung der MHC Klasse II Moleküle (MHC II) teilweise stärker ausgebildet ist als auf den Monozyten (Chesney et al., 1997). Somit verfügen sie über alle essentiellen Oberflächenmarker zur Präsentation von Antigenen.

Die Antigenpräsentation der Fibrozyten ist MHC II abhängig und benötigt die Ko-Stimulation von CD 86 sowie eine Adhäsion durch die Interaktion des Antigenpaars CD 11a:CD 54 (Chesney et al., 1997).

Humane und murine Fibrozyten haben nicht nur die Fähigkeit Antigene zu präsentieren, sondern sie besitzen auch das Potential, T-Gedächtniszellen und naive T-Zellen zu aktivieren. Die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zu aktivieren, wurde bisher allein den Dendritischen Zellen zugeschrieben (Inaba et al., 1990; Levin et al., 1993). Die Stimulation von T-Memory-Lymphozyten durch Fibrozyten ist jedoch deutlich ausgeprägter als sie durch Monozyten hervorgerufen wird (Chesney et al., 1997). Die Aktivierung und Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten konnte mit porcinen Fibrozyten, die mit dem klassischen Schweinepestvirus (CSFV) infiziert wurden, festgestellt werden, was ihre Beteiligung an der spezifischen antiviralen Immunantwort beweist (Balmelli et al., 2005).

Demzufolge können Fibrozyten sowohl eine T-Zellmigration als auch eine Aktivierung der T-Zellen verursachen (vgl. Abschnitt II 1.5.1). Neben der Anregung von T-Zellen zur Migration durch die Ausschüttung von Chemokinen (MCP-1) konnte anhand eines Mäusemodells die Migration von Fibrozyten in die regionalen Lymphknoten gezeigt werden. Dort präsentieren sie Antigene auf ihrer Oberfläche und aktivieren T-Zellen (Chesney et al., 1997).

Fibrozyten sind den Dendritischen Zellen in ihrer Funktion Antigene zu präsentieren und naive T-Lymphozyten zu aktivieren sehr ähnlich.

Um die Funktion der Fibrozyten in der angeborenen Immunabwehr zu klären, haben Balmelli et al. (2007) untersucht, inwieweit Fibrozyten Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) erkennen können. Zur Erkennung sogenannter PAMPs benötigen Zellen bestimmte Rezeptoren, die Toll-ähnlichen-Rezeptoren (TLR, toll-like-receptors). Dies sind Proteine, die hauptsächlich in der Membran von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen vorkommen (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Durch die Erkennung spezifischer Komponenten von Pathogenen führen

sie zu einer Freisetzung von IFN Typ I und anderen proinflammatorischen Zytokinen. Porcine Fibrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den Toll-ähnlichen Rezeptor 7 (TLR-7). Die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6, ausgelöst durch die Stimulation des TLR-7, ist durch Fibrozyten höher als sie durch Dendritische Zellen hervorgerufen wird (Balmelli et al., 2007). IL-6 spielt eine wichtige Rolle im Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität, da es chemotaktisch für T-Lymphozyten wirkt und die Differenzierung der B-Lymphozyten und Monozyten zu Makrophagen fördert (Jones, 2005). Fibrozyten übernehmen mit der Erkennung Pathogen-assoziiertes Muster, der Antigenpräsentation und der Aktivierung von T-Lymphozyten sowohl Aufgaben in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunabwehr.

Fibrozyten spielen also eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und Wundheilung von akuten Verletzungen. Sie sind im peripheren Blut ständig enthalten und gelangen dadurch schnell an den Ort der Verletzung bzw. an Eintrittspforten und können aufgrund der Bildung von extrazellulären Matrixproteinen die Wundheilung einleiten. Darüber hinaus beugen sie möglichen Infektionen mit Erregern, die über die Wunde oder andere Eintrittspforten eindringen können, vor.

1.6 Schweinefibrozyten

Aus kultivierten PBMC, welche mittels Dichtegradiententrennung aus Gesamtblut von Schweinen gewonnen wurden, entwickeln sich, wie auch bei humanen und murinen PBMC (Bucala et al., 1994), im Verlauf von ein bis zwei Wochen spindelförmige adhärente Zellen (Balmelli et al., 2005). Im Vergleich zur Literatur über humane und murine Fibrozyten ist über die Fibrozyten der Schweine erheblich weniger bekannt.

Primäre Schweinefibrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche, im Gegensatz zu humanen und murinen Fibrozyten neben den Oberflächenproteinen MHC Klasse I und II, CD 1, CD 16 und CD 80/86 auch das Antigen SWC-3 (Balmelli et al., 2005). SWC-3 entspricht dem humanen CD 172 und wird hauptsächlich auf

porcinen myeloiden Zellen exprimiert (Alvarez et al., 2000). Eine Subpopulation der porcinen Fibrozyten besitzt auf ihrer Zelloberfläche die Antigene CD 14 und SWC-8, die auf allen B-Lymphozyten, Granulozyten und einigen T-Zellen exprimiert werden (Balmelli et al., 2005). Der Monozytenmarker CD 14 konnte auf der Oberfläche von humanen Fibrozyten nicht detektiert werden (Pilling et al., 2009a).

Ebenso wie humane und murine Fibrozyten sind sowohl primäre als auch sekundäre porcine Fibrozyten in der Lage, intrazellulär Kollagen I zu produzieren (Balmelli et al., 2005). In Langzeitkultur verlieren porcine Fibrozyten die Oberflächenmarker MHC II, CD 1, CD 14 und CD 16, wohingegen bei humanen und murinen Fibrozyten nur der Verlust der Marker CD 34 und CD45RO beschrieben ist (Bellini und Mattoli, 2007; Pilling et al., 2009a). Das Antigen SWC-8 wird andererseits von sekundären porcinen Fibrozyten vermehrt exprimiert (Balmelli et al., 2005).

Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-1 β führen, wie bei den Fibrozyten der anderen Spezies (vgl. Abschnitt II 1.3), zu einer gesteigerten Proliferation der Fibrozyten. IFN- γ , TNF- α , und IL-1 β induzieren eine Hochregulation der MHC I Expression auf sekundären Fibrozyten; nur IFN- γ führt auch zu einer Steigerung der MHC II Antigenexpression auf der Zelloberfläche (Balmelli et al., 2005).

Auch in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zelle und in ihren Aufgaben bei der Wundheilung unterscheiden sich die porcinen Fibrozyten nach der bisher vorliegenden Literatur nicht von humanen oder murinen Fibrozyten. In ihrer Studie zeigten Balmelli et al. (2005) eine effektive Endozytosefähigkeit bei Fibrozyten. Diese wird benötigt, um in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zelle, Fremdpartikel aufzunehmen, zu präsentieren und anschließend T-Lymphozyten zu aktivieren. Die Fähigkeit CD 4+ und CD 8+ T-Lymphozyten zu aktivieren, wurde anhand der Infektion von porcinen Fibrozyten mit dem klassischen Schweinepestvirus (CSFV) bestätigt (Balmelli et al., 2005). Fibrozyten führten bei der CSFV-Infektion zu einer Ausschüttung von IFN- γ durch T-Lymphozyten. Demzufolge sind porcine Fibrozyten an der Induktion der

spezifischen antiviralen Abwehr beteiligt. Neuere Untersuchungen von Balmelli et al. (2007) ergaben keine messbaren Interferonwerte nach der Stimulation von porcinen Fibrozyten mit CSFV, selbst genverändertes CSFV (CSFV^{Npro}), bei dem das Gen, welches die Transkription von Interferon beta (IFN- β) antagonisiert, ausgeschaltet ist, konnte die Fibrozyten nur zu einer geringen Produktion von Interferon- α / β stimulieren (Balmelli et al., 2007).

1.7 Fibrozyten in pathologischen Prozessen

Fibrosierende Erkrankungen entstehen durch eine krankhafte Vermehrung von Bindegewebe in Organen und Geweben, die meist als Folge chronischer Erkrankung oder Durchblutungsstörungen auftreten. Durch die Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen spielen Fibrozyten klinisch vor allem bei fibrosierenden Krankheitsbildern der Haut und Lunge eine Rolle.

Hypertrophe Narbenbildung und Keloid sind Formen überschießender Wundheilungsprozesse. In diesen pathologischen Prozessen, bei denen es zu einer übermäßigen Produktion von Bindegewebe kommt, wurde das Vorkommen von CD 34+, Kollagen I+ und α -SMA+ Fibrozyten beschrieben (Aiba und Tagami, 1997; Yang et al., 2002), wobei eine gesteigerte Kollagenproduktion mit einer Abnahme des CD34 Antigens einherging. Bei der hypertrophen Narbenbildung und dem Keloid kommt es zu einer gesteigerten TGF-1 β Produktion (Ghahary et al., 1993; Peltonen et al., 1991), welche bei Fibrozyten zu einer gesteigerten Kollagenproduktion führt (Abe et al., 2001) und somit die übermäßige Bildung von Bindegewebe erklärt.

Ein weiteres Krankheitsbild der Haut, das vor allem bei Menschen mit Niereninsuffizienz auftritt und bei dem es auch zu einer Vermehrung des Bindegewebes kommt, ist die Nephrogene Systemische Fibrose (NSF). Cowper und Bucala (2003) haben in den Hautbiopsien von Patienten mit NSF Kollagen I+/CD34+ spindelförmige Zellen gefunden.

Lungenfibrose kann zum einen durch aus dem umliegenden Gewebe einwandernde Fibroblasten entstehen, die sich zu Myofibroblasten differenzieren,

zum anderen indem sich Epithelzellen zu Myofibroblasten ausdifferenzieren (Gomperts und Strieter, 2007).

Nach neueren Studien sind auch zirkulierende Fibrozyten, die durch Chemokine angelockt werden, an der Entstehung der Lungenfibrose beteiligt (Moore et al., 2005; Phillips et al., 2004). Das Chemokin CXCL12 wird von der Lunge bei diffusem Schaden ausgeschüttet. Durch das Zusammenspiel der Chemokinrezeptoren CXCR4 mit dem ausgeschütteten CXCR12 migrieren CXCR4+ Fibrozyten in das Wundgebiet (Phillips et al., 2004). Aufgrund der Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen kommt es zur Fibrose der Lunge. Fibrozyten werden auch in Verbindung mit anderen fibrosierenden Lungenerkrankungen, wie interstitieller Pneumonie und idiopathischer Lungenfibrose beschrieben (Andersson-Sjoland et al., 2008; Mehrad et al., 2007).

Asthma ist eine chronisch-entzündliche Krankheit, bei der es unter anderem durch Bronchospasmen und Fibrosierung des Bindegewebes zu einer Einengung des Bronchiallumens und somit zu Atemnot kommt. Fibrozyten wurden von Schmidt et al. (2003) in der Bronchialschleimhaut von Asthmapatienten nachgewiesen. Durch die Ausdifferenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblasten und die Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen kommt es zu subepithelialer Fibrose, einem charakteristischen pathologischen Befund bei Asthma (Schmidt et al., 2003).

Als Folge von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen oder als Sekundärerkrankung bei Asthma kann es zu pulmonaler Hypertonie kommen. Eine Beteiligung der Fibrozyten an der Entstehung der pulmonalen Hypertonie wurde von Frid et al. und Varcoe et al. beschrieben (Frid et al., 2006; Varcoe et al., 2006). Bei der pulmonalen Hypertonie kommt es durch Lumenverengung der Lungengefäße zu einem Bluthochdruck im Lungenkreislauf. Die Lumenverengung ist bedingt durch die Zunahme an Muskelzellen und Bindegewebe, welche durch die Differenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblasten und die Produktion von Kollagen zustande kommen kann.

Fibrozyten wurden auch bei Arteriosklerose, chronischer Pankreatitis und Zystitis nachgewiesen (Barth et al., 2002a; Fletcher und Guiffre, 2005; Nimphius et al., 2007).

Im umgebenden Stroma von benignen Tumoren kommen CD 34+ Kollagen I+ Fibrozyten vor. Invasive maligne Tumore weisen dagegen eine deutliche Abnahme an CD 34+ α -SMA+ Zellen auf (Barth et al., 2002a; Barth et al., 2002b; Barth et al., 2002c; Nimphius et al., 2007). Diese Eigenschaft könnte in der Diagnostik eingesetzt werden, um maligne von benignen Tumoren zu unterscheiden.

2. Interaktion von Influenza A Virus Subtypen mit Schweinezellen

Das Schwein nimmt im Zusammenhang mit der Influenzavirusepidemiologie eine besondere Stellung ein. Es kann als ‚Mixing-Vessel‘ zur Entstehung neuer Subtypen bei der Doppelinfection einer Zelle mit zwei Influenzaviren unterschiedlicher Speziesherkunft führen (Brown, 2008; Scholtissek et al., 1985; Zambon, 1999). Aus diesem Grund ist die Infektions- und Replikationsfähigkeit von Influenza A Virussubtypen in Schweinezellen besonders im Hinblick auf ein mögliches Reassortment interessant.

Influenza A Viren unterschiedlicher Spezies können sich in den verschiedensten Schweinezellen vermehren, wobei Zellen des Atmungstraktes als natürliche Zielzellen von Influenza A Viren besonders empfänglich sind (Ferrari et al., 2003). Primär gewonnene Zellen zeigten gegenüber Zelllinien eine gesteigerte Empfänglichkeit bei der produktiven Infektion von aviären und porcinen Influenza A Virussubtypen (Sugimura et al., 2000).

Seo et al. zeigten 2001 mit ihrer Studie, dass die Replikationsfähigkeit humaner, aviärer und porciner Influenza A Virussubtypen in einer porcinen Lungenepithelzelllinie (St. Jude porcine lung cells, SJPL) mit allen Influenza A Subtypen höher ist, als in MDCK Zellen. Selbst in MDCK Zellen nicht

vermehrbar aviäre Influenza A Virussubtypen zeigten in SJPL anhand von zytopathogenem Effekt eine Vermehrungsfähigkeit.

Eine sehr empfängliche Zelllinie gegenüber der Infektion von humanen, aviären und porcinen Influenza Virussubtypen (Replikationstiter ausgedrückt als Kulturinfektiöse Dosis; KID_{50} : $10^{7,24}$ - $10^{7,74}$ /ml) stammt aus den Trachealzellen neugeborener Schweine (NPTr). Das hohe Vermehrungspotential der Viren in diesen Zellen zeigt sich darin, dass sich die Virustiter kaum von denen in embryonierten Hühnereiern vermehrten Viren (Eiinfektiöse Dosis; EID_{50} : $10^{7,5}$ - $10^{8,5}$ /ml) unterscheiden (Ferrari et al., 2003).

Neben Zellen aus dem Atmungstrakt zeigen Schweinenierenzelllinien, wie PK-15 und IB-RS2 einen lichtmikroskopisch deutlich sichtbaren zytopathogenen Effekt nach der Infektion mit verschiedenen Schweineinfluenza A Virussubtypen und dem hochpathogenen aviären Influenza A Subtyp H5N1 (Choi et al., 2006; Li et al., 2009). Primäre Schweinenierenzellen (SK) und vor allem Nierenzellen von neugeborenen Ferkeln (NSK) oder Embryonen (ESK) zeigen eine höhere Empfänglichkeit mit deutlich höheren Virustitern ($KID_{50}/0,1\text{ml}$ (log 10): NSK: 7,74 , ESK: 5,29, SK: 4,88, PK-15: 3,08, IB-RS-2: 2,56) für Influenza A Virussubtypen von Vogel und Schwein, gegenüber den Zelllinien PK-15 und IB-RS-2 (Ferrari et al., 2003; Sugimura et al., 2000).

Auch in Zellen aus dem Geschlechtstrakt des Schweines (Hodenzellen (ST) und Eileiterzellen (PFT)) konnte eine Replikationsfähigkeit von Schweineinfluenza Viren nachgewiesen werden (Bouillant et al., 1975; Choi et al., 2006). Eine Zusammenfassung der Empfänglichkeit und Virusproduktion in verschiedenen Schweinezellen gibt Tabelle 3 wieder.

Tab. 3: Replikationsfähigkeit von Influenza Viren in verschiedenen Schweinezellen

Die Replikationsfähigkeit wird angegeben als oberer und unterer Grenzwert der ermittelten $KID_{50}/0,1$ ml Werte. Als Vergleich wurde die am häufigsten benutzte MDCK Zelllinie mit in die Tabelle aufgenommen.

Zelllinie	$KID_{50}/0,1$ ml (log)	Spezies der getesteten Influenza Subtypen
Lungenepithelzelllinie (St. Jude porcine lung cells, SJPL)	1,50 - 5,25 2,00 - 6,50 3,75 - 6,50	aviäre Influenza Subtypen humane Influenza Subtypen porcine Influenza Subtypen
Trachealzellen neugeborener Schweine (NPTr)	7,5 - 8,5	aviäre Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
Schweinenierenzellen (SK)	4,42 - 5,33	aviäre Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
embryonale Schweinenierenzellen (ESK)	4,76 - 5,82	aviäre Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
Nierenzellen neugeborener Schweine (NSK)	7,24 - 7,74	aviäre Influenza Subtypen, humane Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
PK-15	2,58 - 3,59	aviäre Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
IB-RS2	2,26 - 2,87	aviäre Influenza Subtypen, porcine Influenza Subtypen
MDCK	5,6 - 7,08 2,0 - 5,5 3,0 - 5,25	humane Influenza Subtypen porcine Influenza Subtypen aviäre Influenza Subtypen

(Choi et al., 2006; Ferrari et al., 2003; Li et al., 2009; Seo et al., 2001; Sugimura et al., 2000)

Schweineinfluenza Viren induzieren in porcinen Lungenzellen die Sekretion von $IFN-\alpha$, $TNF-\alpha$ und $IL-1$. Porcine plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC) werden hingegen durch Influenza Viren zur Sekretion von $IL-2$, $IL-6$, $IFN-\alpha$ und $-\beta$ angeregt, jedoch nicht zur Produktion von $IFN-\gamma$. Durch die Sekretion dieser Zytokine kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems (Calzada-Nova et

al., 2010; Summerfield und McCullough, 2009; Van Reeth et al., 1999). Untersuchungen der antiviralen Schutzfunktion von IFN- α und IFN- γ bei der Infektion von primären Schweinenierenzellen und der Schweinenierenzelllinie PK-15 mit dem Influenza A Virus (H7N1) und dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) haben gezeigt, dass nur porcines IFN- α vor einer Zellzerstörung durch die Viren schützt (Horisberger, 1992).

Um in die Wirtszelle eindringen zu können, binden Influenza A Viren mit ihrem HA-Protein an, die sich in der Wirtszelloberfläche befindenden, Sialinsäurerezeptoren (Gambaryan et al., 2005; Herrler et al., 1995). Makrophagen und Dendritische Zellen benötigen zur Aufnahme von Influenza A Viren keine spezifischen Rezeptoren. Die Viren werden durch Endozytose nach Erkennung durch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) von diesen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen. Da Fibrozyten den Dendritischen Zellen in ihrer Funktion ähneln (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997) und mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor 7 auf ihrer Oberfläche Pathogen-assoziierte Muster erkennen können (Balmelli et al., 2007), besteht auch hier die Möglichkeit, dass sie zur Aufnahme von Influenza A Viren keine spezifischen Rezeptoren benötigen. Balmelli et al. (2005) zeigten die hohe Endozytosefähigkeit durch porcine Fibrozyten mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteinen. Weitere Untersuchungen zu Art der Endozytose wurden bisher noch nicht durchgeführt.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Zellen

1.1.1 Zelllinien

Madin Darby Canine Kidney (MDCK)	ATCC®Nr. CCL-34™
Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)	ATCC®Nr. CCL-22™
HeLa Zellen, humane Zervikalkarzinomzellen	ATCC®Nr. CCL-2™
CaCo-2 Zellen, humane Adenokarzinomzellen	ATCC®Nr. HTB-37™

1.1.2 Primärzellen

Hühnererythrozyten	Klinik für Vögel, LMU München
Leukozyten aus Schweineblut	Schlachthof, München
Hühnerembryofibroblasten (HEF)	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel- sicherheit, Oberschleißheim

1.2 Zellkulturmedien

Minimal Essential Medium (MEM) mit Earls Salzen	PAA, Pasching, Österreich
Dulbeco's MEM (DMEM)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA, Pasching, Österreich

1.3 Antikörper

1.3.1 ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot Test)

Tab. 4: Antikörper für IFN- α ELISPOT

Antikörper	Klon	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Mouse anti-pig IFN- α	27100-1	5 μ g/ml	PBL interferon source Inc., New Jersey, USA
Rabbit anti-pig IFN- α	37100-1	1 μ g/ml	PBL interferon source Inc., New Jersey, USA
Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP		1:2500	Promega GmbH, Mannheim

1.3.2 Immunhistologie

Tab. 5: Antikörper für Immunhistologie

Antikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Kaninchenserum anti Influenza A H5N2avi	1:250	Dr. Heiner v. Buttlar, Institut für Immunologie Tübingen
Kaninchenserum anti Influenza A H1N1avi 14/1	1:1000	Dr. Heiner v. Buttlar, Institut für Immunologie Tübingen
Anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP	1:2000	Promega GmbH, Mannheim

1.3.3 Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting, FACS)

Tab. 6: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Ig Isotyp	Gebrauchsmenge	Hersteller
Anti-MHC Klasse I (SLA-1)	74-11-10	Mouse anti-pig, IgG2b	100 µl	Prof. Dr. Armin Saalmüller (Universität Wien)
Anti-MHC Klasse II (SLA-DR)	MSA3	Mouse anti-pig, IgG2a	33 µl	Prof. Dr. Armin Saalmüller (Universität Wien)
Anti-SWC-3	74-22-15A	Mouse anti-pig, IgG2b	33 µl	Prof. Dr. Armin Saalmüller (Universität Wien)
CD 14	MIL2	Mouse anti-pig, IgG2b	10 µl (1:10 verd. mit PBS)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Anti-Kollagen 1	COL-1	Mouse anti-human, IgG1	1:1000	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München

Tab. 7: Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Fluoreszin	Ig Isotyp	Gebrauchsmenge	Hersteller
ALEXA Fluor® 633	Goat anti-mouse, IgG2a und IgG1	25 µl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
R-Phycoerythrin (PE)	Goat anti-mouse, IgG2b	2 µl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

1.4 Viren

1.4.1 Laborvirusstämme

Tab. 8: Verwendete Laborvirusstämme

Virus	Stammbezeichnung
Influenza A H1N1 Sw	Impfstamm FLUAV/Sw/Belzig/2/2001
Newcastle Disease Virus (NDV)	Impfstamm La Sota
Parapoxvirus ovis	ORF Virus Stamm D1701
Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)	Stamm Indiana

1.4.2 Feldvirusisolate

Tab. 9: Verwendete Feldvirusisolate

Influenza A Subtyp	Stammbezeichnung	Genbank Acc.No.	Publiziert
H1N1 avi	A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	HQ259221- HQ259228	(Rabl, 2010)
H1N1 porc	114/3 Feldisolat Bayern 2010		
H1N2 porc	127/2 Feldisolat Bayern 2010		
H1N1 porc	140/3 Feldisolat Bayern 2010		
H5N2 avi	A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	FJ743477, DQ402042, DQ792925, DQ387854	(Fuchs, 2009)

Die Influenza A Virus Isolate A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 und A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 wurden im Rahmen des Wildvogelmonitoring zur Überwachung der Influenza A Virus Prävalenz in Bayern von Frau Dr. C. Fuchs und Frau Dr. S. Rabl in Vorarbeit aus Probenmaterial isoliert (Fuchs, 2009; Rabl, 2010).

Die Schweineinfluenzaisolate wurden in der Routinediagnostik der Veterinärvirologie durch Mitarbeiter des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in einer ersten Eipassage isoliert.

1.5 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

1.5.1 Primer

Für die Reverse Transkription (RT) wurden Random-Primer der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Alle anderen genutzten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Primer für die Subtypisierung der Schweineinfluenzavirusisolate

Tab. 10: Primer für die Subtypisierung der Schweineinfluenzavirusisolate

Primerbezeichnung und Sequenz	Anzahl Basenpaare (bp)	DNA Fragmentgröße der PCR
H1for 5'-ATG CTA ACA AYT CCA CMG ACA CTG T-3'	25 bp	955 bp
H1rev 5'-GGA TTC ATW GAA GGR GGA TGG ACA GGA-3'	28 bp	
N2for 5'-GAA CCT TAY GTG TCA TGC GA-3'	22 bp	571 bp
N2rev 5' -TGG AAW CAA TGC TAT AAT-3'	18 bp	

Primer für die Sequenzierung von A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1

Tab. 11: Primer für die Sequenzierung von A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1

Primerbezeichnung und Sequenz	Anzahl Basenpaare (bp)	DNA Fragmentgröße der PCR
avi-PA-For 5'-TGG ATY CAG AGT GAA TTC AAC AA-3'	23 bp	743 bp
avi-PA-Rev 5'-GGT TCT GCA CAC CTT CCC GAT AGA-3'	24 bp	

Fortsetzung Tab. 11 Primerbezeichnung und Sequenz	Anzahl Basenpaare	DNA Fragmentgröße der PCR
avi-NA for 5'-ATT GGA TCA ATC TGT ATG G-3'	19 bp	642 bp
avi-NAN1-R1 5'-GTT GTT CCT CCA ACT CTT GAT AGT-3'	24 bp	

Die Sequenzierung des restlichen Influenza A Virus A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 Genoms und die Primerentwicklung für die Segmente PA und NA erfolgte durch Dr. Roland Zell am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena.

Primer für die PanInfluenza RT-Real-time-quantitative PCR (RT-qPCR)

Tab. 12: Primer für die panInfluenza RT-qPCR

Primerbezeichnung und Sequenz	Quelle
IVA-1 for 5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'	(Spackman et al., 2002)
IVA-1 rev 5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG-3'	

Tab. 13: Primer für die interne Kontroll-RNA (IC2)

Primerbezeichnung und Sequenz	Quelle
IVA-2 for 5'-TCG AGG GCG ACA CCC TG-3'	(Hoffmann et al., 2006)
IVA-2 rev 5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'	

N1 Sequenzen auf Anfrage beim FLI erhältlich

1.5.2 Sonden für die PanInfluenza RT-Real-Time-quantitative PCR (RT-qPCR)

Tab. 14: Sonden für die panInfluenza RT-qPCR

Sondenbezeichnung und Sequenz	Quelle
IVA-1 Sonde 5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1-3'	(Spackman et al., 2002)
IVA-2 Sonde (interne Kontrolle) 5'-HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1-3'	(Hoffmann et al., 2006)

1.6 Chemikalien und Reagenzien

Agarose für Gelelektrophorese	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua bidestilata (water purification systems)	Milipore GmbH, Schwalbach
DEPC-H ₂ O	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Digitonin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
DTT 0,1 M	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 99 %	VWR International, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ficoll (Separationsmedium, Dichte p=1,077)	PAA, Pasching, Österreich
IC2-RNA (Kontroll-RNA für die panInfluenza RT-qPCR)	Friedrich-Löffler-Institut (FLI), Insel Riems
Interferon alpha-Standard	Prof. Wolf, Genzentrum der LMU München
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt

Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (mit und ohne Ca/Mg)	PAA, Pasching, Österreich
RNase-Out	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TAE-Puffer	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Vecotor Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching

1.6.1 Lösungen und Puffer

PBS ohne Ca/Mg:

PBS ohne Ca/Mg (10x)

1:10 verdünnt mit sterilem Aqua bidest.

PAA, Pasching, Österreich

Lösungen zur Gewinnung der PBMC

EDTA-Lösung:

1,5 mg EDTA/ml Blut

Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe

15 mg EDTA in 1 ml PBS ohne Ca/Mg gelöst

Lysepuffer:

NH₄Cl 8,29 g/l

KHCO₃ 1 g/l

EDTA 0,3723 g/l

AppliChem GmbH, Darmstadt

AppliChem GmbH, Darmstadt

AppliChem GmbH, Darmstadt

Puffer für ELISPOT

PBS ohne Ca/Mg + 0,05 % Tween ®20

PAA, Pasching, Österreich; Carl
Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Lösungen für Immunhistologie

Fixationslösung:

3 Teile Ethanol (99 %ig)

VWR International GmbH,
Darmstadt

1 Teil Methanol (100 %ig)

Merck KGaA, Darmstadt

Waschlösung 1:

2 Teile Aqua bidest.

1 Teil Waschlösung II

Waschlösung 2:

PBS mit Ca/Mg +

PAA, Pasching, Österreich

0,1 % Tween®20

Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe**Puffer für PCR**

6x DNA-Ladepuffer

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München

100 bp-Größenmarker

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

50x TAE-Puffer bzw.

Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

1x TAE-Puffer verdünnt in Aqua bidest.

1.7 Zusätze für Zellkulturmedium

Natrium-Bikarbonat, 7,5 %

PAA, Pasching, Österreich

Fetales bovines Serum (FBS)

PAA, Pasching, Österreich

Gentamycin

PAA, Pasching, Österreich

Nicht-essentielle Aminosäuren

PAA, Pasching, Österreich

1.8 Enzyme und Kits**1.8.1 Enzyme**

HotStar Taq Polymerase

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Pfx-AccuPrimer™ Polymerase

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperScript III Taq Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Die notwendigen Reagenzien und Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert.

1.8.2 Kits

QiAamp®viral RNA Minikit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Die notwendigen Reagenzien und Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert.

1.9 Verbrauchsmaterial

FACS Falcon®-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Netz Drahtgewebe (Maschenweite 0,042 mm)	Weisse & Eschrich Drahtgewebefabriken GmbH & Co. KG, Ludwigsstadt
Kulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrotiterplatten (Rundboden)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrotiterplatten (Rundboden für FACS)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Multiscreen filter plates für ELISPOT	Millipore GmbH, Schwalbach
PCR optical adhesive film	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
PCR-Platten	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
PCR soft stripes	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Safelocktubes	Eppendorf AG, Hamburg
Schutzhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden

Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	TPP-AG, Trasadingen, Schweiz

1.10 Geräte und Laborhilfsmittel

BD FACSCanto II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bebrütungsschrank (Eier)	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank CO ₂	Binder GmbH, Tuttlingen
Gelelektrophoresekammer:	
Horizon®11.14	Whatman GmbH, Dassel
Agargel midi-wide	Biometra GmbH, Göttingen
EliSpot-Reader, Viruspot 04	AID GmbH, Strassberg
Fotoapparat	Canon GmbH, Krefeld
Geldokumentationssystem	Biometra GmbH, Göttingen
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskop, Axiovert 40C (Objektive: 1x5, 1x10, 1x20, 1x40)	Carl-Zeiss AG, Göttingen
Mikrowellengerät	Bartscher GmbH, Salzkotten
Mx3000P®	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Mx3005P™	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Pipettierhilfe, Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
Glaspipetten	Brandt GmbH, Wertheim
Schierlampe	Karl-Blohm GmbH, Hamburg
Sterilwerkbank	Heraeus GmbH, Harnau
Trio-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA

1.10.1 Zentrifugen

Tischzentrifuge Z 233 MK-2; Rotor F-45-24-11	Hermle Berthold AG, Gosheim
Heraeus Megafuge 1.0R; Rotor 75007570	Heraeus GmbH, Harnau
Ultrazentrifuge, Optima™ L-90 K; 45 Ti Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

1.10.2 Software

Die Auswertung der FACS-Ergebnisse erfolgte mit der von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) mitgelieferten Software FACS Diva 6.0 und der Software FlowJo Version 7.6.3 (Tree Star Inc. USA).

Zur Analyse der Agarosegelelektrophorese wurde die BioDocAnalyse (BDA) liveH Version 2.46.8.1 von Biometra GmbH (Göttingen) verwendet.

Die ELISPOT-Platten wurden mit Hilfe des EliSpot-Readers und der dazugehörigen Software Version 3.4.0 von AID GmbH (Strassberg) ausgewertet.

Die Real-Time-PCR Thermocycler wurden mit der MxPro™ QPCR Software von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) betrieben.

2. Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Zellkulturen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank standardmäßig bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die Zellkulturmedien wurden je nach Kulturbedingung der Zelllinie mit fetalem bovinem Serum (FBS), 7,5 % Natrium-Bikarbonat (Bic) und nicht-essentiellen-Aminosäuren (NEA) komplementiert.

Bei einer Kulturdichte von ca. 95 % wurden die Zellkulturschalen je nach Zellart 1:2-1:8 geteilt und subkultiviert.

Zur Subkultivierung wurde das Medium abpipettiert, die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und anschließend bei 1.000 U/min zehn Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Das Zellpellet wurde je nach Teilungsrate mit dem jeweiligen Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gegeben.

MDCK Zellen (Madin Darby Canine Kidney) wurden in MEM Earls mit 10 % FBS und 1 % Bic kultiviert. 10 % FBS, 1 % NEA und 1 % Bic komplementierten das Medium (MEM Earls) für MDBK Zellen (Madin Darby Bovine Kidney). Beide Zelllinien wurden alle drei Tage mit einer Teilungsrate von 1:8 subkultiviert.

Dem Medium (MEM Earls) von humanen Zervikalkarzinomzellen (HeLa Zellen) wurde 10 % FBS zugefügt und die Zellen jeden dritten Tag mit einer Teilungsrate von 1:6 geteilt.

Humane Adenokarzinomzellen aus dem Kolon (CaCo-2 Zellen) wurden mit RPMI 1640 Medium, das mit 15 % FBS und 0,5 % Bic komplementiert wurde, kultiviert und jeden dritten Tag mit einer Teilungsrate von 1:3 geteilt.

2.1.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)

Schweineblut wurde direkt beim Tötungsvorgang nach elektrischer Betäubung im Schlachthof gewonnen.

Für die Waschschritte bei der Gewinnung der porcinen PBMC aus dem Gesamtblut wurde sterile phosphathaltige Salzlösung (PBS) ohne Kalzium und Magnesium verwendet.

200-400 ml Schweine-EDTA-Blut wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Erythrozytenlysepuffer (LP) im Verhältnis 2:3 versetzt und nach zehn Minuten Inkubationszeit bei 1.600 U/min für zehn Minuten (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Falls nach dem Waschen mit sterilem PBS noch Erythrozyten

enthalten waren, wurden die Zellen ein weiteres mal mit 10 ml Lysepuffer für fünf Minuten inkubiert und anschließend mit PBS ad 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1.600 U/min für zehn Minuten). Die in 10 ml PBS resuspendierten Lymphozyten wurden zur Dichtegradiententrennung auf 30 ml Ficoll geschichtet und bei Raumtemperatur 36 Minuten bei 1.600 U/min ohne Abbremsen der Zentrifuge zentrifugiert.

Der aus PBMC bestehende weißliche Ring, der sich zwischen dem Plasma und dem Trennmedium gebildet hatte, wurde vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet entsprechend seiner Größe in 5 ml, 10 ml oder 15 ml Medium (DMEM + 20 % FBS) resuspendiert. Die PBMC wurden einer Lebend/Tot-Färbung mit Trypanblau unterzogen und in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Je nach Verwendung wurden die PBMC mit einer Zelldichte von 1×10^6 - 5×10^6 lebende Zellen/ml eingesetzt.

2.1.3 Fibrozyten (Fb)

Zur Kultivierung der Fibrozyten wurden die PBMC auf 1×10^7 lebende Zellen/ml eingestellt und je nach Bedarf in Anzuchtmedium (DMEM + 20 % FBS) in Zellkulturflaschen oder Platten eingesät. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurde einmal wöchentlich bis zur Verwendung der Zellen, das Medium gewechselt.

2.1.4 Hühnerembryofibroblasten (HEF)

Die Gewinnung der HEF wurde am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit nach der in den Virologischen Arbeitsmethoden Band I von Mayr et al. (1974b) beschriebenen Methode durchgeführt und bis zur Verwendung bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2 Virologische Methoden

2.2.1 Virusvermehrung

2.2.1.1 Im Hühnerei

Spezifisch-pathogen-freie Eier (SPF-Eier) der Firma Lohmann Tierzucht (Cuxhaven) wurden zehn bis elf Tage bei 37°C bebrütet. 200 µl der zu vermehrenden Viruslösung wurden in die Allantoishöhle injiziert. Nach Absterben bzw. nach Tötung (mindestens 4 Stunden bei 4°C) der Embryonen wurde die Allantoisflüssigkeit steril entnommen und ein Hämagglutinationstest zum quantitativen Nachweis von hämagglutinierendem Virus durchgeführt. Anschließend wurde die Virussuspension über ein 40 %iges Zuckerkissen (Saccharose) geschichtet und mittels Ultrazentrifugation (40.000 U/min, 4°C, zwei Stunden; Optima™ L-90 K) konzentriert.

Die Titerbestimmung erfolgte durch log Virustitration (vgl. Abschnitt III 2.2.3).

2.2.1.2 In Zellkultur

Die Vermehrung von Viren mittels Zellkultur erfolgte entweder durch simultane Infektion, d. h. Zellen und Virus wurden gleichzeitig in eine Kulturschale gegeben, oder durch Infektion eines Zellmonolayers.

Lichtmikroskopisch (Axiovert 40C Zeiss, Göttingen; Vergrößerung 1x5 bis 1x20) wurde täglich das Auftreten von Zellzerstörung (zytopathogener Effekt, cpE) überprüft. Bei Auftreten von cpE wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mittels Trypsin abgelöst. Nach dreimaligem Gefriertauen konnte nun eine Zunahme des Virusgenomgehaltes in dem Zellmaterial mittels PCR oder durch erneute Verimpfung des Virusmaterials und lichtmikroskopischer Überprüfung auf cpE eine produktive Vermehrung in den Zellen nachgewiesen werden. Durch Titration des geernteten Zellmaterials konnte der Virustiter ermittelt werden.

2.2.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen und Zelllysaten

Zur Ermittlung einer produktiven bzw. einer abortiven Vermehrung der verschiedenen Influenza A Virussubtypen wurden nach 6, 24, 48 und 72 Stunden separat Zellkulturüberstände und Zellen abgenommen, um den Virusgenomgehalt zu ermitteln. Jeweils paarweise wurden PBMC und Fibrozyten eines Tieres mit den Influenza A Subtypen FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 und A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 mit einer Multiplicity of Infection (MOI) 1 zwei Stunden adsorbiert (37°C, 5 % CO₂). Danach wurden die Zellen dreimal mit sterilem PBS gewaschen, um Reste des Einsaatvirus zu entfernen. Nach 6, 24, 48 und 72 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ wurden vorsichtig jeweils 500 µl Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit 500 µl Trypsin von der Kulturplatte gelöst. Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNA mini Extraktion Kit extrahiert. Der Virusgenomnachweis erfolgte mit der panInfluenza-RT-qPCR (vgl. Abschnitt III 2.3.6).

2.2.3 Virustitration

Für die Virustitrationen wurden MDCK Zellen in 24-Loch-Platten eingesät. Das zu titrierende Virus wurde in log₁₀ Schritten mit Zellkulturmedium verdünnt. Die Vertiefungen der Platte wurden im Vierfachansatz mit je 0,1 ml der Virusverdünnungen simultan beimpft. Vier Vertiefungen wurden als Zellkontrolle mitgeführt. Die Platte wurde vier Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Titration wurde täglich lichtmikroskopisch (Axiovert 40C Zeiss, Göttingen; Vergrößerung 1x5 bis 1x20) ausgewertet und nach vier Tagen wurde ein immunhistologischer Antigennachweis durchgeführt (vgl. Abschnitt III 2.4.3).

Der Virustiter wurde mit der Spearman und Kaerber Methode bestimmt (Mayr et al., 1974a) und die $KID_{50}/100 \mu\text{l}$ entsprechend der vorhandenen Zellzahl für die gewünschte MOI verdünnt:

$$\log_{10} KID_{50} - \text{Endpunktverd\u00fcnnung} = X_0 - \frac{d}{2} + d \sum \left(\frac{r}{n} \right)$$

- X_0 : \log_{10} des reziproken Wertes der Verd\u00fcnnung, bei der alle Reagenten positiv sind
 d : \log_{10} des Verd\u00fcnnungsfaktors ($d=1,0$ bei 1:10 Verd\u00fcnnung)
 n : die Zahl der Reagenten, die f\u00fcr jede Verd\u00fcnnung eingesetzt werden
 r : Anzahl der positiven Reagenten

2.2.4 H\u00e4magglutinationstest

Der H\u00e4magglutinationstest dient zur Bestimmung des H\u00e4magglutinationstiters der Virussubtypen (Selbitz et al., 2011).

In eine 96-Loch Rundbodenplatte wurden $25 \mu\text{l}$ Natrium-Phosphat-Puffer (Na-P-Puffer) vorgelegt. Bei der Erythrozytenkontrolle (EK) wurden $50 \mu\text{l}$ pro Vertiefung pipettiert. Die Proben wurden im Doppelansatz \u00e0 $25 \mu\text{l}$ in die oberste Reihe der Platte pipettiert und dann eine Verd\u00fcnnungsreihe angelegt, indem immer $25 \mu\text{l}$ in die n\u00e4chste Vertiefung \u00fcberpipettiert wurden. Die letzten $25 \mu\text{l}$ wurden verworfen. In jede Vertiefung (au\u00dfer der EK) wurden $25 \mu\text{l}$ Na-P-Puffer zugegeben. Je $50 \mu\text{l}$ einer 1 % H\u00fchnererythrozytenl\u00f6sung (verd\u00fcnt in Na-P-Puffer) wurden in die Vertiefungen pipettiert und die Platte vorsichtig gesch\u00fcttelt. Die Auswertung erfolgte nach 10 - 15 Minuten. Durch die H\u00e4magglutination kommt es zu keiner Sedimentation der Erythrozyten am Plattenboden; die L\u00f6sung blieb tr\u00fcbe. Fehlte die h\u00e4magglutinierende Wirkung sedimentierten die Erythrozyten tropfenf\u00f6rmig am Plattenboden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Primerauswahl

Verschiedene Influenza A Virus Sequenzen aus der NCBI-Datenbank wurden miteinander verglichen, um in hoch konservierten Genbereichen m\u00f6gliche

Primerbindungsstellen ausfindig zu machen. Das Alignment der Influenza A Virus Sequenzen erfolgte mit der freizugänglichen Software ClustalW.

Die Primer wurden mittels der „4+2-Regel“ ausgewählt, um eine möglichst ähnliche Annealingtemperatur zu erhalten.

$$T_a = T_m - 2^\circ\text{C}; T_m = 4^\circ\text{C} (G+C) + 2^\circ\text{C} (A+T)$$

- T_a: Annealingtemperatur
- T_m: Schmelztemperatur des Primers
- G: Anzahl der Base Guanosin
- C: Anzahl der Base Cytidin
- A: Anzahl der Base Adenosin
- T: Anzahl der Base Thymidin

Um Fehlbindungen zu vermeiden wurde überprüft, ob die Primer untereinander bzw. in Reverse-Richtung binden.

2.3.2 Extraktion von Nukleinsäure

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem Qiagen RNA mini Extraktion Kit nach Anleitung des Herstellers.

In ein 1,5 ml Eppendorftube wurden 560 µl AVL Puffer, 5 µl carrier RNA (gelöst in AVL Puffer) und 5,6 µl einer internen Kontrolle (IC2) vorgelegt. Nach Zugabe von 140 µl Probe bzw. 140 µl RNA freies-Wasser (Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser; DEPC-Wasser), als Extraktionskontrolle, wurde gevortext und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 560 µl Ethanol (99 %). Nach fünfmaligem Schwenken wurden durch kurzes Anzentrifugieren eventuell vorhandene Tropfen im Deckel entfernt. Jeweils 630 µl Lösung wurden auf die QIAamp Mini RNA-bindende Kieselerde-Säulenmatrix gegeben und bei 8.000 U/min eine Minute zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge Z 233 MK-2). Die Säule wurde nun in ein neues Auffangröhrchen gesetzt und der Vorgang wiederholt. Das Waschen der auf der Säulenmatrix gebundenen RNA erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 500 µl der im Kit enthaltenen Waschpuffer. Nach dem ersten Waschschrift wurde für eine

Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert, wogegen nach dem zweiten Waschpuffer mit 14.000 U/min für drei Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde bei 14.000U/min für eine Minute trocken zentrifugiert, um Pufferreste zu beseitigen.

Nach Platzieren der Säule in ein 1,5 ml Tube wurden mittig 60 µl des Eluationspuffers AVE pipettiert. Nach einminütiger Inkubation wurde durch Zentrifugation (8.000 U/min, eine Minute) die RNA von der Säule in das Reaktionsgefäß eluiert.

Nicht direkt weiter verwendete RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Um RNA amplifizieren zu können, muss diese vorab mittels Reverse-Transkriptasen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. In den folgenden Tabellen werden die verwendeten Reaktionsgemische dargestellt.

Tab. 15: Reaktionsgemisch 1 für Reverse Transkription

Reagenzien	Menge
Random-Primer (0,03 µg/ml)	1 µl
dNTP (je 25 mM)	0,5 µl
RNA Template	10,5 µl

Tab. 16: Reaktionsgemisch 2 für Reverse Transkription

Reagenzien	Menge
5x First-Strand-Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNAse OUT	1 µl
Superskript II Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen der Reaktionsgemische 1 und 2	20 µl

Das Reaktionsgemisch 1 (vgl. Tab. 15) wurde in einem 0,2 ml PCR-Tube angesetzt und im Thermocycler (Biometra) bei 65°C fünf Minuten erhitzt und danach sofort für mindestens eine Minute auf Eis gegeben.

In der Zwischenzeit wurde der zweite Reaktionsmix (vgl. Tab. 16) angesetzt. Je 8 µl des Reaktionsgemisches 2 wurden der ersten Lösung zugefügt. Danach wurde zuerst zehn Minuten bei 25°C und darauf eine Stunde bei 42°C erhitzt. Am Ende wurde die Transkriptase durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C deaktiviert. Die komplementäre DNA wurde nun als Template in der PCR eingesetzt oder zur späteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde in dem 3-Block Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt.

Protokoll der Schweineinfluenzavirus-Subtypisierung:

Das Schweineinfluenzavirus-Probenmaterial entstammt aus dem zur Routinediagnostik eingesandten Probenmaterial. Das Material der Probennummer 114 und 127 entstammte aus Organmaterial (Lunge), wohingegen das Material der Probennummer 140 aus einem Nasentupfer gewonnen wurde.

Potentiell im Probenmaterial enthaltenes Virus wurde zuerst in embryonierten Hühnereiern vermehrt und danach aus einem 140 µl Aliquot der Allantoisflüssigkeit mit dem Qiagen RNA mini Extraktion Kit die RNA extrahiert. Die Umschreibung der RNA zu cDNA erfolgte durch Randompriming der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die in der PCR verwendeten Primer sind in Abschnitt II 1.5.1 Tabelle 10 aufgelistet.

Die Tabellen 17 und 18 zeigen das für die Schweineinfluenzasubtypisierung verwendete PCR-Protokoll.

Tab. 17: Thermalprofil der H1-PCR für Schweineinfluenza Subtypisierung

Initiale Denaturierung	95°C 15 Min.	
Denaturierung	95°C 60 Sek.	35 Zyklen
Annealing	50°C 30 Sek.	
Elongation	72°C 60 Sek.	
Finale Elongation	72°C 10 Min.	

Tab. 18: Reaktionsgemisch für Schweineinfluenza Subtypisierung

Reagenzien	Menge
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
Primer for/rev (50 mM)	0,1 µl
HotstarTaq	0,5 µl
dNTP (je 10 mM)	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl
cDNA Template	1 µl
Gesamtvolumen	
Reaktionsansatz	50 µl

Protokoll für PA/NA-PCR

Für die Amplifizierung der Proteine Polymerase Acid (PA) und Neuraminidase (NA) des Influenza A Virus Isolat A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 wurde die RNA dieser Proteine mit genspezifischen Primern zu cDNA umgeschrieben, um unspezifische Produkte bei der Reversen Transkription zu vermeiden. Die in der PCR verwendeten Primer sind in Abschnitt II 1.5.1 Tabelle 11 aufgelistet.

Die Tabellen 19 und 20 zeigen das zur Amplifikation verwendete PCR-Protokoll.

Tab. 19: Thermalprofil der PA/NA-PCR

Initiale Denaturierung	98°C 30 Sek.	
Denaturierung	98°C 10 Sek.	35 Zyklen
Annealing	NA: 58°C 30 Sek. PA: 60°C 30 Sek.	
Elongation	72°C 30 Sek.	
Finale Elongation	72°C 10 Min.	

Tab. 20: Reaktionsgemisch für PA/NA-PCR

Reagenzien	Menge
5x Phusion®HF Puffer	10 µl
Primer for/rev (10 µM)	2 µl
Phusion® Polymerase (0,02 U/µl)	0,5 µl
dNTP (je 10 mM)	1 µl
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl
cDNA Template	1 µl
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	50 µl

2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde je nach Größe der zu erwartenden Fragmente ein 1-1,5 % Agarosegel hergestellt. Dazu wurde Agarosepulver in TAE-Puffer gelöst und Ethidiumbromid zur Visualisierung zugesetzt (3 µl Ethidiumbromidlösung in 100 ml Gel). 9 µl Probe wurden mit 1 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus der PCR erfolgte in einer

Gelelektrophoresekammer der Firma Biometra (Göttingen) bei 90 Volt und 500 mAmp. in 50-60 Minuten.

Zur Auswertung diente das Geldokumentationsgerät von Biometra, bei dem die DNA-Fragmente mit Hilfe von kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=254$ nm) sichtbar gemacht werden. Sollten die DNA-Fragmente sequenziert werden, wurden die Banden auf einer UV-Platte bei langwelligem UV-Licht ($\lambda=360$ nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel-Extraktionskits von Qiagen nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert.

Die Sequenzierung erfolgte extern bei der Firma Eurofins MWG (Martinsried) mittels der auch bei der PCR verwendeten Primer.

2.3.6 Real-Time-quantitative PCR

Mit Hilfe der Real-Time-quantitativen PCR (qPCR) kann die Quantität neu amplifizierter DNA während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) direkt abgelesen werden. Die in dieser Studie eingesetzte Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip der Detektion der pro Amplifikationszyklus abgegebenen Fluoreszenzsignale unter Verwendung von sequenzspezifischen Fluorochrom-gekoppelten Sonden.

PanInfluenza Reverse Transkription Real-Time-quantitative PCR (RT-qPCR)

Das für die panInfluenza RT-qPCR verwendete Protokoll wird in den Tabellen 21 und 22 aufgeführt.

Tab. 21: Thermalprofil für die panInfluenza RT-qPCR nach Spackman et al. (2002)

Reverse Transkription	50°C 30 Min.	
Inaktivierung RT/ initiale Denaturierung	94°C 2 Min.	
Denaturierung	94°C 30 Sek.	50 Zyklen
Annealing	57°C 30 Sek.	
Elongation	68°C 30 Sek.	

Tab. 22: Reaktionsgemisch für die panInfluenza RT-qPCR

Reagenzien	Menge
DEPC-H ₂ O	ad 25 µl
2x Reaktion Mix	12,5 µl
SuperScript II Platinum Taq DNA Polymerase	1 µl
<u>IVA-1 Primer-Sonden-Mix:</u> 20 µl Primer IVA-1 for 100 pm/µl 30 µl Primer IVA-1 rev 100 pm/µl 2,5 µl Sonde IVA-1 (FAM) 100 pm/µl	2 µl
<u>IVA-2 Primer-Sonden-Mix:</u> 5 µl IVA-2 for 100 pm/ml 5 µl IVA-2 rev 100 pm/ml 2,5 µl Sonde IVA-2 (HEX) 100 pm/ml	2 µl
RNA-Template	5 µl
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	25 µl

Je nach Probenumfang wurde die PCR in 96-Loch-Microplatten oder in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt und mit den Thermocyclern Mx3000P[®] und Mx3005P[™] der Firma Stratagene durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der vom Hersteller mitgelieferten MxPro[™] QPCR Software.

Die qPCR Ergebnisse werden als „cycle threshold“ Werte (C_t-Werte) angegeben, da der Ausgangsgehalt in den Proben nicht bekannt war und somit keine Standardkurve erstellt werden konnte, mit welcher die Genomkopiezahl der Proben anhand der ermittelten C_t-Werte angegeben werden kann. Der C_t-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem erstmalig die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Als positiv galten C_t-Werte mit einem Anstieg der Fluoreszenzsignale bis zum Zyklus 36. Alle anderen Werte wurden nach Vorgaben des nationalen Referenzlabors (FLI, Insel Riems) als negativ bewertet. Als Positivkontrolle wurde RNA der Influenza A Virussubtypen H5 bzw. H7 und

die interne Kontrolle (IC2) zur Sicherung einer effizienten Amplifikation und zur Beurteilung der Quantifizierung mitgeführt.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Interferon- α ELISPOT (Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Test)

Der IFN- α ELISPOT dient dem Nachweis von Interferonbildung und Sekretion durch Zellen ausgelöst durch die eingesetzten Virusstimuli. Bei allen Blutspendertieren wurden parallel die PBMC und Fibrozyten untersucht.

Beschichten und Blocken der Platte:

96-Loch-Platten von der Firma Milipore (Schwalbach) wurden mit 15 μ l Ethanol 35 % benetzt und nach einer Inkubationszeit von einer Minute dreimal mit sterilem PBS (sPBS) gewaschen. Die Platte wurde nun mit den monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen IFN-alpha (Mouse anti-porcine-IFN- α (27100, PBL), 5 μ g/ml) beschichtet. Dabei wurden 100 μ l mAb pro Vertiefung einpipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um überschüssige Antikörperlösung zu entfernen, wurde die Platte zweimal mit je 150 μ l Blocklösung (DMEM + 20 % FBS, 1 % NEA, 0,2 % Gentamycin) pro Vertiefung gewaschen und anschließend mit 200 μ l dieser Lösung mindestens zwei Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ freie Bindungsstellen der Plattenvertiefungen geblockt.

Zugabe der Zellen und Stimuli:

Nach Abkippen der Blocklösung wurden in jede Vertiefung 100 μ l PBMC bzw. Fibrozyten mit einer Zellzahl von 5×10^6 lebende Zellen/ml eingesät. Als Stimuli wurden die verschiedenen Influenza A Virussubtypen FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, H1N1 Sw. 140, A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 und A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2, sowie ein Paramyxovirus (Newcastle Disease Virus) und/oder ein Parapoxvirus (ORFV) als Positivkontrolle verwendet. Je 100 μ l Viruslösung wurden entsprechend 100 hämagglutinierenden Einheiten (HAE)

bzw. im Fall von ORFV mit einer MOI ~ 1 pro 100 μl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert.

Nachweis von IFN- α :

Nach einer Inkubationszeit von 21-23 Stunden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ wurden, nach zehnmalem Waschen mit PBS (ohne Ca/Mg) + 0,05 % Tween20, 100 μl Detektor-Antikörper (Rabbit anti-porcine-IFN- α ; 37100, PBL) in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und eine Stunde inkubiert (bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit). Die Antikörper wurden in PBS (ohne Ca/Mg) mit 0,1 % FBS-Gehalt verdünnt. Durch zehnmalem Waschen mit PBS (ohne Ca/Mg) + 0,05 % Tween 20 wurden Reste der Antikörperlösung beseitigt. In einer Verdünnung von 1:2.000 wurden 100 μl HRP konjugierte anti-rabbit Antikörper (Promega, Mannheim) pro Vertiefung pipettiert und 45 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen der überschüssigen Antikörperlösung wurde viermal mit PBS (ohne Ca/Mg) + 0,05 % Tween20 und dreimal mit PBS (ohne Ca/Mg) gewaschen.

Zur Visualisierung vorliegender Antikörperkomplexe wurden 100 μl Peroxidasesubstrat pro Vertiefung (Biozol, Eching) für fünf Minuten auf der Platte belassen. Anschließend wurde die Platte gründlich unter fließendem Wasser gewaschen. Nach Abnahme der Folie wurde die Platte 24 Stunden getrocknet und anschließend mit Hilfe des EliSpot-Reader Systems ausgewertet.

Die Anzahl an IFN- α spezifischen Spots errechnet sich aus der Subtraktion des Mittelwertes der korrespondierenden Negativkontrollen von dem Mittelwert der Spotzahlen aller Vertiefungen, die mit demselben Stimulus erzeugt wurden.

2.4.2 Vesikulärer Stomatitis Virus-Hemmtest

Der Vesikuläre Stomatitis Virus-Hemmtest (VSV-Test) dient der Bestimmung antiviraler Aktivität in Zellkulturüberständen, die durch Verhinderung der Zellzerstörung durch das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) nachgewiesen wird (Rubinstein et al., 1981).

Gewinnung der Zellkulturüberstände

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC):

PBMC wurden, wie in Abschnitt II 2.1.2 beschrieben, gewonnen und mit einer Zelldichte von 1×10^6 lebende Zellen/ml in eine 24-Lochplatte eingesät. Anschließend wurden sie mit 100 hämagglutinierenden Einheiten (HAE) der verschiedenen Influenzasubtypen (FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, H1N1 Sw. 140, A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2) und des Newcastle Disease Virus und/oder mit MOI ~ 1 des Parapoxvirus pro Vertiefung beimpft. Nach Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 für 24 Stunden wurden vorsichtig 700 μl Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

Fibrozyten:

Zur Gewinnung der Fibrozyten wurden PBMC mit einer Zelldichte von 1×10^7 lebende Zellen/ml in eine 24-Lochplatte eingesät (20 % FBS + DMEM). Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, der anschließend einmal wöchentlich wiederholt wurde. Sobald ein dichter Zellrasen (ca. 1×10^4 Zellen/ml) vorhanden war, wurden die Fibrozyten ebenfalls mit 100 HAE bzw. MOI ~ 1 bei ORFV Viruslösung - der oben genannten Virustypen - pro Vertiefung beimpft. Nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO_2 wurden auch hier vorsichtig 700 μl Überstand abgenommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

Es wurden immer paarweise Zellkulturüberstände von PBMC und Fibrozyten eines Individuums gewonnen und parallel untersucht.

In der Tabelle 23 werden die zur Induktion der Sekretion von antiviralen Substanzen, eingesetzten Viren aufgelistet.

Tab. 23: Eingesetzte Induktoren zur Sekretion antiviraler Substanzen

Virusisolat/ Stimulus	Abkürzung	Gebrauchs- konzentration
Parapoxvirus (D1701)	ORFV	MOI ~ 1
New Castle Disease Virus, La Sota	NDV	100 HAE
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	H1N1 185/8 avi	100 HAE
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	H5N2 avi	100 HAE
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	H1N1 Sw Impf	100 HAE
H1N1 Sw Feldisolat 140	H1N1 Sw 140	100 HAE

Bestimmung der antiviralen Aktivität der Zellkulturüberstände

Die Gebrauchsverdünnung (GV) des verwendeten Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) wurde durch eine \log_2 -Titration in MDBK Zellen im Doppelansatz ermittelt. Es wurde die Virusverdünnung gewählt, die nach Inkubation über Nacht eine nahezu vollständige Zellyse hervorgerufen hat (VSV-GV: 1:700). Als Interferonkontrolle wurde ein IFN- α -Standard verwendet, um den Gehalt an antiviral wirksamen Substanzen bestimmen zu können (1,56 mg/ml; zur Verfügung gestellt von Dr. E. Wolf, Genzentrum München).

In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde beginnend mit den unverdünnten Zellkulturüberständen eine \log_2 -Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurden in die erste Vertiefungsreihe im Doppelansatz 100 μ l Probe einpipettiert und in alle weiteren Vertiefungen der Platte 50 μ l Medium (MEM Earls + 10 % FBS + 1 % NEA + 1 % Bic) vorgelegt. Nun wurde vertikal eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt. Für die IFN- α -Kontrolle wurde ebenfalls eine 1:2 Verdünnungsreihe vertikal mit dem IFN- α -Standard angelegt. In die zwei vertikalen 8-Loch-Reihen, die als Zellkontrolle bzw. Viruskontrolle dienten, wurden nur je 50 μ l Medium pro Vertiefung einpipettiert.

Allen Plattenvertiefungen wurde 50 µl MDBK-Zellsuspension, die auf $1,3 \times 10^6$ lebende Zellen/ml eingestellt war, zugegeben und die Platte bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt sechs Stunden inkubiert.

Hatte sich in allen Plattenvertiefungen ein dichter, adhärenter Zellrasen (Monolayer) gebildet, wurde das Medium vorsichtig unter sterilen Bedingungen abgekippt und 50 µl der VSV-Gebrauchskonzentration pro Well zugegeben. Bei der Zellkontrolle wurden anstatt der Viruslösung 50 µl Medium einpipettiert.

Nach einer einstündigen Virusadsorption bei 37°C, 5 % CO₂-Sättigung wurde in jede Vertiefung 100 µl Medium zugegeben und die Platte über Nacht im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert.

Ausgewertet wurde der Test, sobald bei der Viruskontrolle eine 100 %ige Zellzerstörung (zytopathogener Effekt, cpE) sichtbar war. Zur Auswertung wurde die Platte unter dem Mikroskop beurteilt und die Endverdünnungsstufen ermittelt, bei welchen 50 % cpE auftraten. Die Berechnung des Gehalts an antiviralen Substanzen in den Zellkulturüberständen erfolgte durch den mitgeführten IFN-α Standard. Die antivirale Wirkung des IFN-α-Standards ist definiert, dass eine Einheit (Unit, U) des IFN-α-Standards die Zerstörung durch das Vesikuläre Stomatitis Virus von MDBK Zellen um 50 % reduziert.

$$\text{VSV-antivirale Aktivität} = \frac{\text{Konzentration IFN-}\alpha \text{ in IFN-}\alpha\text{-Standard} \times \text{Verdünnungsstufe Probe}}{\text{Verdünnungsstufe IFN-}\alpha\text{-Standard}}$$

2.4.3 Immunhistologie

Um die Infektionsfähigkeit der Influenzasubtypen FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, H1N1 Sw. 140, A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 zu überprüfen, wurde mittels Immunhistologie Virusantigen in den Zellen nachgewiesen. Zellmonolayer wurden mit 0,1 ml Viruslösung mit einer MOI von 1 infiziert. Nach zweistündiger Adsorption bei 37°C wurde das Einsaatvirus durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS

entfernt, um nur das in die Zellen aufgenommene bzw. das sich in den Zellen vermehrte Virus zu erfassen.

48 Stunden nach der Infektion der Zellen wurde der Inhalt der Platten vorsichtig abgekippt und die einzelnen Vertiefungen mit Waschlösung 1 (WL 1) dreimal gewaschen. Nach einer 20-minütigen Fixierung mit einem Ethanol-Methanol-Gemisch bei 4°C erfolgte die Zugabe eines Influenza A Virus spezifischen Immuserums (Kaninchenserum anti-H1N1; 1:1000 in PBS + 2 % Pferdeserum verdünnt). Um unspezifische Bindungen der Serumantikörper zu minimieren, wurden diese vorab auf den zu färbenden Zellen 30 Minuten bei 37°C adsorbiert.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Platte dreimal mit Waschlösung 2 (WL 2) gewaschen und die Detektionsantikörper zugegeben (Anti-rabbit-HRP; 1:2500 in PBS + 2% Pferdeserum verdünnt). Erneut wurde die Platte eine Stunde bei 37°C inkubiert, gefolgt von drei weiteren Waschschritten mit WL 2. Es folgte die Zugabe von Peroxidase-Substrat, welches durch das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym umgesetzt wurde. Abschließend wurde die Platte noch einmal mit WL 1 gewaschen und danach WL 1 als Stopplösung auf der Platte belassen.

Eine intrazelluläre Influenza A Virus-spezifische Antigenpräsenz wurde anschließend lichtmikroskopisch (Axiovert 40C Zeiss, Göttingen; Vergrößerung 1x5 bis 1x20) ausgewertet.

2.5 Durchflusszytometrische Analysen

Zur Charakterisierung von Fibrozytenantigenen wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet. Es wurden von jeder Probe je 10 000 Zellen untersucht.

2.5.1 Markierung von Zelloberflächenantigenen

Bei der Fluoreszenz-basierten Markierung von Zelloberflächenmarkern wurde für die Waschschrirte immer PBS ohne Kalzium und Magnesium verwendet.

Die adhärenren Fibrozyten wurden mittels sterilen Zellschabern von der Zellkulturschale gelöst und einmal mit PBS gewaschen (1.000 U/min, zehn Minuten; Megafuge 1.0, Heraeus). Eine Einzel-Zellsuspension wurde durch gründliches Resuspendieren mit PBS erreicht und die Zellen auf 2×10^7 lebende Zellen/ml eingestellt.

Je 25 μ l Zellsuspension wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und durch Zentrifugieren (1.200 U/min, zwei Minuten) pelletiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden „cluster of differentiation (CD)“ spezifische Primärantikörper (vgl. Tab. 6) zugefügt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Platte mit 100 μ l PBS pro Vertiefung wurden die ungebundenen Antikörper entfernt. Da die Primärantikörper nicht bereits fluorochromgekoppelt waren, folgte ein weiterer Antikörperzugabeschritt. Die für die Isotypen der Primärantikörper spezifischen Fluoreszein-gekoppelten Sekundärantikörper (vgl. Tab. 7) wurden in angegebener Konzentration zugegeben und zehn Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde mit je 100 μ l PBS pro Vertiefung gewaschen und am Ende 100 μ l PBS pro Plattenvertiefung belassen. Um eine gute Einzel-Zellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen kurz vor der Analyse durch ein Stahlnetz (Maschenweite 0,042 mm) in 350 μ l FACS-Flow pipettiert.

Bei der Analyse aller Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen wurden eine nicht markierte Zellkontrolle sowie eine nur mit dem jeweiligen IgG Isotyp-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper inkubierte Probe - als Hintergrund-Negativkontrolle – mitgeführt (vgl. Abb. 1).

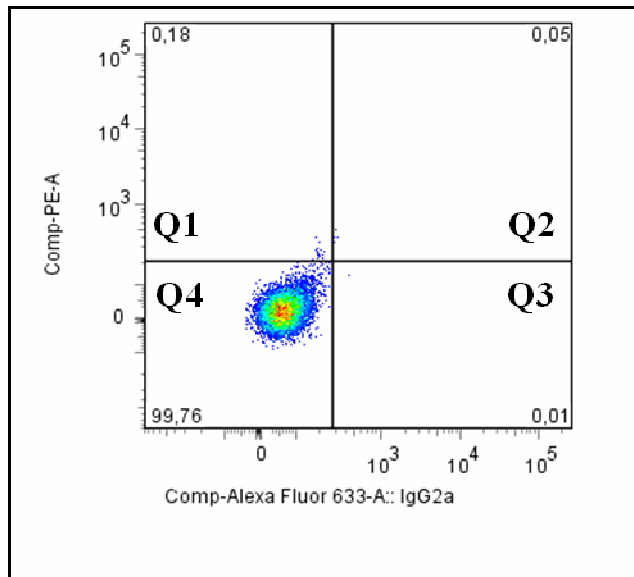


Abb. 1: Punktediagramm: Als Negativkontrolle wurden primäre porcine Fibrozyten nur mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern inkubiert

Q1: PE einfach positive Zellen

Q2: ALEXA Fluor 633 und PE doppelpositive Zellen

Q3: ALEXA Fluor 633 einfach positive Zellen

Q4: ALEXA Fluor 633 und PE negative Zellen

Bei der Auswertung der Negativkontrolle wurde das Punktediagramm in jeweils vier Quadranten so unterteilt, dass die nur mit dem Sekundärantikörper inkubierten Zellen alle in dem vierten Quadranten (links unten; Q4) zu liegen kamen (vgl. Abb. 1). Danach wurde die Quadranteneinteilung auf alle weiteren zugehörigen Proben übertragen. Als positivmarkiert wurden alle Zellen gewertet, die nicht im Quadranten Q4, links unten abgebildet wurden.

Die Auswertung erfolgte mit den Programmen FlowJo und FACS Diva 6.0.

2.5.2 Intrazellulärer Kollagennachweis

Für die Waschschritte bei dem intrazellulären Antigennachweis wurde immer PBS ohne Kalzium und Magnesium verwendet.

Mittels Zellschabern wurden die adhärennten Fibrozyten von der Zellkulturschale gelöst und anschließend bei 1.000 U/min zehn Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Die Zellen wurden mit PBS gut resuspendiert, um möglichst eine

Einzel-Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen mit dem Lebend-Tot-Ausschlussfarbstoff Trypanblau inkubiert und nur die lebenden (ungefärbten) Zellen gezählt und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Nur Proben mit $> 90\%$ lebenden Zellen wurden verwendet.

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 100 μ l 1 % Paraformaldehyd (verdünnt in PBS) pro Vertiefung und 15-minütiges Inkubieren bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μ l PBS zugegeben und bei 1.200 U/min zwei Minuten zentrifugiert. Durch die Zugabe von 100 μ l Digitonin (0,01 %) wurde die Zellmembran permeabilisiert, damit die Antikörper in die Zelle eindringen können. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde mit 100 μ l PBS gewaschen (1.200 U/min, zwei Minuten zentrifugiert).

100 μ l des Primärantikörpers gegen Kollagen Typ I (1:1.000 verd. in PBS) wurden pro Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 100 μ l PBS gewaschen (1.200 U/min, zwei Minuten zentrifugiert). Da der Primärantikörper nicht fluorochromgekoppelt war, bedurfte es sekundärer Detektorantikörper. 100 μ l ALEXA Fluor 633 gekoppelte Antikörper wurden pro Vertiefung zugegeben und zehn Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 100 μ l PBS wurden die Zellen durch ein Stahlnetz (Maschenweite 0,042 mm) in 350 μ l FACS-Flow überführt und eingelesen.

Die intrazelluläre Färbung und die Antikörperbindung an Zelloberflächenmarker erfolgten gleichzeitig.

Zur Analyse der Negativkontrolle wurden die Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, in einem Histogramm gegen ALEXA Fluor 633 dargestellt. Ein Marker wurde auf die ALEXA Fluor 633 negativen Zellen gesetzt (Hintergrundfluoreszenz) und auf die weiteren Proben übertragen (vgl. Abb. 2). Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität außerhalb des Markerbereichs wurden als positiv gewertet.

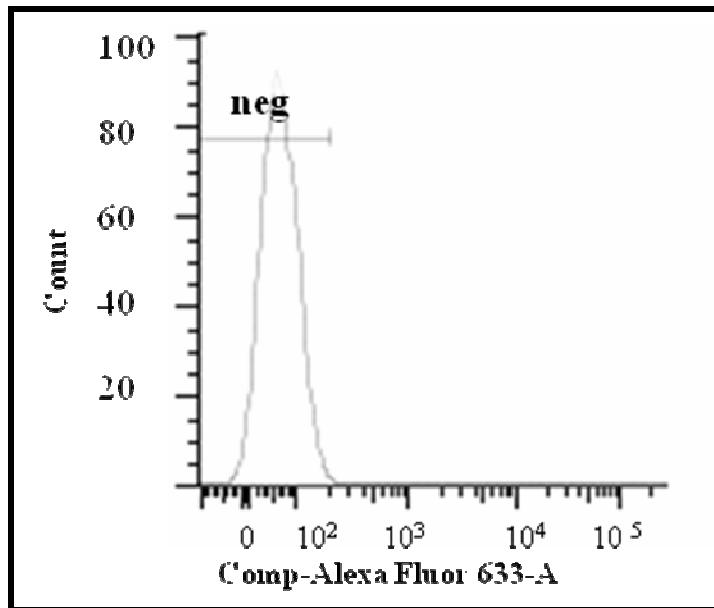


Abb. 2: Histogramm: Als Negativkontrolle wurden primäre porcine PBMC nur mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 633 (x-Achse) inkubiert; der Marker (Balken; neg.) wurde auf die Alexa Fluor 633 negativen Zellen gesetzt und als Hintergrundrichtwert benutzt.

Die Vorversuche zur Austestung des Kollagen I Antikörpers wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt, da sie bekannter weise intrazellulär Kollagen exprimieren (Green und Goldberg, 1965). Dabei wurden nach dem gleichen Protokoll vorgegangen, wie es anschließend auch bei den Fibrozyten verwendet wurde.

IV. Ergebnisse

1. Gewinnung der Influenza Virus Isolate

Das in der Virusdiagnostik eingehende Geflügelprobenmaterial wurde zunächst gemäß dem im Qualitätsmanagement des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) festgelegten Untersuchungsstandard behandelt und einem Influenza A Screening mittels panInfluenza RT-qPCR unterzogen (Spackman et al., 2002). Bei einem positiven Influenza A Virusgenomnachweis wurden die Proben zur Subtypisierung an das Nationale Referenzlabor des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI, Insel Riems) geschickt sowie in einer H5/H7/N1-RT-qPCR auf diese Subtyp-Genomkomponenten am LGL weiter untersucht (Fuchs, 2009; Rabl, 2010).

Das Influenza A Virus Genom (A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1) wurde nach Hämagglutinin- und Neuraminidase-Typbestimmung von Dr. Roland Zell am Universitätsklinikum Jena komplett mit dem Illumina® Hochleistungssequenziergerät sequenziert. Die Gensegmente der kodierten Sequenz für die Neuraminidase (NA) und einem kodierenden Teilbereich des Polymerasekomplexes (PA) mussten aufgrund problematischer RNA Sekundärstrukturen konventionell mit Hilfe der RT-PCR amplifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden von der Firma Eurofins Operon (Martinsried) sequenziert (vgl. Abschnitt IX).

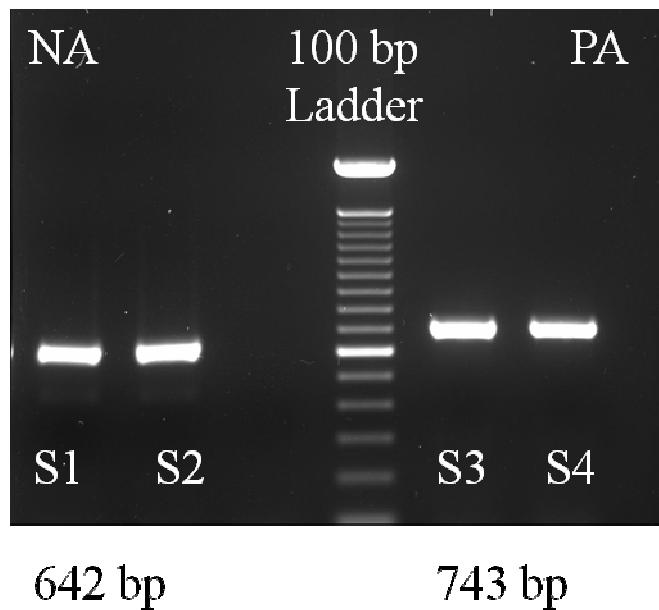


Abb. 3: PA und NA PCR

(bp=Basenpaar)

Erwartete PCR-Fragmente der amplifizierten NA (642 bp) und PA (743 bp) Segmente des Influenza A Virus (A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1) und (A/Mallard/Bavaria/185-26/2008 H1N1) gelelektrophoretisch aufgetrennt in einem 1 % Agarosegel mit einer 100 bp-Ladder als Größenmarker (prominente Bande bei 600 bp).
 S1: NA-Fragment A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1
 S2: NA-Fragment A/Mallard/Bavaria/185-26/2008 H1N1
 S3: PA-Fragment A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1
 S4: PA-Fragment A/Mallard/Bavaria/185-26/2008 H1N1

Das Schweineprobenmaterial (Probennummern: 114, 127 und 140) wurde ebenfalls nach dem festgelegten Untersuchungsstandard des LGL behandelt. Ein positiver Influenza A Virusgenomnachweis konnte in der panInfluenza-RT-qPCR für alle drei Schweineproben ermittelt werden (vgl. Tab. 24).

Tab. 24: Influenza A Virusgenomnachweis der Schweineproben in der panInfluenza-RT-qPCR

Schweineprobenmaterial (Probennummer)	C _t -Wert
114	16,4
127	15,33
140	14,33

Da beim Schwein hauptsächlich die drei Influenza A Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 vorkommen (Choi et al., 2002; Olsen, 2002), wurden die Proben zuerst auf das Vorliegen des Neuraminidasesubtyps N1 untersucht, da hier bereits eine vom FLI etablierte H5/H7/N1-RT-qPCR zur Verfügung stand. Bei dem Feldisolat mit der Probennummer 140 konnte als einziges der drei Schweineinfluenzaisolate in der N1-spezifischen RT-qPCR ein positiver Nachweis des N1-Gensegmentes detektiert werden ($C_t = 16,74$).

Die Primerauswahl für die weitere Bestimmung der HA- und NA-Subtypkomponenten erfolgte durch Alignment verschiedener, in der NCBI-Gendatenbank vorliegender, Hämagglutinin und Neuraminidase Gensequenzen porciner Influenza A Viren, um auf diese Weise hochkonservierte Bereiche für die Primerbindungsstellen zu ermitteln. Die ausgewählten Primer wurden von der Firma Eurofins Operon (Martinsried) synthetisiert. Das für die H1-spezifische RT-PCR erwartete DNA-Amplifikationsfragment hatte eine Länge von 955 Basenpaaren (bp). Mit der N2 spezifischen RT-PCR wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 571 bp amplifiziert. Bei der Subtypisierung des Probenmaterials konnte anhand der konventionellen RT-PCR ein H1N1 Influenza A Virus (Probennummer 140) und zwei H1N2 Influenza A Viren (Probennummern 114 und 127) festgestellt werden (vgl. Abb. 4).

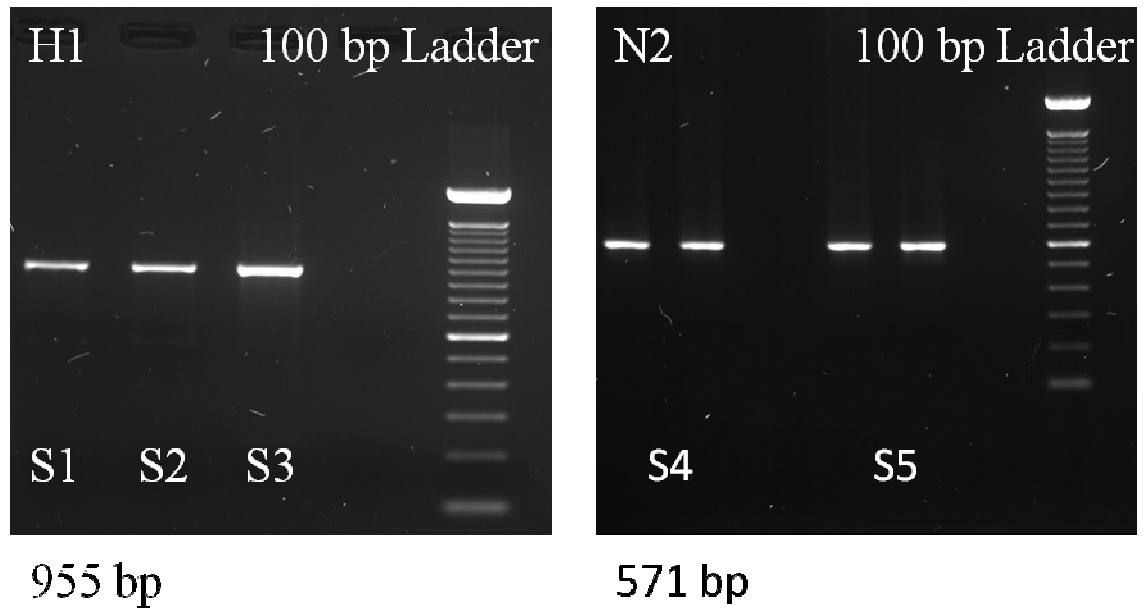


Abb. 4: Schweineinfluenzasubtypisierung der Proben 114, 127 und 140

Erwartete DNA-Fragmente der H1 (955 bp) und N2 (571 bp) RT-PCR der Schweineinfluenza A Virusisolate mit den Probennummern 114, 127 und 140 gelelektrophoretisch aufgetrennt in einem 1,5 % Agarosegel mit einer 100 bp Ladder als Größenmarker (prominente Bande bei 600 bp).

S1-3: H1-DNA-Fragment; S1: Probe 114; S2: Probe 127; S3: Probe 140

S4-5: N2-DNA-Fragment; S4: Probe 114 im Doppelansatz; S5: Probe 127 im Doppelansatz

Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden extern von der Firma Eurofins Operon (Martinsried) sequenziert (vgl. Abschnitt IX).

In den weiteren Versuchen wurde nur das H1N1 Schweineinfluenza A Isolat eingesetzt, um so einen direkten Vergleich zu dem H1N1 Schweineimpfstamm (FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1) und dem aviären H1N1 Influenzasubtyp (A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1) herzustellen.

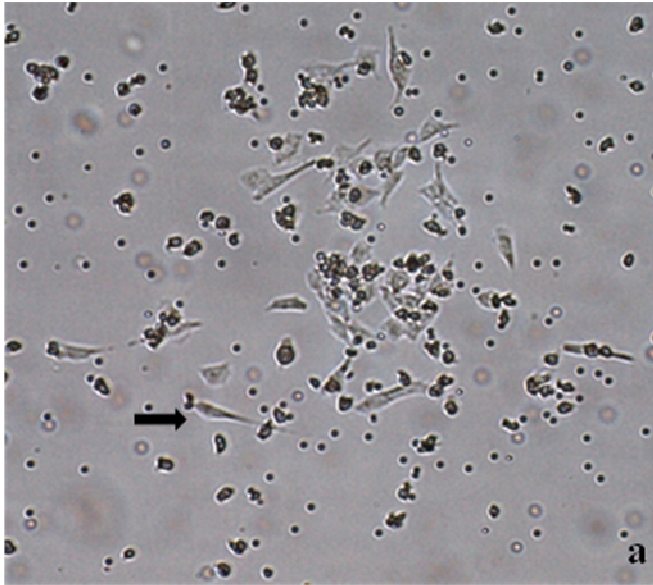
Die für diese Studie ausgewählten Influenza A Subtypen wurden in größerer Menge in zehntägigen embryonierten Hühnereiern vermehrt und jeweils der Hämagglutinationstiter (HA-Titer) bestimmt. Nach grober Reinigung der Virus-haltigen Allantoisflüssigkeit über ein 40 %iges Zuckerkissen (Saccharose) und Konzentration durch Ultrazentrifugation (40.000 U/min, 4°C, zwei Stunden; OptimaTM L-90 K) wurde der Virustiter in MDCK Zellen bestimmt (vgl. Tab. 25).

Tab. 25: Eingesetzte Virussubtypen

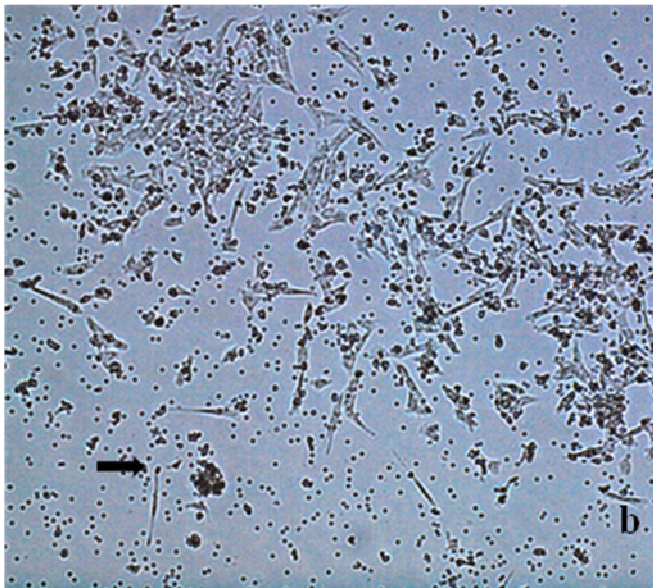
Influenza A Virussubtyp	hämagglutinierende Einheit (HAE in 25 µl)	MDCK Zellkulturtiter (KID ₅₀ log10)
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 3. Eipassage	> 256	10 ^{6,5} /ml
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 3. Eipassage	> 320	10 ^{6,5} /ml
H1N1 Sw 140 3. Eipassage	> 160	10 ^{3,5} /ml
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 6. Zellpassage (MDCK Zellen)	8000	10 ⁸ /ml

2. Lichtmikroskopische Morphologie von porcinen peripheren Fibrozyten

Die PBMC wurden gemäß der in Abschnitt III 2.1.2 beschriebenen Methode gewonnen und mit einer Zelldichte von 10⁷ Zellen/ml eingesät (Anzuchtmedium: DMEM + 20 % FBS). Nach zwei Tagen wurden die nichtadhärenten Zellen abpipettiert. Ab dem dritten bis fünften Tag waren erste Fibrozyten mit ihrer typischen Morphologie als adhärenente spindelförmige Zellen zu erkennen (vgl. Abb. 5 a). Diese spindelförmigen Zellen zeigten ein inselförmiges Wachstum. Im Laufe der ersten Woche fand eine weitere Differenzierung spindelförmiger Zellen und eine Ausweitung der Zellinseln, die teilweise zu größeren Arealen zusammenwuchsen, statt. Innerhalb von zwei bis drei Wochen entstand so aus den einzelnen Inseln ein zusammenhängender Zellrasen (vgl. Abb. 5 b). Im Laufe der Kultur kam es bei zu starkem Zellwachstum an einer Stelle immer wieder zur Ablösung ganzer Inselgruppen bevor diese zu einem Zellrasen (Monolayer) zusammenwachsen konnten. Nach Subkultivierung der Fibrozyten bildete sich innerhalb von vier Tagen ein neuer Zellrasen aus den typischen spindelförmigen Zellen aus.



Primäre Fibrozyten 4 Tage in Kultur



Primäre Fibrozyten 5 Tage in Kultur

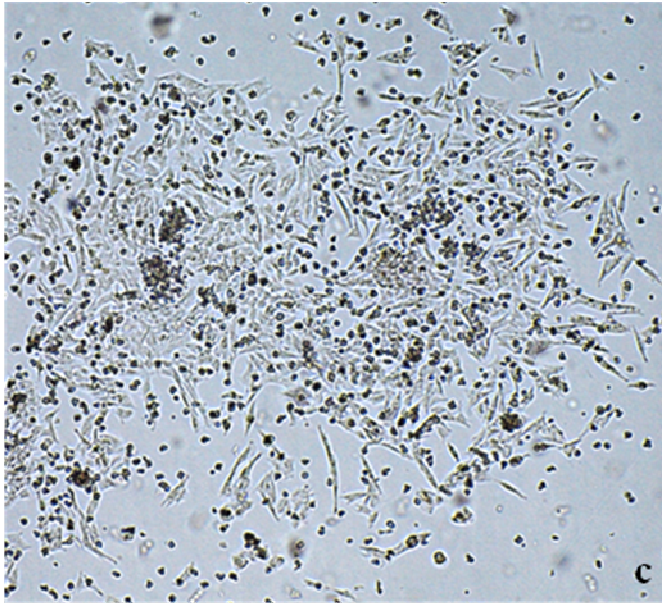
Abb. 5a: Wachstumsstadien von primären porcinen Fibrozyten

Primäre porcine Fibrozyten kultiviert in DMEM + 20 % FBS;

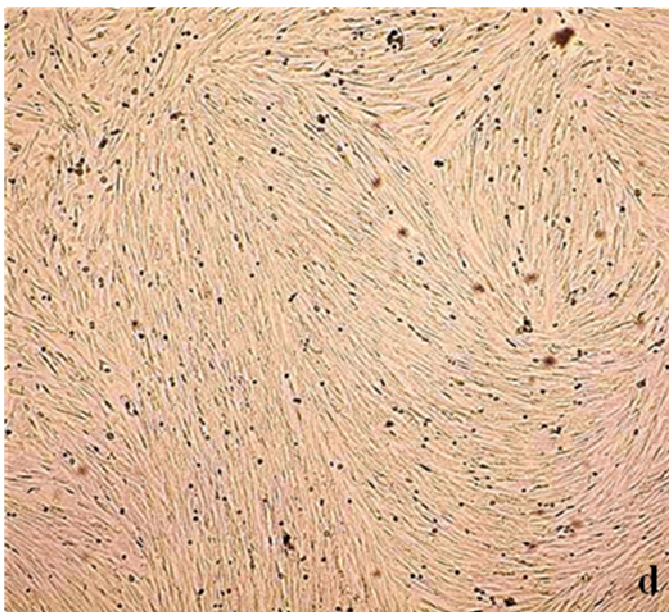
Mikroskop: Axiovert 40C Zeiss, Göttingen; Vergrößerung (a), (b) 1x10

(a) vier Tage in Kultur: erste einzelne spindelförmige Zellen (→) sind sichtbar;

(b) fünf Tage in Kultur: es kommt inselförmig zu einer Zunahme der spindelförmigen Zellen (→)



Primäre Fibrozyten 6 Tage in Kultur



Primäre Fibrozyten 10 Tage in Kultur

Abb. 5b: Wachstumsstadien von primären porcinen Fibrozyten

Primäre porcine Fibrozyten kultiviert in DMEM + 20 % FBS;
Mikroskop: Axiovert 40C Zeiss, Göttingen; Vergrößerung (c), (d) 1x10
(c) sechs Tage in Kultur: deutliche Inselbildung spindelförmiger Zellen, sowie z. T. Zusammenwachsen einzelner Inselgruppen;
(d) zehn Tage in Kultur: ein geschlossener Zellrasen ist ausgebildet

Kultivierungsversuche mit dem von Pilling et al. (2009) beschriebenen serumfreien Medium führten zu keiner nennenswerten Differenzierung von Fibrozyten aus porcinen PBMC.

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurden zehn bis 21 Tage alte Schweinefibrozyten mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen ihre charakteristischen Oberflächenmarker gefärbt. Die Darstellung ungefärbter, primärer porciner Fibrozyten im Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) und im Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC) ergaben eine dichte Zellwolke (88,42 % der Gesamtzellzahl) im Punktediagramm (dot plot) von mittlerer Größe und Granularität (vgl. Abb. 6). Bei der weiteren Auswertung wurden durch Eingrenzung (gating) nur Zellen, die in der dichten Zellwolke lagen, berücksichtigt.

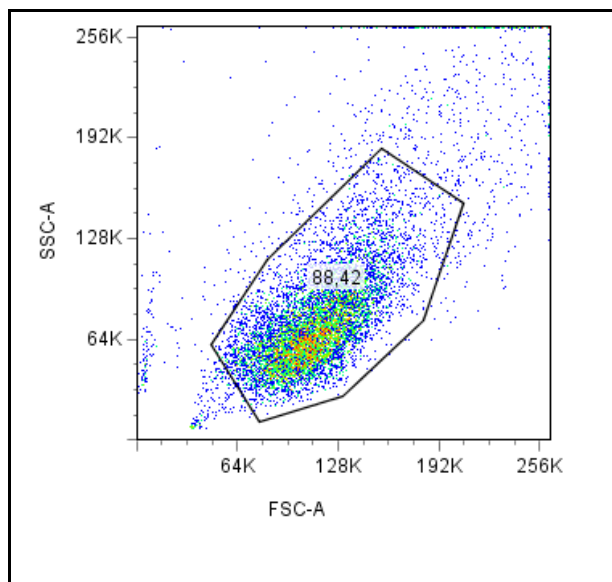


Abb. 6: Primäre porcine Fibrozyten (14 Tage in Kultur) nach Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) im Punktediagramm (dot plot) mit einem Gate um die Hauptpopulation (88,42 %).

x-Achse: FSC
y-Achse: SSC

Die zur Markierung der Oberflächenantigene eingesetzten Primärantikörper waren nicht Fluorochrom-gekoppelt. Aus diesem Grund wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörper ALEXA Fluor 633 und R-Phycoerythrin (PE) eingesetzt.

Die Markierung der Fibrozyten mit dem Anti-MHC Klasse I Antikörper ergab 67 % MHC-Klasse I positive Zellen aus der Gesamtpopulation (vgl. Abb. 7). In einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker MHC Klasse II und SWC-3 konnte bei 62,75 % der porcinen Fibrozyten eine Expression beider Oberflächenmarker nachgewiesen werden. 26,14 % der Zellen exprimierten das Oberflächenantigen SWC-3, zeigten jedoch keine Expression des MHC Klasse II Oberflächenantigens (vgl. Abb. 8). Die für primäre porcine Fibrozyten charakteristische Expression des Oberflächenantigens MHC Klasse I sowie die gleichzeitige Ausprägung der Oberflächenantigene MHC Klasse II und SWC-3 konnten auf der Oberfläche von über 60 % der untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

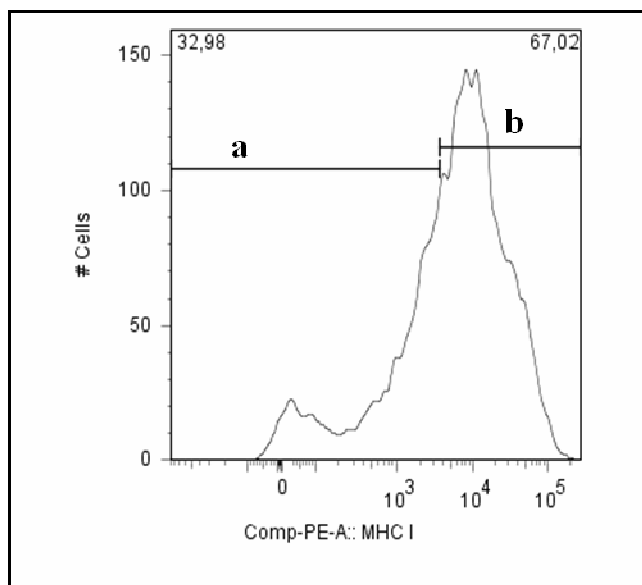


Abb. 7: Histogramm: Nachweis von Anti-MHC Klasse I Antigen auf primären porcinen Fibrozyten

x-Achse: Fluoreszenz der mit dem Anti-MHC Klasse I und PE-gekoppelten Sekundärantikörper markierten Zellen

y-Achse: Zellzahl

a: 32,96 % der Zellen zeigten keine Expression des MHC Klasse I Antigens

b: 67,02 % der Zellen zeigten eine Expression des MHC Klasse I Antigens

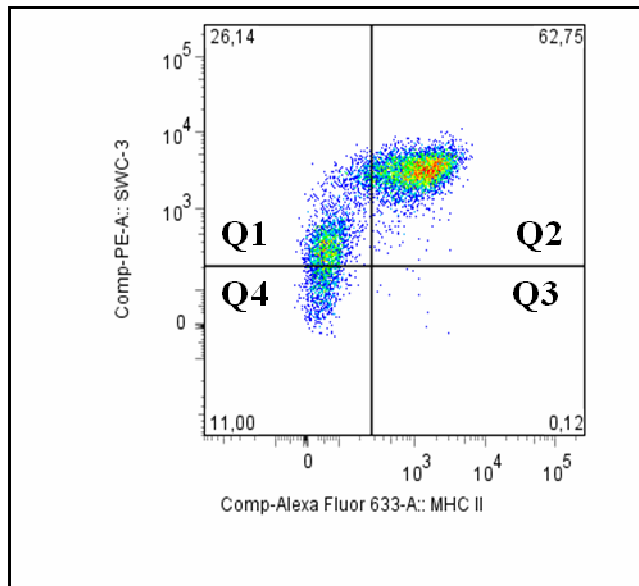


Abb. 8: Punktediagramm: Primäre porcine Fibrozyten markiert mit Anti-SWC-3 (y-Achse) und Anti-MHC Klasse II (x-Achse) Antikörpern

- Q1: SWC-3 einfach positive Zellen (26,14 %)
- Q2: doppelt markierte Zellen (62,75 %)
- Q3: MHC Klasse II einfach positive Zellen (neg)
- Q4: SWC-3 und MHC Klasse II negative Zellen (11 %)

Durch die Doppelfärbung zehn bis 21 Tage alter primärer porciner Fibrozyten mit den Antikörpern Anti-CD 14 und Anti-MHC Klasse II konnten in der Durchflusszytometrie 63 % doppelt positive Zellen ermittelt werden. 31,13 % der Fibrozyten exprimierten das Antigen CD 14 auf ihrer Oberfläche, konnten aber mit dem Anti-MHC Klasse II Antikörper nicht markiert werden (vgl. Abb. 9). Porcine Fibrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl das Oberflächenantigen CD 14 als auch das Oberflächenantigen MHC Klasse II (Balmelli et al., 2005). Anhand der Doppelfärbung im Durchflusszytometer konnte bei 63 % der Zellen eine doppelte Expression der für primäre porcine Fibrozyten charakteristischen Oberflächenantigene nachgewiesen werden.

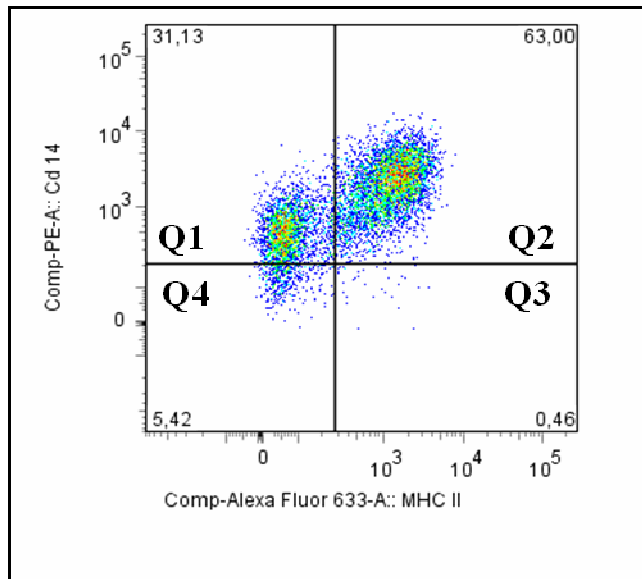


Abb. 9: Punktediagramm: Primäre porcine Fibrozyten markiert mit Anti-CD 14 (y-Achse) und Anti-MHC Klasse II (x-Achse) Antikörpern

- Q1: CD 14 einfach positive Zellen (31,13 %)
- Q2: doppelt markierte Zellen (63 %)
- Q3: MHC Klasse II einfach positive Zellen (neg)
- Q4: CD 14 und MHC Klasse II negative Zellen (5,42 %)

Durch die intrazelluläre Bindung kreuzreaktiver humaner Anti-Kollagen Typ I Antikörper in primären porcinen Fibrozyten konnte bei fast 12 % der Zellen eine Expression des Kollagen Typ I ermittelt werden (vgl. Abb. 10).

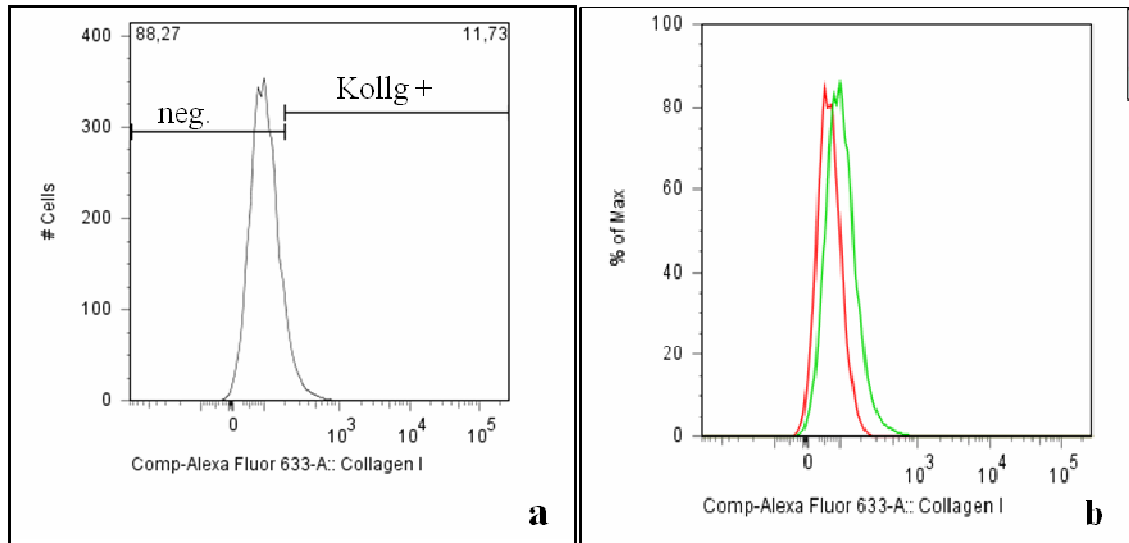


Abb. 10: Histogramm: Intrazelluläre Markierung primärer porciner Fibrozyten mit humanen Anti-Kollagen Typ I Antikörpern

(a) 11,73 % der primären porcinen Fibrozyten (14 Tage in Kultur) zeigten eine intrazelluläre Expression des Kollagen Typ I (Kollg +) nach der Fluoreszenzmarkierung mit den Antikörpern gegen humanes Kollagen I.

(b) Darstellung der Expression von Kollagen I durch primäre porcine Fibrozyten (grüne Linie) nach Überlagerung des Hintergrundsignals (rote Linie).

Untersuchungen im Durchflusszytometer ergaben, dass über 60 % der analysierten Zellen das Oberflächenantigen MHC Klasse I exprimieren. Eine gleichzeitige Expression der Antigene MHC Klasse II und SWC-3 sowie der Antigene MHC Klasse II und CD 14 auf der Oberfläche konnte auch bei über 60 % der primären porcinen Fibrozyten nachgewiesen werden. Nach der Fluoreszenzmarkierung der Fibrozyten mit den humanen Anti-Kollagen Typ I spezifischen Antikörpern konnte nur bei knapp 12 % der Zellen eine intrazelluläre Expression von Kollagen Typ I ermittelt werden.

Die aus den porcinen PBMC kultivierten Zellen konnten somit lichtmikroskopisch anhand ihrer Morphologie und durch den Nachweis der für porcine Fibrozyten typischen Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie als porcine primäre Fibrozyten charakterisiert werden.

3. Virusnachweis

3.1 Vermehrungsfähigkeit der Influenza A Virussubtyp Isolate

3.1.1 Vermehrung in Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK)

Um die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Viren (vgl. Tab. 26) in MDCK Zellen zu bestimmen, wurden die Virussubtypen in log 10 Verdünnungsstufen simultan in MDCK Zellen verimpft. Es konnten Virustiter für die aviären Influenza A Virusisolate von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml berechnet werden. Für das Schweineimpfvirus FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 ergab sich ein Virustiter von 10^8 KID₅₀/ml, während die Infektionsfähigkeit des Schweineinfluenza A Feldisolats H1N1 140 mit einem Titer von $10^{3,5}$ KID₅₀/ml deutlich geringer ausfiel. Die Infektion der Zellen mit den Influenza A Virussubtypen und die Titer wurden in der Immunhistologie mit Hilfe der Influenza A Virus-spezifischen, polyklonalen Antikörper (Kaninchenserum anti-H1N1avi) bestätigt.

In Tabelle 26 werden die Infektionstiter der verschiedenen Influenza A Virusisolate zusammengefasst.

Tab. 26: Infektionstiter der Influenza A Virusisolate in MDCK Zellen

Die Titerbestimmung erfolgte nach Ermittlung der Endpunktverdünnung mit Hilfe des zytopathogenen Effekts und immunhistologischer Färbung. Berechnet wurden die Virustiter mit der Spearman-Kaerber-Methode (Mayr et al., 1974a) (vgl. Abschnitt III 2.2.3).

Virussubtyp	MDCK Zellkulturtiter (KID ₅₀ log 10)
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	$10^{6,5}$ /ml
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	$10^{6,5}$ /ml
A H1N1 Sw 140	$10^{3,5}$ /ml
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	10^8 /ml

Bei dem Influenza A Virus (A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1) wurde zusätzlich der Infektionsverlauf über zwei Zellpassagen in MDCK Zellen untersucht. Ein zytopathogener Effekt (cpE) wurde nach simultaner log 10 Virustitration bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-4} lichtmikroskopisch beobachtet. Durch immunhistologische Färbung mit Influenza A Virus-spezifischen, polyklonalen Antikörpern (Kaninchenserum anti-H1N1avi) konnte ein Virustiter von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml berechnet werden. Bei erneuter Verimpfung (2. Passage) der unverdünnten Virusernte aus der 10^{-1} Titrations-Verdünnungsstufe in MDCK Zellen konnte nach 24 Stunden bei simultaner Inokulation bei ca. 5 % der Zellen cpE lichtmikroskopisch beobachtet werden. Die Viruspräsenz konnte mit Hilfe der panInfluenza RT-qPCR (vgl. Tab. 27) bestätigt werden.

Tab. 27: Replikation und Genomnachweis von Influenza A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in MDCK Zellen

Die Replikation und die Genompräsenz des Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in MDCK Zellen wurde über zwei Zellpassagen anhand des zytopathogenen Effekts (cpE) und der panInfluenza RT-qPCR (C_t-Werte) beurteilt.

Influenza Subtyp	Passage in MDCK Zellen	zytopathogener Effekt (cpE)	Virusgenomnachweis (C _t -Wert)
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	1. MDCK	bis Verdünnungsstufe 10^{-4}	14,73
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	2. MDCK	ca. 5 % cpE	19,91

3.1.2 Vermehrung in Fibrozyten

Um die Infektionsfähigkeit primärer porciner Fibrozyten mit den Influenza A Virusisolaten A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 sowie dem Schweineimpfvirus FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 und dem Schweinefeldisolat H1N1 140 zu testen, wurden die zehn Tage bis drei Wochen kultivierten Fibrozyten mit einer MOI 1 und MOI 0,1 der Viren infiziert. Um nur das in die Zellen aufgenommene Virus und die neu synthetisierten Nachkommenviren zu beurteilen, wurde das Einsaatvirus nach zweistündiger Adsorption durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte lichtmikroskopisch bei allen eingesetzten Viren ein deutlicher, zytopathogener Effekt (cpE) bei beiden MOIs beobachtet werden (vgl. Tab. 28 und 29).

Bei dem Influenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 wurde bei der Animpfdosis MOI 1 mit 20-30 % der deutlichste cpE in Form von Zellabkuglung (ca. 30 % der Zellen) und Zytolyse (ca. 20 % der Zellen) festgestellt, während bei den H1N1 Schweineinfluenza Isolaten Sw 140 und FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 jeweils nur ca. 10 % cpE als Zellabkuglung auszumachen waren. Die Infektion der Fibrozyten mit dem Influenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 verursachte ca. 10 % Zytolyse und ca. 20 % Abkuglung der Zellen und damit ebenfalls einen stärkeren zytopathogenen Effekt (vgl. Tab. 28).

Im Unterschied dazu ergab sich bei einer ca. zehnfach geringeren Animpfmenge der Viren (MOI 0,1) bei allen Influenza Subtypen, außer dem Feldisolat H1N1 140, eine Reduktion des aufgetretenen cpE um ca. die Hälfte. Bei dem Influenza A Virusisolat H1N1 Sw 140 konnten lichtmikroskopisch keine zytopathogenen Veränderungen mehr im Vergleich mit der Zellkontrolle festgestellt werden (vgl. Tab. 29).

Tab. 28: Zellzerstörung (cpE) durch Influenza A Virusisolate in primären porcinen Fibrozyten, MOI 1

Die unterschiedliche Empfänglichkeit primärer porciner Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) infiziert mit verschiedenen Influenza A Virussubtypen mit MOI 1 (Tab. 28) und MOI 0,1 (Tab. 29) wurde anhand des lichtmikroskopisch beobachteten zytopathogenen Effekts (in % von 100 % intaktem Zellrasen (Monolayer)) beurteilt.

Influenza A Virussubtyp	zytopathogener Effekt (cpE), 48 h p. i. (MOI 1)
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	ca. 10-20 %
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	ca. 20-30 %
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	ca. 10 %
A H1N1 Sw 140	ca. 10 %

(p. i.= post inoculationem)

Tab. 29: Zellzerstörung durch Influenza A Virusisolate in primären porcinen Fibrozyten, MOI 0,1

Influenza A Virussubtyp	zytopathogener Effekt (cpE), 48 h p. i. (MOI 0,1)
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	ca. 10 %
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	ca. 10 %
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	ca. 5 %
A H1N1 Sw 140	lichtmikroskopisch nicht erkennbar

Die Infektion der primären porcinen Fibrozyten mit den Influenza A Viren wurde mittels immunhistologischer Färbung mit Influenza A Virus-spezifischen Antikörpern bestätigt (Kaninchenserum anti-H1N1avi) (vgl. Abb. 11 a + Abb. 11 b).

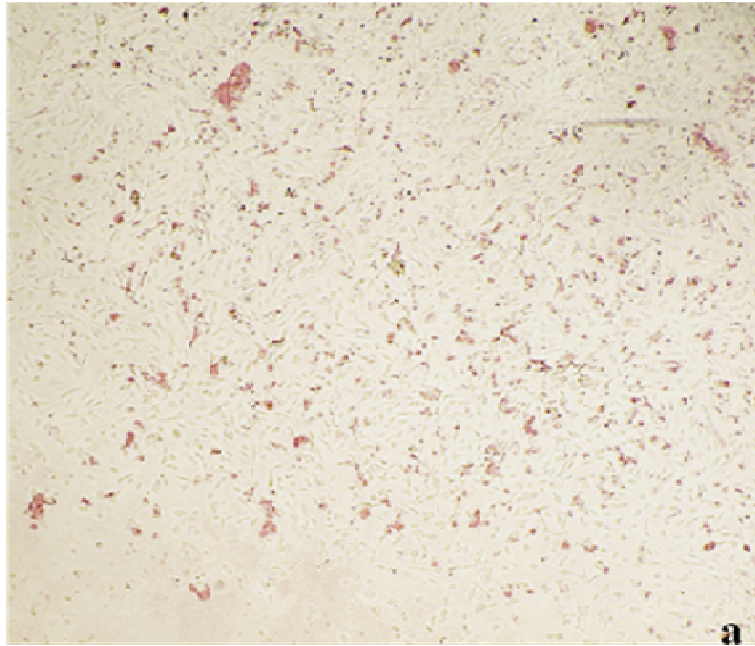
Intrazelluläres Virusantigen konnte mit der immunhistologischen Färbung nach Infektion mit den aviären Influenza A Virussubtypen A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und dem Schweinefeldisolat H1N1 140 nachgewiesen werden. Nach der Infektion mit dem Influenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 konnten viele Zellen identifiziert

werden, die intrazelluläres Virusantigen enthalten (ca. 10 % gefärbte Zellen), wohingegen nach Inokulation mit dem Schweineinfluenza Impfvirus FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 nur der Hintergrundfärbung ähnliche, unspezifisch gefärbte Zellen, d.h. keine intrazellulären Virusantigene, lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnten.

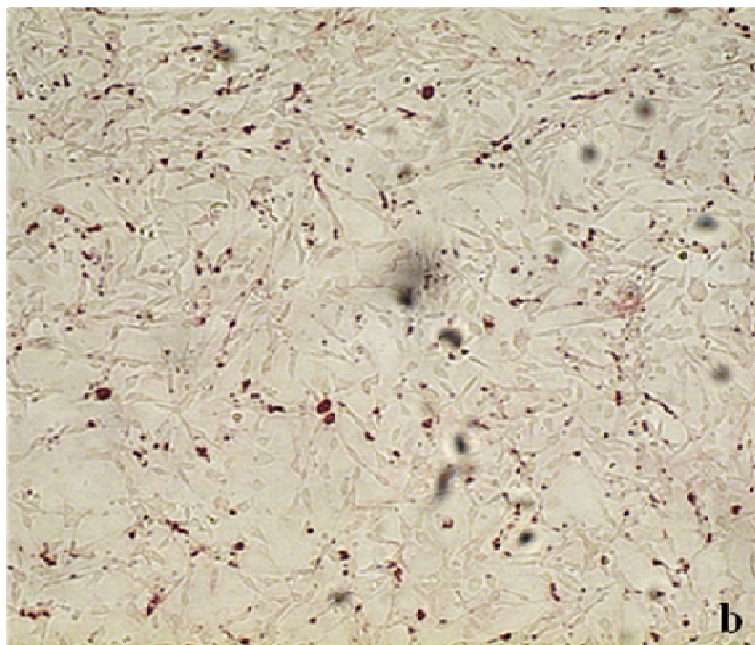
In Tabelle 30 wird die mittels Immunhistologie festgestellte Anzahl an primären porcinen Fibrozyten, die intrazelluläres Virusantigen enthalten, im Überblick dargestellt.

Tab. 30: Immunhistologische Färbung primärer porciner Fibrozyten (ca. 10^5 Zellen)

Influenza A Subtyp	Anzahl gefärbter Zellen/ Vertiefung
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	ca. 5 % der Zellen (MOI 1) ca. 50 Zellen (MOI 0,1)
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	ca. 10 % der Zellen (MOI 1) ca. 5 % der Zellen (MOI 0,1)
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	unspezifische Färbung (MOI 1 und MOI 0,1)
A H1N1 Sw 140	ca. 50 Zellen (MOI 1) ca. 5-10 Zellen (MOI 0,1)



H1N1 avi 185/8



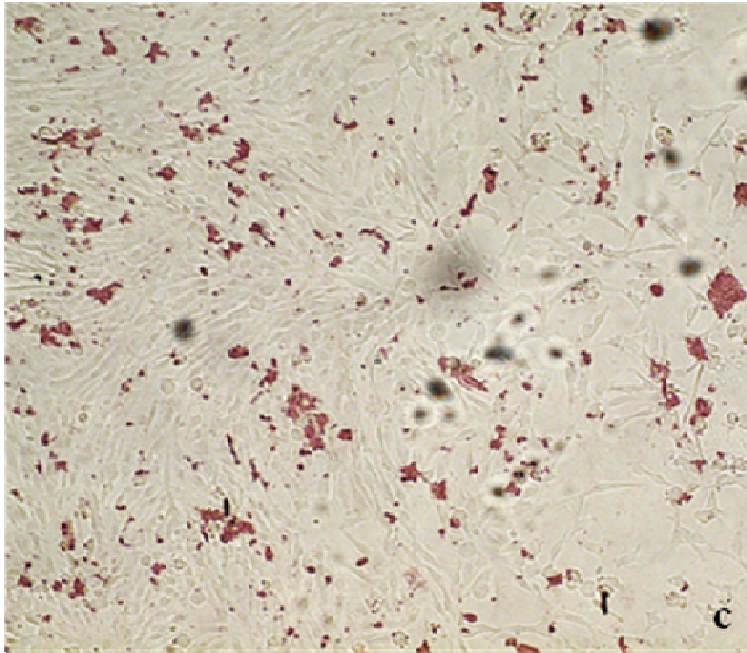
H5N2 avi

Abb. 11a: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten

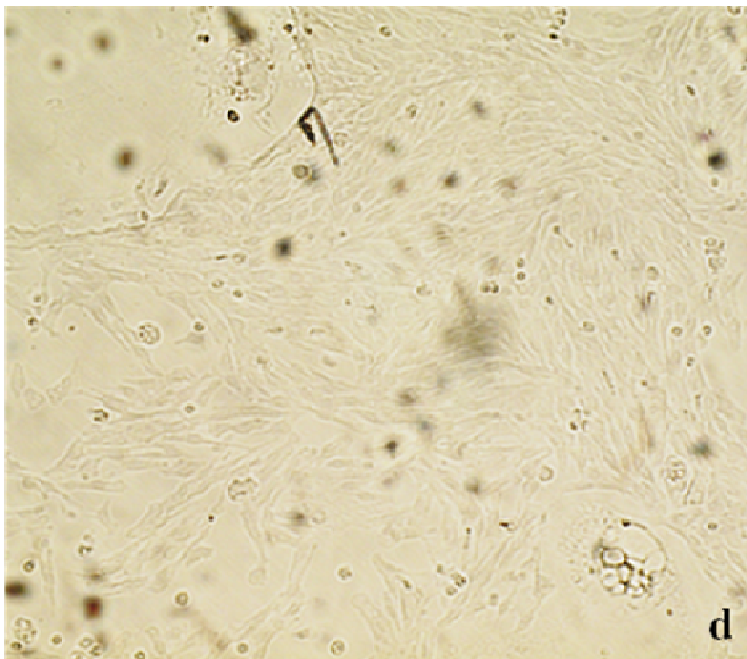
Nachweis von Influenza A Virusantigen in der immunhistologischen Färbung primärer porciner Fibrozyten mit Influenza A Virus-spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kaninchenserum anti-H1N1avi)

(a) Infektion mit dem Influenza Isolat A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 (MOI 1)

(b) Infektion mit dem Influenza Isolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 (MOI 1)



H1N1 Sw 140



Zellkontrolle

Abb. 11b: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten

Nachweis von Influenza A Virusantigen in der immunhistologischen Färbung primärer porciner Fibrozyten mit Influenza A Virus-spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kaninchenserum anti-H1N1avi)

(c) Infektion mit dem Influenza Isolat H1N1 Sw 140 (MOI 1)

(d) Fibrozyten Zellkontrolle

Der Unterschied bei einer geringeren Animpfmenge der Virusisolate (MOI 0,1) zeigte sich auch in einer geringeren Menge an identifizierbarem, intrazellulären Virusantigen (vgl. Abb. 12 und Tab. 30).

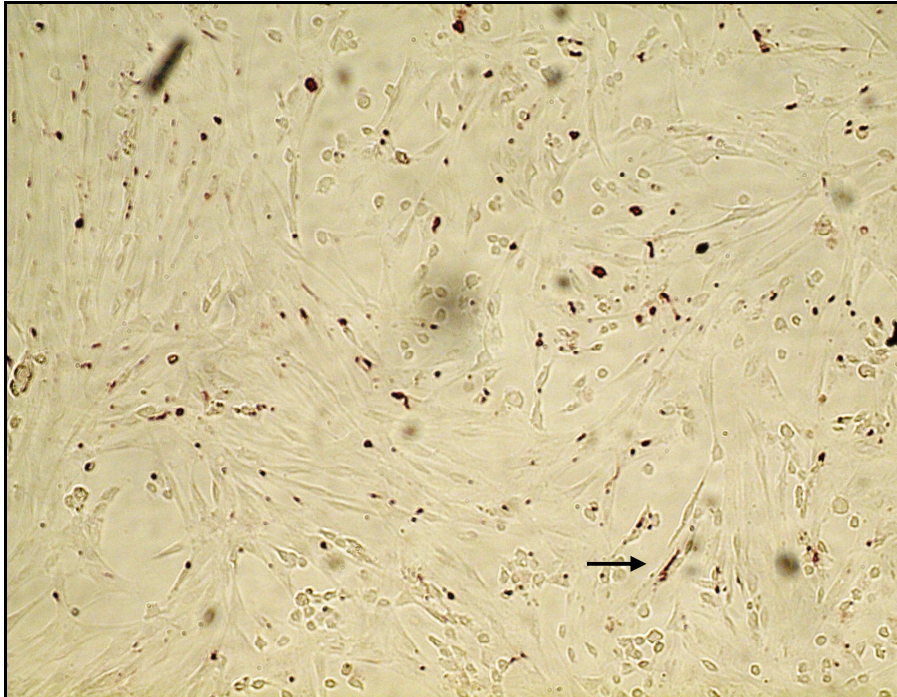


Abb. 12: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten

Nachweis von Influenza A Virusantigen in der immunhistologischen Färbung primärer porciner Fibrozyten mit Influenza A Virus-spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kaninchenserum anti-H1N1avi) nach Infektion mit dem Influenza Virus A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 (MOI 0,1); (→ gefärbte Zelle)

Bei der Infektion von primären porcinen Fibrozyten mit dem Schweineinfluenza A Virus Isolat FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 konnte lichtmikroskopisch zwar cpE, jedoch immunhistologisch kein intrazelluläres Virusantigen nachgewiesen werden. Aufgrund der unklaren Befunde wurde das Virusisolat auf primären porcinen Fibrozyten (acht Tage in Kultur) mit einer MOI 1 adsorbiert und nach 2, 6, 24 und 48 Stunden Zellkulturüberstand abgenommen. In der anschließenden Titration der gewonnenen Zellkulturüberstände in MDCK Zellen konnte keine produktive Vermehrung des Virus nachgewiesen werden. Nach Verimpfung der über 48 Stunden abgenommenen Zellkulturüberstände konnte in keinem Fall lichtmikroskopisch ein cpE in MDCK Zellen beobachtet werden.

3.1.3 Zellspektrum des Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1

Zur weiteren Charakterisierung des aviären Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 (HA-Titer: >1:256 in 25 µl) wurden es auf seine Vermehrungsfähigkeit in der humanen Zelllinie CaCo-2 mittels log 10 Virustitration getestet. Bei der immunhistologischen Bestätigung mit Influenza A Virus-spezifischen polyklonalen Antikörpern (Kaninchenserum anti-H5N2avi) konnte ein Titer von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml berechnet werden. Nach der 1. Passage dieses Influenza Subtyps in CaCo-2 Zellen wurde mit Hilfe der panInfluenza RT-qPCR im Zellkulturüberstand und Zelllysat Virusgenom anhand eines C_t-Wertes von 17,03 nachgewiesen. In der RT-qPCR konnte nach einer zweiten Passage in den CaCo-2 Zellen ein Virusgenomnachweis mit dem C_t-Wert von 24,71 erbracht werden. Eine produktive Vermehrung des H1N1 Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 in CaCo-2 Zellen konnte somit nachgewiesen werden.

Um das Replikationsverhalten des aviären H1N1 Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 auch in wirtsspezifischen Zellen zu testen, wurde eine log 10 Titration dieses Influenza A Virus (HA-Titer: >1:256 in 25 µl) in Hühnerembryofibroblasten (HEF) durchgeführt. Dabei konnte ein Endpunkttiter von 10^4 KID₅₀/ml mit Hilfe immunhistologischer Färbung durch Influenza A Virus-spezifische, polyklonale Antikörper (Kaninchenserum anti-H5N2avi) ermittelt werden. Lichtmikroskopisch konnte ein deutlicher cpE bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-3} beobachtet werden. Vergleicht man die Virustiter des Influenza Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in wirtsspezifischen (HEF) mit denen in heterologen Zellen (MDCK und CaCo-2), so wird deutlich, dass sich dieses Isolat besser in den heterologen Zellen vermehrt hat. In Tabelle 31 werden die Virustiter des Influenza A Virusisolats A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in den verschiedenen Zellen gegenübergestellt.

Tab. 31: Virustiter des aviären Influenza A Virus A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in den verschiedenen Zellen

Zellen	Virustiter (KID ₅₀ /ml)
MDCK	10 ^{6,5} /ml
CaCo-2	10 ^{6,5} /ml
HEF	10 ⁴ /ml

3.2 Vermehrungsfähigkeit im Hühnerei

Die Infektion embryonierter Hühnereier mit Influenza A Viren erfolgte zur weiteren Bestimmung der Virulenz und zur Vermehrung der Viren. Die Überprüfung der infizierten Hühnereier erfolgte durch tägliche Kontrolle der Vitalität der Embryonen mit Hilfe einer Schierlampe.

Die Infektion von zehntägigen embryonierten Hühnereiern mit dem Influenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 führte bei der Hälfte der infizierten Eier nach vier Tagen zum Absterben der Hühnerembryonen. Die produktive Vermehrung wurde durch einen Hämagglutinationstiter (HA-Titer) von >1:32 bestätigt. Nach grober Reinigung über ein 40 %iges Zuckerkissen und Konzentrierung von 680 ml Allantoisflüssigkeit mittels Ultrazentrifugation konnte ein HA-Titer von >1:256 festgestellt werden.

Das Influenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 führte bei zwei Drittel der infizierten Eier nach vier Tagen zum Absterben der Embryonen. Ein HA-Titer von 1:64 bestätigte eine produktive Vermehrung. Nach Konzentrierung von 510 ml Allantoisflüssigkeit mittels Ultrazentrifugation und grober Reinigung über ein 40 %iges Zuckerkissen konnte bei diesem Virusisolat ein HA-Titer von >320 ermittelt werden.

Das Schweineinfluenzafeldisolat H1N1 Sw 140 führte bei der Infektion von embryonierten Hühnereiern zu keinem Absterben der Embryonen. Nach Abtöten der Embryonen fünf Tage post infectionem konnte ein HA-Titer von 1:8

festgestellt werden. Nach Ultrazentrifugation von 220 ml Allantoisflüssigkeit kombiniert mit grober Reinigung über ein 40 %iges Zuckerkissen konnte ein HA-Titer von $>1:128$ detektiert werden. Eine produktive Vermehrung konnte auch durch Nachweis der Influenza A Virusgenompräsenz mit der panInfluenza RT-qPCR bestätigt werden (C_t -Wert: 15,15).

Die Pathogenität der aviären Influenza A Virusisolate gegenüber dem Schweinefeldisolat H1N1 140 zeigt sich darin, dass die aviären Isolate zum Absterben der Embryonen führen. Unterstrichen wird dies auch durch die höheren HA-Titer.

3.3 Genomnachweis in Zellkulturüberständen und Zelllysaten

In Abschnitt IV 3.1.2 wurde die Infektion von primären porcinen Fibrozyten mit den charakterisierten Influenza A Virussubtypen beschrieben. Zur Ermittlung einer genaueren Definition produktiver bzw. abortiver Vermehrung der Influenza A Virussubtypen A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 und A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 in porcinen PBMC und Fibrozyten wurde die Präsenz von Virusgenom quantitativ mit der RT-qPCR nachgewiesen.

Der Virusgenomnachweis in Zellkulturüberständen und Zelllysaten der mit den Influenza Virussubtypen infizierten Fibrozyten und PBMC wurde über einen Zeitverlauf von 72 Stunden in der RT-qPCR erbracht. Die Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden, wie in Abschnitt III 2.2.2 beschrieben, separat gewonnen und untersucht.

In den über einen Zeitraum von 72 Stunden gewonnenen Zellkulturüberständen von PBMC und Fibrozyten ergab sich, Virussubtyp unabhängig, ein Genomnachweis in der RT-qPCR von durchschnittlich $C_t=28,30$. Im Zelllysat wurde ein Virussubtyp-unabhängiger Genomnachweis in der RT-qPCR von durchschnittlich $C_t=27,3$ bei PBMC und $C_t=26,5$ bei Fibrozyten erbracht. Es konnte weder ein bedeutender Anstieg der Virusgenomkopien in den Zellkulturüberständen noch in den Zelllysaten über einen Zeitraum von 72

Stunden festgestellt werden (vgl. Abb. 13 und Abb. 14). Die Replikation und damit eine Freisetzung und signifikante Zunahme neuer Viruspartikel, als Kriterium einer produktiven Vermehrung dieser Virussubtypen in porcinen PBMC und Fibrozyten, war nicht evident.

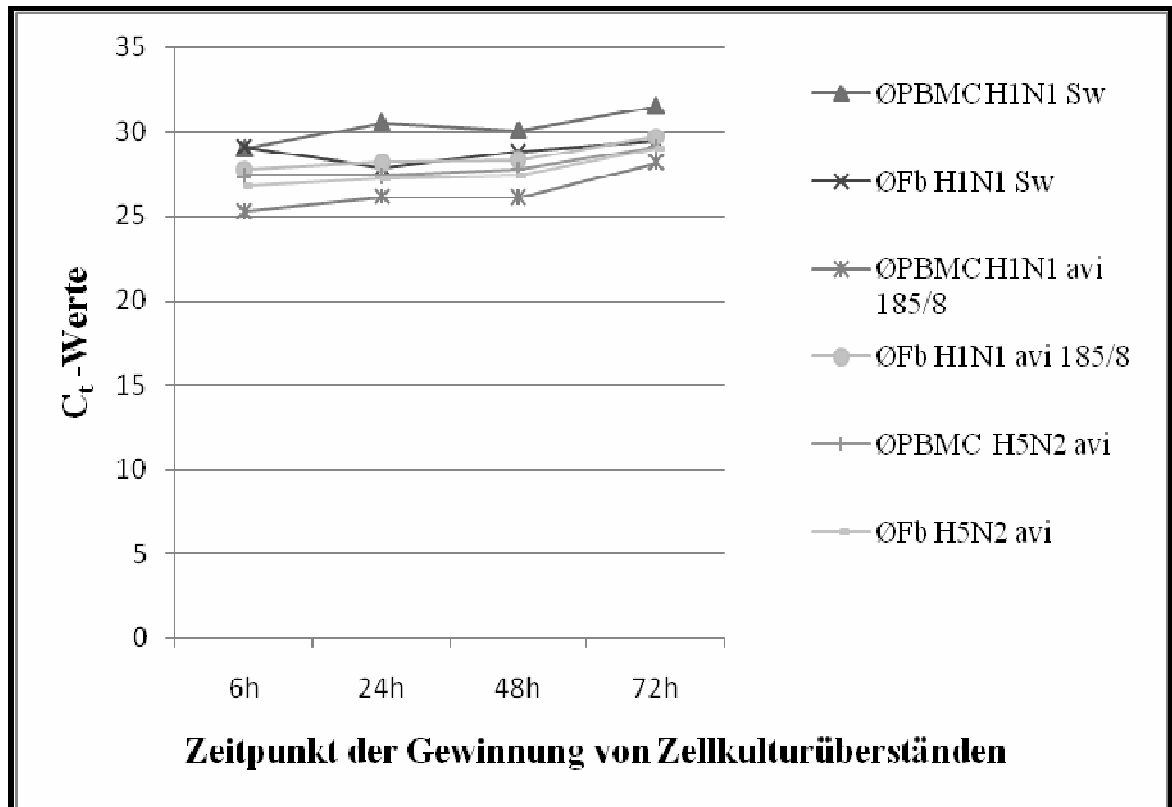


Abb. 13: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zellkulturüberständen von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden

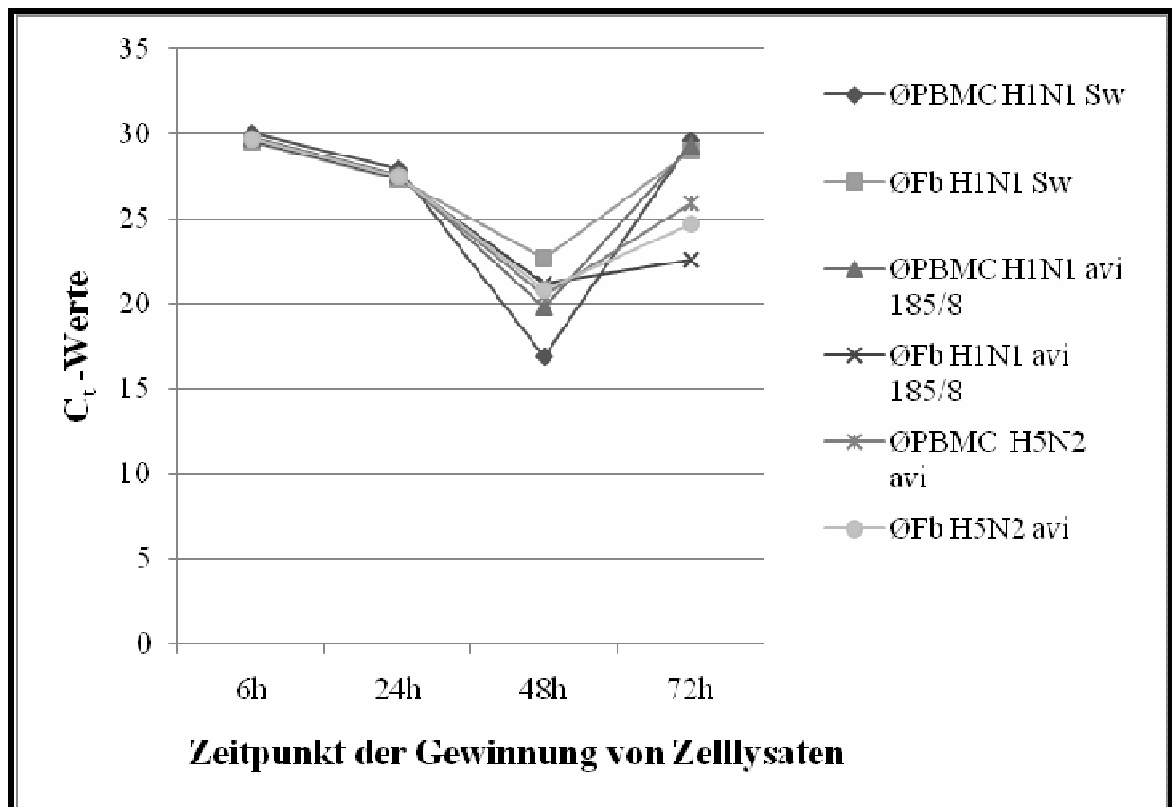


Abb. 14: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zelllysaten von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden

Abbildung 14 zeigt zwar bei den über 72 Stunden gewonnenen Zelllysaten nach 48 Stunden Inkubationszeit sowohl bei den porcinen PBMC als auch bei den Fibrozyten bei allen Influenza A Virussubtypen eine geringgradige Zunahme der Virusgenome, welche sich in einem niedrigeren C_t -Wert äußert, diese unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den Ausgangswerten (6h) und den nach 72h wieder zurückgegangenen Werten (vgl. Abb. 14).

Wurden die Zellen mit einer zehnfach geringeren Animpfdosis (MOI 0,1) mit denselben Virussubtypen infiziert, konnten leicht verminderte Virusgenomgehalte in der panInfluenza RT-qPCR ermittelt werden. Folgende durchschnittliche C_t -Werte wurden ermittelt: 31,8 (PBMC) und 28,9 (Fibrozyten) für die Zellkulturüberstände (vgl. Abb. 15) sowie 28,5 (PBMC) und 28,6 (Fibrozyten) für die Zelllysate. Auch bei einer geringeren Animpfdosis konnte

keine Zunahme der Genomkopien als Indikator für eine produktive Vermehrung bis zum Zeitpunkt von 72 Stunden post infectionem nachgewiesen werden.

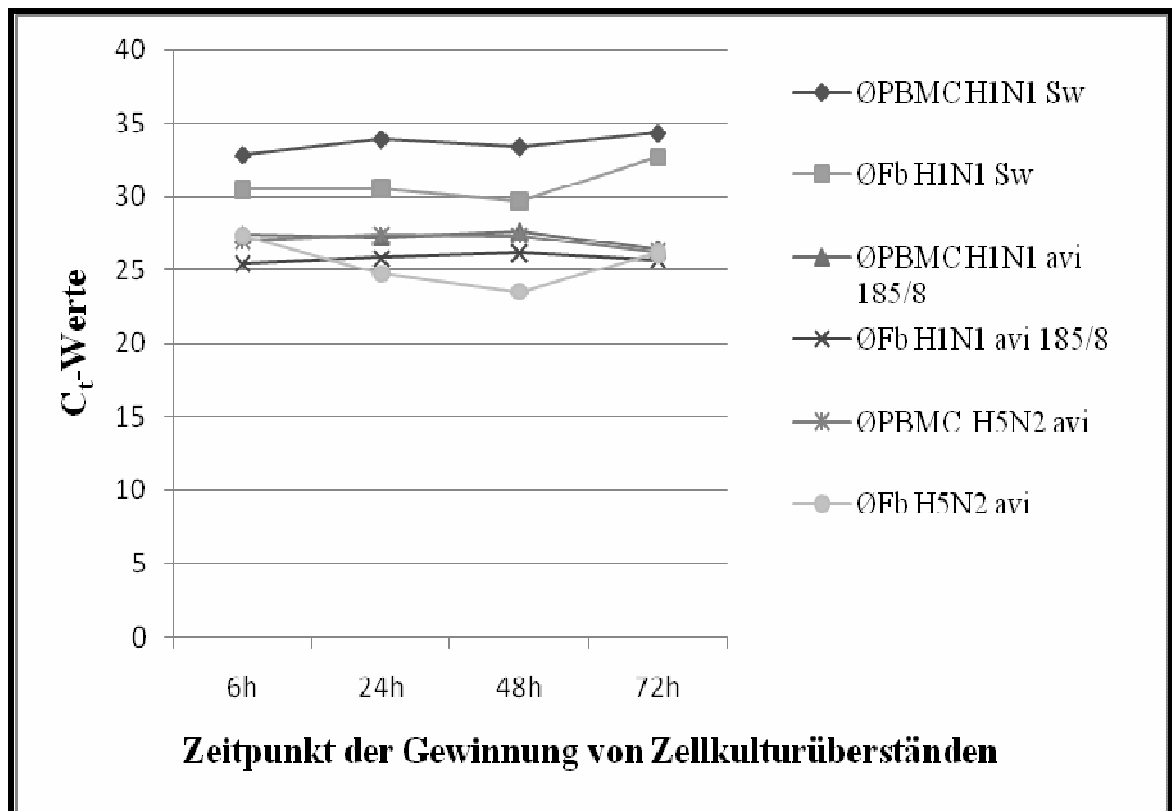


Abb. 15: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zellkulturüberständen von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 0,1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden

Zur Bestätigung der in der panInfluenza RT-qPCR gewonnenen Ergebnisse wurden embryonierte Hühnereier mit den 72 Stunden post inoculationem abgenommenen Zelllysaten infiziert. Nur mit den Influenza A Viren A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 (HA-Titer: >1:16) und A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 (HA-Titer:1:32) konnte mittels Hämagglutinationstest eine Viruspräsenz in der Allantoisflüssigkeit nach vier Tagen nachgewiesen werden. Keines der Virusisolate führte zum Absterben der Hühnerembryonen.

4. Interferon- α Nachweis und antivirale Wirksamkeit

4.1 Interferon- α Sekretion

Die Sekretion des antiviralen Zytokins Interferon alpha (IFN- α) durch porcine PBMC und Fibrozyten wurde parallel nach Stimulation mit den in Tabelle 32 aufgeführten Virussubtypen *in vitro* untersucht. Die Stimuli zur Induktion der IFN- α Sekretion wurden mit 100 hämagglutinierenden Einheiten (HAE) eingesetzt und im Falle von ORFV mit einem Virustiter von 10^6 KID₅₀/ml (MOI ~1) die Anzahl der IFN- α sezernierenden Zellen im ELISPOT bestimmt.

Die durchschnittlichen IFN- α spezifischen Spotzahlen ergaben sich aus den Mittelwerten aller, mit denselben Stimuli erzeugten Spots abzüglich der Mittelwerte der korrespondierenden Negativkontrollen.

Tab. 32: Im IFN- α ELISPOT eingesetzte Stimuli

Virusisolat/Stimulus	Abkürzung	Gebrauchskonzentration
Parapoxvirus (D1701); KoV	ORFV	MOI ~ 1
New Castle Disease Virus, La Sota; KoV	NDV	100 HAE.
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	H1N1 185/8 avi	100 HAE
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	H5N2 avi	100 HAE
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	H1N1 Sw Impf	100 HAE
H1N1 Sw Feldisolat 140	H1N1 Sw 140	100 HAE

(KoV= Kontrollvirus)

Es wurden PBMC und die daraus kultivierten Fibrozyten aus zwölf EDTA-Blutproben von Schlachtschweinen im ELISPOT auf IFN- α spezifische Spotbildung untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden sich die Fibrozyten 9 bis 14 Tage in Kultur. Die Stimulationszeit der Zellen mit den eingesetzten Virussubtypen betrug 21 bis 22 Stunden. Die Auswertung der IFN- α Sekretion erfolgte über die Ermittlung der mittleren Spotzahl mit Hilfe des ELISPOT-Readers Viruspot 04 der Firma AID (Strassberg).

Um Antikörper vermittelte Virusneutralisation auszuschließen wurden die Seren aller Blutspender im ELISA auf Präsenz von Antikörpern gegen Influenza A Virus getestet. Die Untersuchung der Blutspender auf spezifische Schweineinfluenza Antikörper im ELISA lieferte negative Ergebnisse.

4.1.1 Interferon- α Sekretion von porcinen PBMC

Bei Stimulation der porcinen PBMC konnte unabhängig vom eingesetzten Virusstimulus, eine durchschnittliche IFN- α spezifische Spotzahl von 64 Spots gezählt werden (vgl. Abb. 19). Fünf der sechs eingesetzten Stimuli (vgl. Tab. 32) induzierten eine deutliche Sekretion von IFN- α durch die PBMC. Das Schweineinfluenza Feldisolat H1N1 140 hingegen führte bei der Stimulation der porcinen PBMC zu einer sehr geringen Spotzahl (\emptyset Spotzahl=17).

Die Stimulation mit dem aviären Influenza A Virussubtyp H5N2 führte bei den PBMC - im Vergleich mit den anderen Stimuli - fast zur doppelten Menge an sezerniertem IFN- α (\emptyset Spotzahl=97).

Bei den als Positivkontrollen eingesetzten Stimuli ORFV und NDV konnten durchschnittlich 54 (ORFV) bzw. 53 (NDV) IFN- α spezifische Spots gezählt werden (vgl. Abb. 16). Mit Spotzahlen von durchschnittlich 67 (H1N1 Sw Impf) und 58 (H1N1 avi 185/8) erzielte die Stimulation mit diesen Influenza A Virussubtypen ähnliche Werte, wie die Positivkontrollen.

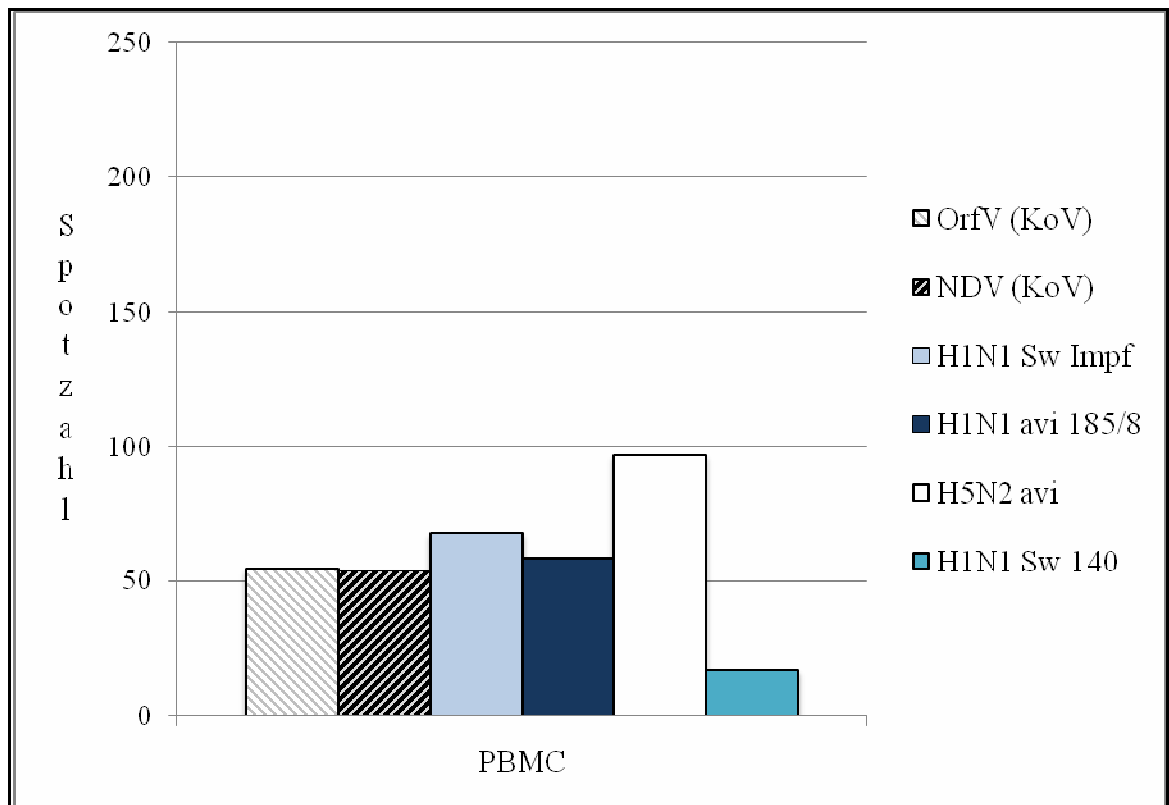


Abb. 16: Durchschnittliche Anzahl an IFN- α spezifischen Spots (y-Achse) nach der Stimulation von porcinen PBMC mit den angegebenen Viren (x-Achse)

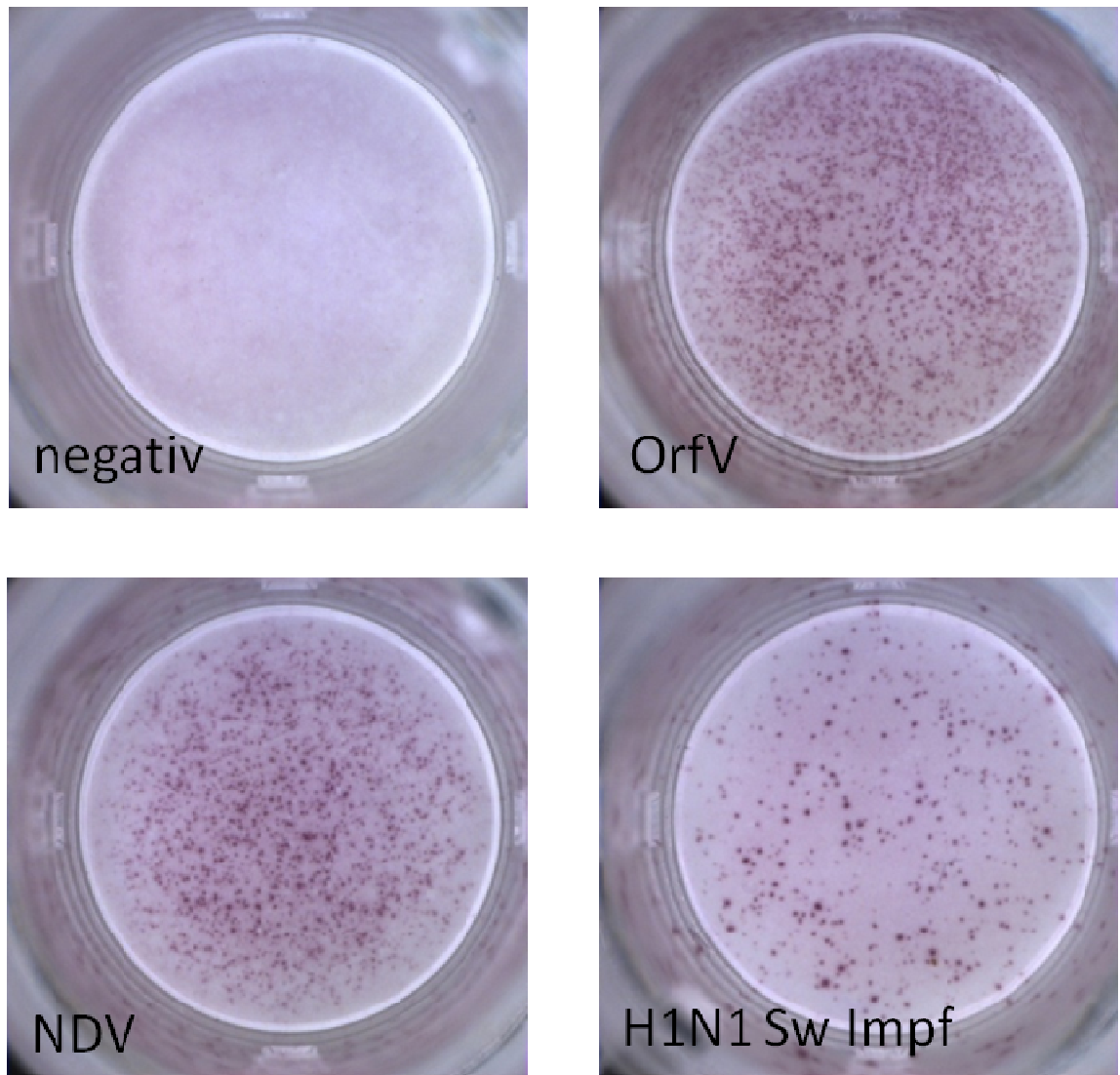


Abb. 17a: IFN- α spezifische Spots nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Virussubtypen

IFN- α spezifische Spots ausgewertet mit dem ELISPOT-Reader.

Negativkontrolle: DMEM

Positivkontrolle: ORFV= Parapoxvirus D1701

Postivkontrolle: NDV= New Castle Disease Virus, La Sota

H1N1 Sw Impf= FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1

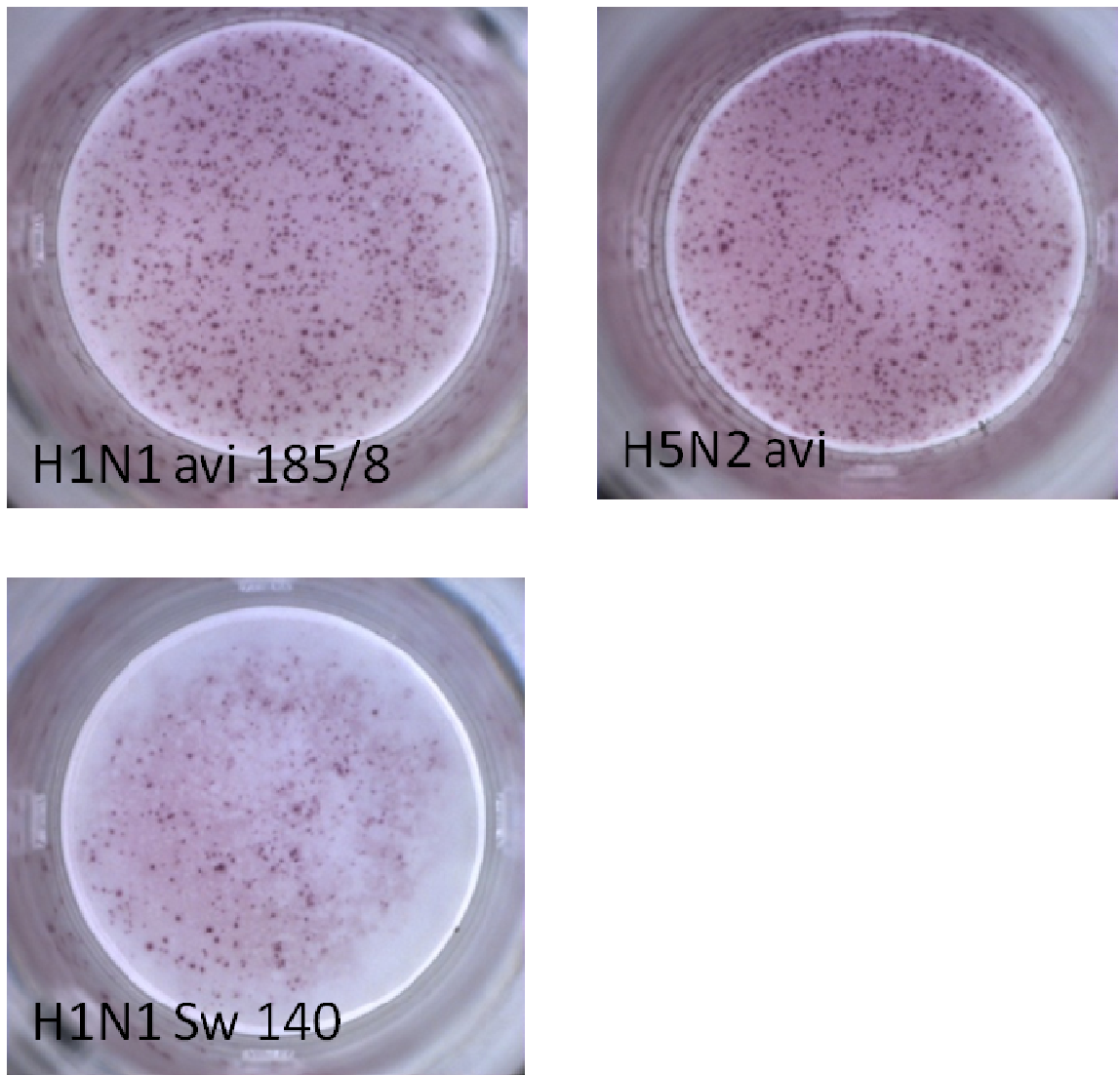


Abb. 17b: IFN- α spezifische Spots nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Virussubtypen

IFN- α spezifische Spots ausgewertet mit dem ELISPOT-Reader.

H1N1 avi 185/8= A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1

H5N2 avi= A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2

H1N1 Sw 140= Schweineinfluenza Feldisolat H1N1 140

4.1.2 Interferon- α Sekretion von porcinen Fibrozyten

Die primären porcinen Fibrozyten reagierten nach der Stimulation durch die eingesetzten Virussubtypen (vgl. Tab. 32) mit der Bildung von durchschnittlich 142 IFN- α spezifischen Spots, unabhängig vom eingesetzten Stimulus (vgl. Abb. 19). Bei der getrennten Betrachtung der einzelnen Influenza A Virusstimuli (vgl. Abb. 17 a, 17 b und 18) wird deutlich, dass der aviäre Influenzasubtyp H5N2 mit

einer Spotanzahl >200 (\emptyset Spotzahl=206) mit Abstand die meisten IFN- α spezifischen Spots hervorruft. Am schwächsten werden die porcinen Fibrozyten durch das Schweineinfluenza Feldisolat H1N1 140 (\emptyset Spotzahl= 58) zur Sekretion von IFN- α stimuliert. Bei der Stimulation mit dem H1N1 Schweineimpfvirus konnten durchschnittlich nur 107 Spots gezählt werden. Das Vogelisolat H1N1 185/8 induzierte die Fibrozyten zu einer IFN- α Sekretion, die mit der Bildung von durchschnittlich 148 Spots im ELISPOT im mittleren Bereich lag.

Die als Kontrollviren mitgeführten Viren ORFV und NDV führten zu einer durchschnittlichen Bildung von 122 (ORFV) bzw. 159 (NDV) IFN- α spezifischen Spots.

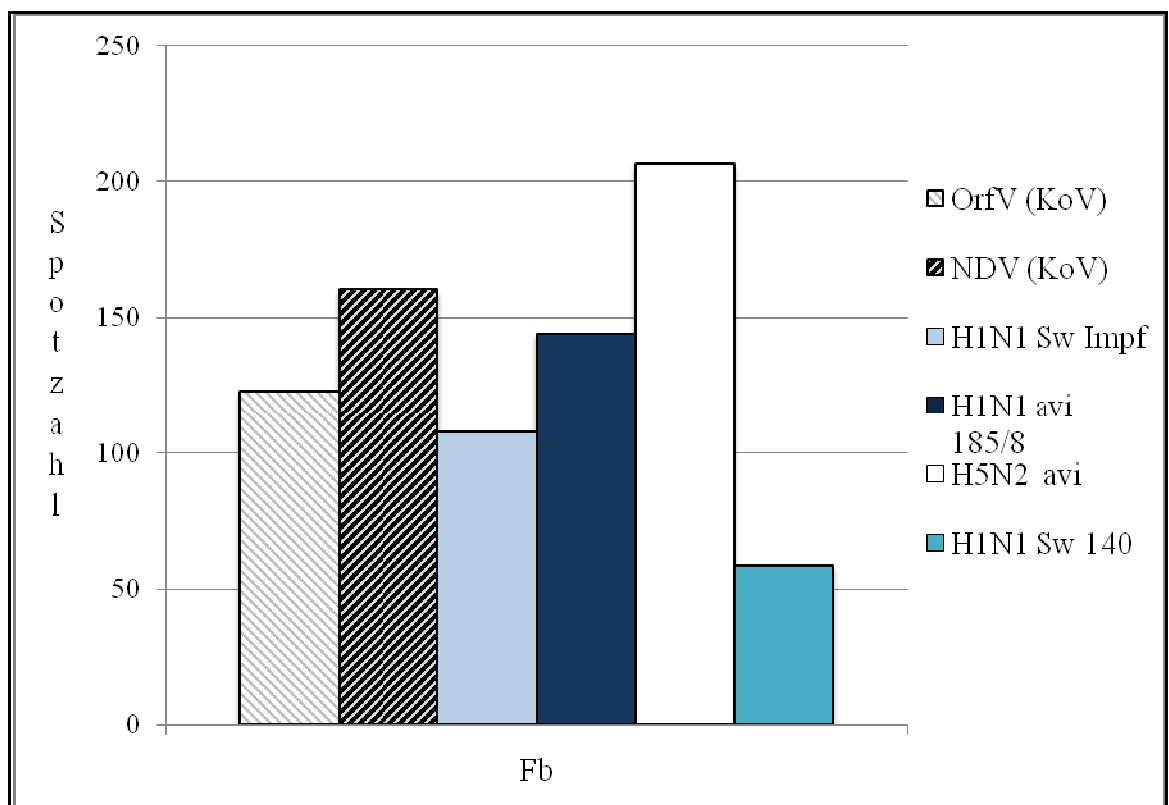


Abb. 18: Durchschnittliche Anzahl an IFN- α spezifischen Spots (y-Achse) nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Viren (x-Achse)

4.1.3 Vergleich der Interferon- α Sekretion von porcinen PBMC und Fibrozyten

Vergleicht man die IFN- α Sekretion der vom gleichen Spenderindividuum stammenden porcinen PBMC und primären Fibrozyten anhand der im ELISPOT ermittelten Spotanzahl und unabhängig von den eingesetzten Stimuli, reagieren Fibrozyten mit der Bildung einer deutlich höheren Spotanzahl (PBMC: \bar{x} Spotanzahl=63; Fb: \bar{x} Spotanzahl=142) (vgl. Abb. 19).

Mit dem Wilcoxon-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtspotzahl von Fibrozyten und PBMC ($p < 0,0001$; Wilcoxon-Test) berechnet werden (vgl. Abb. 19).

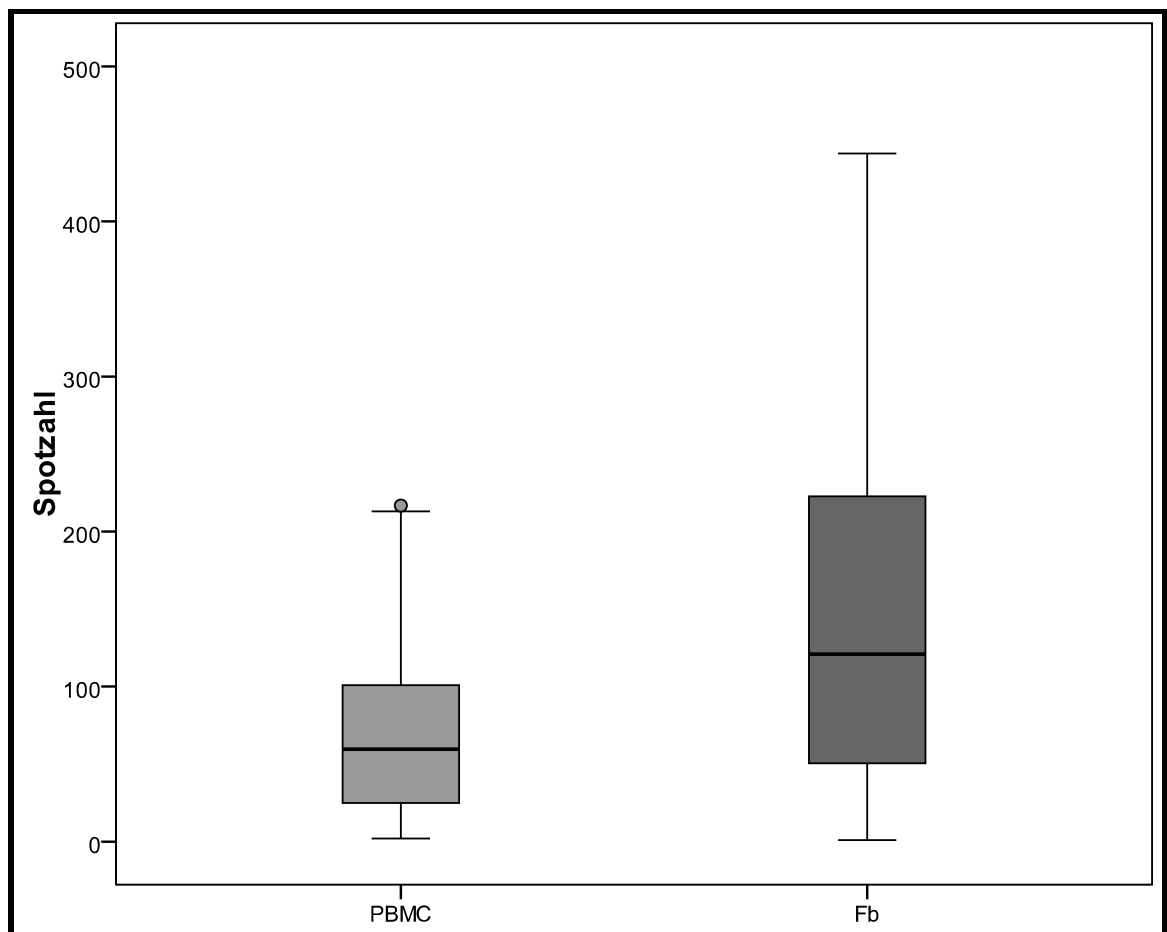


Abb. 19: Anzahl IFN- α spezifischer Spots (y-Achse) von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb, 10-21 Tage in Kultur) unabhängig vom eingesetzten Virusstimulus

Abbildung 20 zeigt die Unterschiede der IFN- α Produktion der zwei Zellpopulationen nach der Stimulation mit den verschiedenen Viren. Danach ist die Bildung von IFN- α spezifischen Spots bei allen Stimuli durch die primären Fibrozyten höher als bei den parallel untersuchten PBMC.

Ein signifikanter Unterschied konnte bei den aviären Influenza A Subtypen H5N2 ($p=0,047$) und H1N1 185/8 ($p=0,028$) (Wilcoxon-Test ohne Bonferroni-Adjustierung) berechnet werden.

Der deutliche Unterschied der IFN- α Induktion stimuliert durch das Newcastle Disease Virus durch Fibrozyten (\bar{x} 159 Spots) und PBMC (\bar{x} 53 Spots), ergab jedoch aufgrund des geringeren Stichprobenumfangs ($n=9$) keine statistisch nachweisbaren Unterschiede.

Das Schweinefeldisolat H1N1 Sw 140 stimulierte sowohl die PBMC als auch die Fibrozyten nur geringgradig zur Sekretion von IFN- α , was sich in einer niedrigen Spotanzahl von \bar{x} 17 Spots (PBMC) und \bar{x} 58 Spots (Fb) darstellt.

Bei den Schweineinfluenzaisolaten FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 und dem Feldisolat H1N1 140 sowie bei den als Positivkontrollen eingesetzten Repräsentanten anderer Virusfamilien ORFV und NDV konnte kein signifikanter Unterschied in der IFN- α Sekretion zwischen primären Fibrozyten und PBMC festgestellt werden.

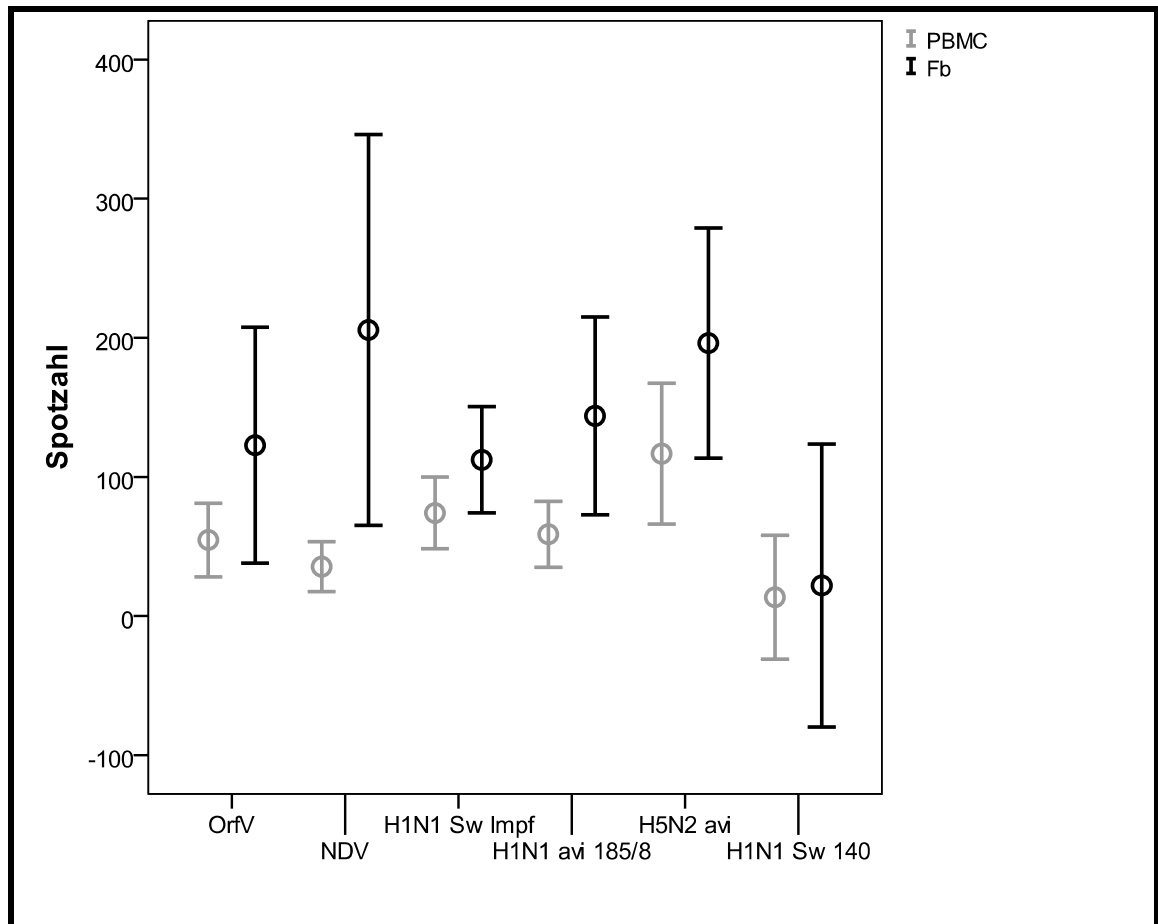


Abb. 20: Anzahl IFN- α spezifische Spots von porcinen PBMC und daraus kultivierten primären porcinen Fibrozyten (Fb, 10-21 Tage in Kultur) induziert durch die unterschiedlichen Stimuli.

Mittelwerte (Kreise) und 95 %-Konfidenzintervalle (= Intervall in dem 95% der ermittelten Werte liegen) der Anzahl der IFN- α spezifischen Spots von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten induziert durch die angegebenen Virussubtypen..

4.2 Ermittlung antiviraler Wirksamkeit gegen Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)

Die Sekretion antiviraler Substanzen von PBMC und primären porcinen Fibrozyten des gleichen Individuums wurde vergleichend untersucht. Dazu wurde in einem VSV-antiviralen-Test die Hemmung der - durch das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) hervorgerufenen - Zerstörung (cpE) von MDBK Zellen durch in Zellkulturüberständen der PBMC und Fibrozyten enthaltenen antiviral wirksamen Substanzen, untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden, wie in

Abschnitt III 2.4.2 beschrieben, nach Infektion mit den in Tabelle 33 aufgelisteten Virussubtypen gewonnen.

Tab. 33: Eingesetzte Induktoren zur Sekretion antiviraler Substanzen durch Fibrozyten und PBMC

Virusisolat/ Stimulus	Abkürzung	Gebrauchs- konzentration
Parapoxvirus (D1701); KoV	ORFV	MOI ~ 1
New Castle Disease Virus, La Sota; KoV	NDV	100 HAE.
A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1	H1N1 185/8 avi	100 HAE
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	H5N2 avi	100 HAE
FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1	H1N1 Sw Impf	100 HAE
H1N1 Sw Feldisolat 140	H1N1 Sw 140	100 HAE

(KoV= Kontrollvirus)

Die Berechnung der antiviralen Aktivität erfolgte anhand eines mitgeführten IFN- α Standards (vgl. Abschnitt III 2.4.2).

Im Vergleich wird durch die Überstände von primären Fibrozyten - unabhängig von den eingesetzten Stimuli - eine quantitativ erheblich stärkere antivirale Wirksamkeit erzielt (bezogen auf die IFN- α Konzentration in pg/ml) als durch PBMC-Überstände (vgl. Abb. 21). Durchschnittlich sezernierten Fibrozyten 12,9 pg/ml an VSV-antiviral wirksamen Substanzen, wogegen die Sekretion bei den PBMC im Durchschnitt nur 3,5 pg/ml betrug.

Statistisch konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,004$; $p < 0,01$ Wilcoxon-Test) zwischen der von Fibrozyten und PBMC (Stimulus unabhängig) sezernierten Menge an VSV-antiviralen Substanzen berechnet werden.

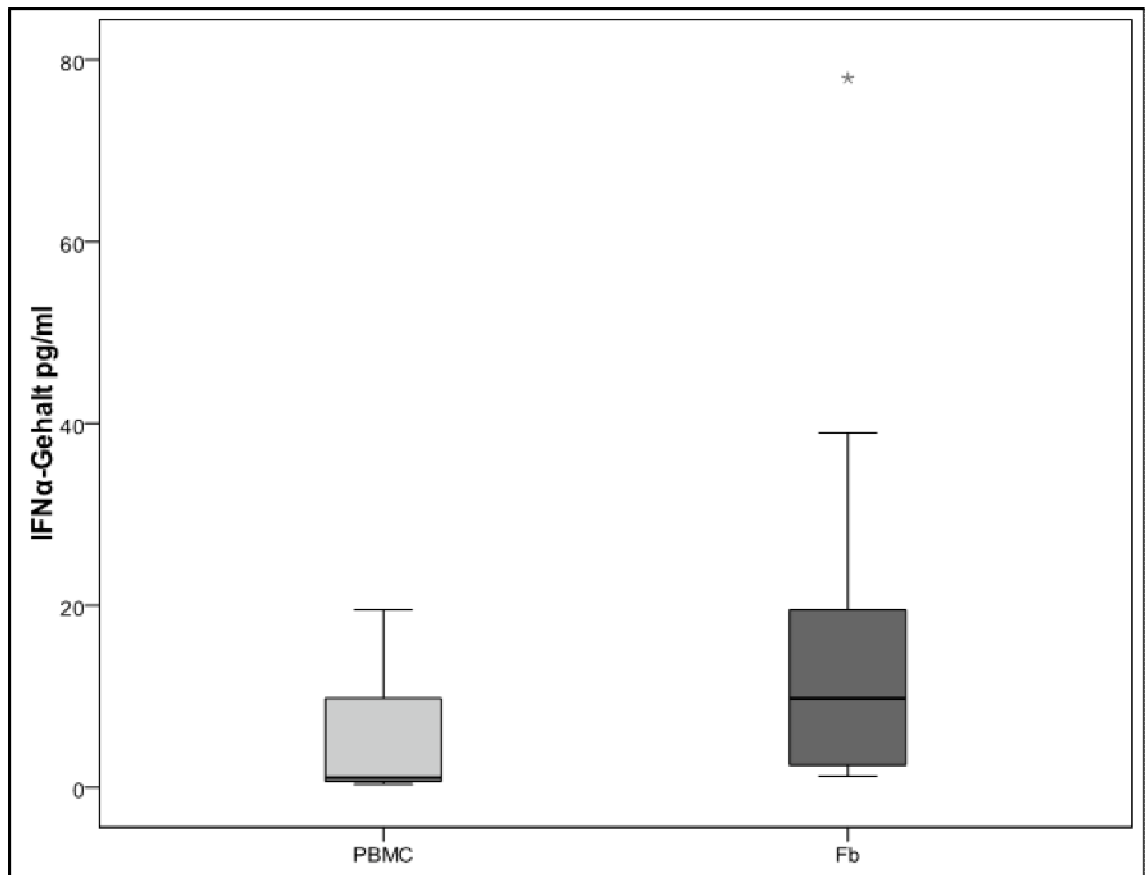


Abb. 21: Vergleich der Sekretion von antiviralen Substanzen durch porcine PBMC und primäre porcine Fibrozyten Stimulus unabhängig, HAE

Der Gehalt der von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Stimulus unabhängig) sezernierten antiviralen Substanzen wurde an Hand des mitgeführten IFN- α Standards (y-Achse) in pg/ml berechnet.

Die einzelnen Virussubtypen stimulieren die Zellen unterschiedlich stark zur Sekretion von antiviralen Substanzen. Die Menge an antiviral wirksamen Substanzen, die nach der Stimulation der Fibrozyten sezerniert wurde, war im Vergleich zu den parallel untersuchten isogenen PBMC bei allen eingesetzten Virusisolaten und den Kontrollviren größer (vgl. Abb. 22).

Die Produktion von VSV-antiviral wirksamen Substanzen durch Fibrozyten, induziert durch die Stimulation mit dem aviären Influenza A Virussubtyp H5N2 war deutlich höher als im Falle von PBMC. Ein signifikanter Unterschied konnte aufgrund der geringen Stichprobenzahl (n=6) nicht berechnet werden.

Der aviäre Influenza A Virus Subtypstimulus H5N2 induzierte bei den Fibrozyten ebenso wie bei den PBMC die stärkste Ausschüttung an antiviral wirksamen Substanzen (Fb: 25,8 pg/ml; PBMC: 7,9 pg/ml).

In den PBMC-Überständen konnten durch die Stimulation mit dem Schweinefeldisolat H1N1 140 keine messbaren Werte an antiviraler Wirksamkeit detektiert werden, während eine starke Ausschüttung VSV-antiviral wirksamer Substanzen in den Fibrozyten-Überständen messbar war (Fb: 21,9 pg/ml). Für die induzierte Potenz VSV-antiviral wirksamer Überstände durch die anderen Virusisolate konnte eine Differenz von 3 bis 4 pg/ml zwischen der sezernierten Menge antiviraler Substanz von Fibrozyten und PBMC berechnet werden (vgl. Abb. 22).

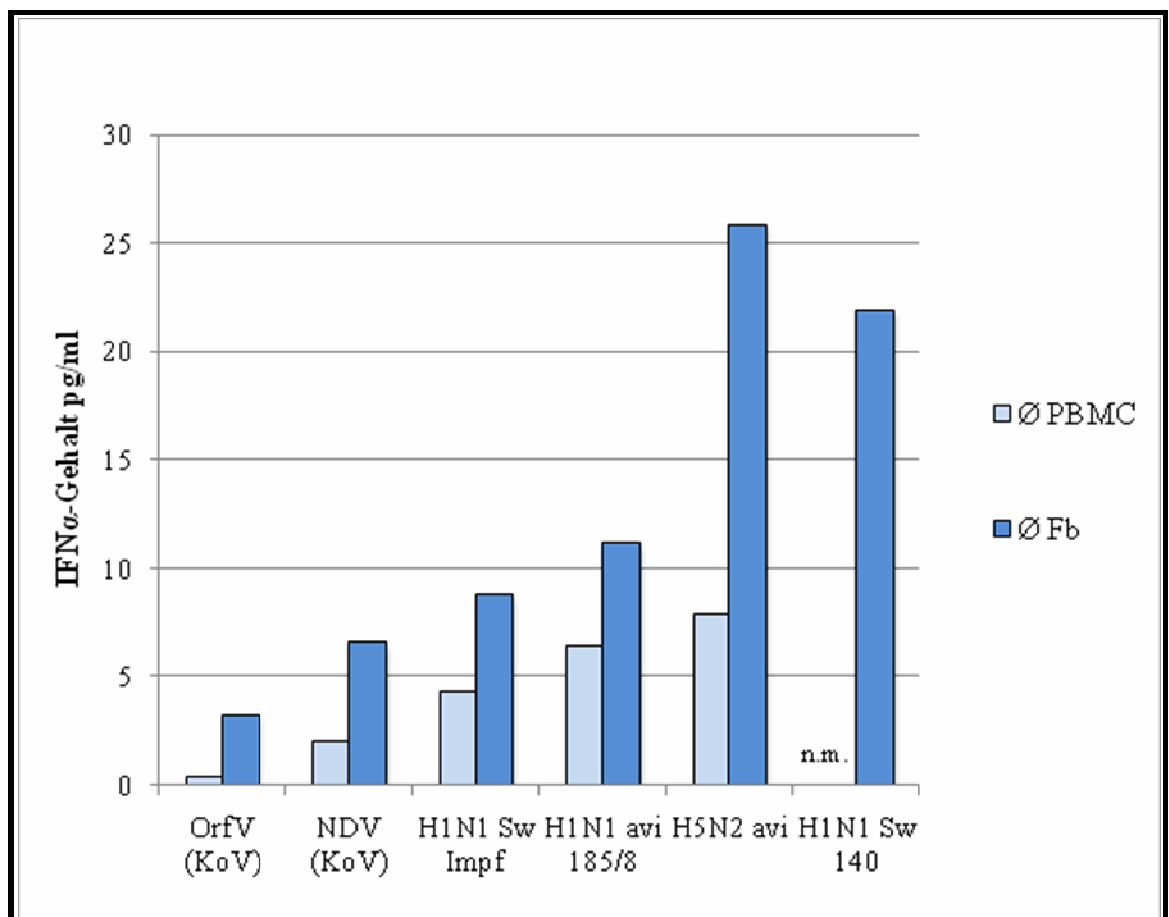


Abb. 22: Vergleich der Sekretion von VSV-antiviral wirksamen Substanzen durch porcine PBMC und primäre porcine Fibrozyten, durch verschiedene Stimuli. HAE

Gehalt an antiviral wirksamen Substanzen, berechnet am mitgeführten IFN- α Standard, in pg/ml (y-Achse); (n. m.= nicht messbar)

Bei der um eine log 10 Stufe geringeren Infektionsdosis der eingesetzten Viren ergab die Stimulation der Fibrozyten mit den Kontrollviren ORFV (0,15 pg/ml) und NDV (0,3 pg/ml) einen 20-fach niedrigeren Wert an sezernierter antiviraler Wirksamkeit. Die Sekretion an VSV-antiviral wirksamen Substanzen durch Fibrozyten reduzierte sich um ca. 10 % bei der verminderten Infektionsdosis der Influenza A Virussubtypen H1N1 Sw Impf (0,7 pg/ml), H1N1 avi 185/8 (1,2 pg/ml) und H5N2 avi (2,6 pg/ml). Bei der Stimulation der Fibrozyten mit dem Schweineinfluenzafeldisolat H1N1 140 mit einer verringerten Infektionsdosis konnte kein Gehalt an sezernierten antiviral wirksamen Substanzen im VSV-Test gemessen werden. Von den mit der um eine log 10 Stufe geringeren Infektionsdosis inkubierten PBMC stimulierten nur die Virussubtypen H1N1 Sw Impf (5,18 pg/ml), H1N1 avi 185/8 (0,3 pg/ml) und H5N2 avi (1,29 pg/ml) zur Sekretion von VSV-antiviral wirksamen Substanzen in den Zellkulturüberstand.

4.3 Vergleich der Sekretion antiviraler Substanzen im ELISPOT und VSV-Test

Die Ausschüttung von antiviralen Substanzen nach der Stimulation mit Viren aus unterschiedlichen Virusfamilien und mit verschiedenen Influenza A Virussubtypen ist bei Fibrozyten signifikant höher als bei PBMC desselben Individuums (ELISPOT $p=0,0001$ VSV-Test $p=0,004$; $p < 0,01$ Wilcoxon-Test). Diese Aussage konnte sowohl im IFN- α ELISPOT als auch durch den VSV-Test bestätigt werden.

Bezogen auf die einzelnen Virusstimuli ist sowohl die Spotanzahl des IFN- α ELISPOT als auch der im VSV-Test gemessene Gehalt an sezernierter antiviraler Wirksamkeit nach Stimulation mit dem aviären Influenza A Virussubtyp A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 am größten. Ein signifikanter, durch diesen Stimulus hervorgerufener Unterschied der IFN- α Sekretion zwischen Fibrozyten und PBMC konnte nur im ELISPOT nachgewiesen werden (ELISPOT $p=0,047$, Wilcoxon-Test).

Die Stimulation sowohl der Fibrozyten als auch der PBMC mit dem Schweineinfluenza Feldisolat H1N1 140 führte im IFN- α ELISPOT nur zu einer sehr geringen Bildung an IFN- α spezifischen Spots (Fb: \emptyset Spotzahl=58, PBMC: \emptyset Spotzahl=17). Im VSV-Test hingegen konnte durch die Inkubation der Fibrozyten mit dem Schweinefeldisolat H1N1 140 mit durchschnittlich 21,9 pg/ml der zweithöchste Gehalt an antiviraler Aktivität in den Überständen gemessen werden. Die Stimulation der PBMC führte zu keiner mit diesem Test messbaren antiviralen Aktivität.

Vergleicht man die beiden Schweineinfluenza H1N1 Subtypen in ihrer Kapazität zur Anregung der Sekretion von IFN- α bzw. von VSV-antiviral wirksamen Überständen wird deutlich, dass das Schweineimpfisolat FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 zur Bildung einer deutlich höheren Anzahl an IFN- α spezifischen Spots im ELISPOT, sowohl bei PBMC (\emptyset 67 Spots) als auch bei Fibrozyten (\emptyset 107 Spots) führt. Das porcine H1N1 Influenza A Virusisolat 140 führte dagegen bei Stimulation der PBMC nur zu einem Drittel und bei Fibrozyten nur zur Hälfte der IFN- α spezifischen Spotzahlen (PBMC: \emptyset 17, Fibrozyten: \emptyset 58). Im Gegensatz dazu konnte im VSV-Hemmtest bei der Infektion der Fibrozyten mit dem Schweineimpfstamm nur eine geringe antivirale Wirksamkeit gemessen werden (\emptyset 8,8 pg/ml). Das Schweineinfluenzafeldisolat H1N1 140 stimulierte jedoch nur die porcinen Fibrozyten zur Sekretion von potent antiviral wirksamen Substanzen (\emptyset 21,9 pg/ml).

Die im VSV-Test gemessene antivirale Wirksamkeit von Influenza Viren im Vergleich mit der eines anderen RNA-Virus (NDV) macht deutlich, dass alle eingesetzten Influenza A Viren einen stärkeren Stimulus zur Freisetzung antiviral wirksamer Aktivität darstellen. Auch bei der Inkubation der PBMC und Fibrozyten mit Parapoxvirus (ORFV), einem großen komplex aufgebauten und behüllten Doppelstrang-DNA-Virus, konnten - verglichen mit den Influenza A Virussubtypen - nur deutlich geringere Mengen antiviral wirksamer Aktivität gemessen werden. Im IFN- α spezifischen Test (ELISPOT) war nach der Stimulation von PBMC mit den aviären Influenza A Viren immer eine höhere Anzahl an IFN- α spezifischen Spots im Vergleich zu NDV und ORFV messbar.

Nur nach Stimulation mit Fibrozyten (Abb. 20) konnten verglichen zu den Influenza A Virusstimuli mit den beiden Kontrollviren z. T. höhere IFN- α spezifische Spitzzahlen gemessen werden. Porcine Fibrozyten wurden als potente Produzenten von IFN- α und VSV-antiviral wirksamen Substanzen identifiziert, die sich im direkten intra-individuellen Vergleich in dieser Leistung immer den PBMC als überlegen erwiesen.

V. Diskussion

Während bei bisherigen Untersuchungen mit porcinen Fibrozyten die Aktivierungsfähigkeit der T-Lymphozyten und die Beteiligung der Fibrozyten am angeborenen Immunsystem im Vordergrund standen, wird hier im aktuellen infektionsmedizinischen Zusammenhang die Interaktion von primären porcinen Fibrozyten mit verschiedenen Influenza A Virussubtypen analysiert. Im Mittelpunkt standen dabei die Kultivierung und Charakterisierung der Fibrozyten sowie die Infektions- und Vermehrungsfähigkeit ausgewählter Influenza Virusisolate und deren stimulierende Potenz zur Produktion und Sekretion von antiviral wirksamen Substanzen.

1. Charakterisierung porciner Fibrozyten

Bisherige Erkenntnisse bei der Gewinnung und Charakterisierung der porcinen Fibrozyten konnten nur zum Teil bestätigt werden. Trotz des lymphozytären Blutbildes von Schweinen (Kraft und Dürr, 2005) waren mindestens 200 ml Schweineblut nötig, um eine ausreichende Menge an Fibrozyten aus PBMC für die Versuchsreihen zu gewinnen. Diese größeren Blutmengen konnten nur durch Auffangen des Blutstromes beim Tötungsvorgang der Tiere am Münchner Schlachthof gewonnen werden. Dadurch konnte eine bakterielle Kontamination nicht immer vermieden und schlachtstressbedingte Reaktionen der Blutzellen nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich erschwerte das, in Abschnitt IV 2 beschriebene inselförmige und heterogene Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur mit einer daraus resultierenden variablen Kultivierungsdauer von zehn Tagen bis drei Wochen die Gewinnung der primären porcinen Fibrozyten. Die von Pilling et al. (2003; 2009b) gewonnenen Erkenntnisse einer besseren Differenzierung von humanen Fibrozyten in serumfreiem Medium konnten nicht auf porcine Fibrozyten übertragen werden. Eine Differenzierung der porcinen Fibrozyten erfolgte lediglich mit der bereits von Balmelli et al. (2005) beschriebenen Kultivierungsmethode.

Die aus den porcinen PBMC gewonnenen Zellen konnten lichtmikroskopisch anhand ihrer charakteristischen Morphologie - spindelförmige adhärenente Zellen mit einem ovalen Zellkern - als Fibrozyten klassifiziert werden. Durch den Nachweis der für Schweinefibrozyten typischen Oberflächenantigene MHC Klasse I und II, SWC-3 und CD 14 mittels Fluoreszenzmarkierung im Durchflusszytometer (Balmelli et al., 2005) konnten die Fibrozyten eindeutig identifiziert werden. Demgegenüber war in dieser Studie nur bei ca. 12 % der untersuchten Zellen eine Expression des für Fibrozyten charakteristischen intrazellulären Kollagen Typ I nachweisbar (Balmelli et al., 2005; Bucala et al., 1994). Eine Erklärung hierfür dürfte die Verwendung der derzeit kommerziell ausschließlich verfügbaren, für humanes Kollagen Typ I spezifischen Antikörper sein, bei denen eine Kreuzreaktivität mit Schweinekollagen vom Hersteller (Sigma-Aldrich, München) angegeben wird. Eine Überprüfung der Funktionsfähigkeit dieser Antikörper im Durchflusszytometer wurde vom Hersteller bis dato nicht durchgeführt. Überdies konnte auch in früheren Studien von Balmelli et al. (2005) im Durchflusszytometer bei elf Tage kultivierten, porcinen Fibrozyten nur eine geringe Expression von Kollagen Typ I nachgewiesen werden. Eine deutliche, intrazelluläre Expression von Kollagen Typ I durch primäre porcine Fibrozyten konnte offenbar nur durch konfokale Mikroskopie ermittelt werden (Balmelli et al., 2005). Jedoch ist keine Größenordnung der positiv markierten Zellen bekannt.

Im Gegensatz zu porcinen Fibrozyten konnte bei primären humanen Fibrozyten mittels Analyse im Durchflusszytometer eine deutliche Kollagen I Expression festgestellt werden. Dabei ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass Bucala et al. (1994) diese Fibrozyten über einen Zeitraum von sechs Wochen kultivierten, bevor sie analysiert wurden. Chesney et al. (1998) verwendeten für eine entsprechende Versuchsreihe - im Gegensatz zu dieser Studie - bereits direkt Fluoreszinfarbstoff-markierte Kollagen I spezifische Antikörper zur Analyse von zehntägigen, vorab mittels cell sorting im Durchflusszytometer isolierten, humanen Fibrozyten.

Dies lässt darauf schließen, dass primäre porcine Fibrozyten weniger intrazelluläres Kollagen Typ I exprimieren. Aufgrund hoher Hintergrundwerte wegen der Eigenfluoreszenz porciner Fibrozyten könnten antigenspezifische Antikörper gegen porcines Kollagen Typ I eventuell eindeutigere Ergebnisse erzielen. Da die Kollagenproduktion in porcinen Fibrozyten bei einer längeren Kultivierungsdauer möglicherweise wie bei humanen Fibrozyten zunimmt (Bucala et al., 1994), wären in weiteren Untersuchungsreihen eventuelle Schwankungen der Kollagenproduktion über einen längeren Zeitverlauf zu erfassen.

2. Vermehrungsfähigkeit von Influenzaviren in porcinen Fibrozyten

Balmelli et al. (2005) konnten primäre porcine Fibrozyten mit dem klassischen Schweinepestvirus (CSFV) infizieren und eine produktive Vermehrung nachweisen. Anlässlich des Auftretens des aktuellen humanen H1N1 Influenza A Pandemievirus wurden in dieser Studie niedrigpathogene (LPAI, low pathogenic avian influenza) H1N1-Subtypen von Schwein und Vogel sowie ein potentiell stärker pathogener, aviärer Influenza A Virussubtyp H5N2 ausgewählt, um die Vermehrungsfähigkeit dieser Virusisolate in primären porcinen Fibrozyten zu untersuchen. Da H1N1 Influenza A Virussubtypen sowohl bei Mensch, Schwein und Vogel vorkommen (Alexander, 2000; Garten et al., 2009), sind sie besonders im Hinblick auf speziessübergreifende Infektionen und die Entstehung von Antigen-Shift von Bedeutung. Der direkte Vergleich von aviären und porcinen Influenza A Viren des gleichen Subtyps (H1N1) untereinander sowie von Schweineinfluenzaviren eines Impfstamms mit dem eines Feldisolats erschien dabei interessant. Der auch als niedrigpathogen (LPAI) eingestufte Influenza A Virussubtyp A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 wurde in die Untersuchungen mit eingeschlossen, da er aufgrund seiner Membranproteine Hämagglutinin H5 und Neuraminidase N2 zur Gruppe der potentiell pathogenen Influenzasubtypen zählt (Gaidet et al., 2008; Lee et al., 2005). Durch einen Antigen-Drift ist die

Entstehung von hochpathogenen Influenza A H5N2 Virussubtypen beschrieben (Lee et al., 2005).

Die Infektion der Fibrozyten mit den aviären Influenza A Virussubtypen A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und des Schweineinfluenza Feldvirusisolates H1N1 Sw 140 konnte lichtmikroskopisch anhand eines zytopathogenen Effektes (cpE) nachgewiesen und mit immunhistologischer Färbung intrazellulären Virusantigens bestätigt werden (vgl. Abschnitt IV 3.1.2). Am deutlichsten gelang dieser Nachweis mit dem Vogelinfluenza A Virusisolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2.

Im Vergleich zu den zwei untersuchten Schweineisolaten FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 und H1N1 Sw 140, zeigten die beiden aviären Influenza Isolate (A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1) in den wirtsfremden Schweinezellen eine weitaus bessere Infektionsfähigkeit.

Die Empfänglichkeit von aviären Influenza A Virussubtypen in Schweinen und in Schweinezellen wurde auch schon in früheren Studien untersucht. Kida et al. (1994) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass aviäre Influenza A Viren ein höheres Potential zur Infektion von Schweinen haben als porcine Influenza A Viren. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien, dass Schweinezellen aus Atmungsorganen empfänglicher für porcine Influenza A Subtypen sind (Schmidt et al., 1974; Van Poucke et al., 2010). Eine generelle Aussage über das Infektionsvermögen einzelner Virusisolate in homologen oder heterologen Systemen kann daher nicht gemacht werden.

Die Untersuchung des Zellspektrums des aviären H1N1 Influenza Isolates A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 bestätigte die in den Schweinefibrozyten nachgewiesene Antigenpräsenz dieses Virusisolats in wirtsfremden Zellen. Die in den caninen MDCK ($10^{6,5}$ KID₅₀/ml) und humanen CaCo-2 Zellen ($10^{6,5}$ KID₅₀/ml) ermittelten Virustiter waren erheblich höher als die in wirtsspezifischen Hühnerembryofibroblasten (HEF) (10^4 KID₅₀/ml). Die gute Replikation in CaCo-2 Zellen, die von einem humanen Adenokarzinom im Kolon abstammen, lässt sich mit der Vermehrung aviärer Influenza Viren im

Intestinaltrakt erklären (Webster et al., 1978). Auch Zhirnov et al. (2007) stellten fest, dass Influenza A Viren in CaCo-2 Zellen besser replizieren als in HEF.

Nach der Infektion von Fibrozyten mit dem Schweineinfluenzavirus Impfstamm FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 zeigte sich immunhistologisch keine spezifische intrazelluläre Färbung von Virusantigenen, es konnte jedoch lichtmikroskopisch ein cpE festgestellt werden. Nach erneuter Überprüfung durch Titration von mit diesem Isolat infizierten Fibrozyten-Zellkulturüberständen konnte gezeigt werden, dass keine produktive Vermehrung dieses Virussubtyps in den Fibrozyten stattfand. Aufgrund häufiger Passagen in MDCK Zellen und damit einer Attenuierung des Impfstammes FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 zur Influenzaimpfstoffherstellung könnte ein Verlust der Infektionsfähigkeit für andere Zellen einhergegangen sein. Die Möglichkeit einer antigenetischen Variation bei einer Vermehrung von Influenza Viren in embryonierten Hühnereiern und in MDCK Zellen ist in der Literatur bereits beschrieben (Katz et al., 1987; Katz und Webster, 1988; Oh et al., 2008; Robertson et al., 1985; Rocha et al., 1993).

Nach der Infektion von Fibrozyten und PBMC mit den verschiedenen Influenza A Viren wurden die gewonnenen Zellkulturüberstände und Zelllysate mittels RT-qPCR auf Virusgenompräsenz untersucht. Dabei konnte bei keinem der Influenzaisolate ein bedeutender Anstieg der Virusgenomkopien über einen Verlauf von 72 Stunden festgestellt werden (vgl. Abschnitt IV 3.3). Die bereits in der immunhistologischen Färbung nachgewiesene Influenza Virusinfektion der Fibrozyten konnte mit dem Virusgenomnachweis bestätigt werden, jedoch konnte keine Replikation der Influenza A Virussubtypen in primären porcinen Fibrozyten und PBMC nachgewiesen werden. Bei dem H1N1 Schweineinfluenzaisolat FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 konnte in der Immunhistologie bislang nicht eindeutig eine Antigenpräsenz in Fibrozyten nachgewiesen werden. Der deutliche Virusgenomnachweis in der qPCR ist ein Hinweis auf die Infektionsfähigkeit dieses Virussubtyps, der jedoch nur das Vorliegen von Virusgenom oder Virusgenomteilen nicht aber von kompletten Viren beweisen kann.

Einen produktiven Infektionsverlauf von aviären und porcinen Influenza A Virussubtypen in Schweinezellen konnten Seo et al. (2001) und Massin et al. (2010) nachweisen. Bei den in ihren Studien beschriebenen Zellen mit einem produktiven Infektionsverlauf handelt es sich jedoch um solche des Atmungstraktes, die besonders empfänglich für Influenza A Viren sind. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine generelle Infektionsmöglichkeit von primären porcinen Fibrozyten mit Influenza A Viren in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, jedoch keine nennenswerte Vermehrung bzw. Freisetzung von Tochterviren über 72 Stunden messbar war. Das Risiko eines Reassortments wird durch den abortiven Infektionsverlauf gemindert zumal eine MOI von 1 in der Natur nur selten vorkommt. Jedoch ist zu bemerken, dass sich Fibrozyten besonders an Eintrittspforten (Wundheilung) befinden. Die bloße Präsenz von Virusgenom in der Zelle kann bei einer Infektion mit einem zweiten, zu produktiven Vermehrung fähigen Influenzavirus trotzdem zum Austausch von Genomsegmenten führen mit der möglichen Konsequenz der Entstehung von reassortierten Virusnachkommen. Die Untersuchung anderer Influenza A Virussubtypen - auch hochpathogener Isolate - auf eine produktive Vermehrung in den Fibrozyten sowie die Analyse des Reassortmentpotentials bei einer Doppelinfektion mit zwei verschiedenen Influenza A Viren bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Gleiches gilt auch für die Frage, ob die Infektion der Fibrozyten rezeptorvermittelt ist oder ob Fibrozyten - ähnlich wie Monozyten/Makrophagen - keine spezifischen Sialinsäurerezeptoren zur Aufnahme von Influenza Viren benötigen, sondern diese durch Endozytose aufnehmen. Balmelli et al. (2005) beschrieben bereits die hohe Endozytosefähigkeit der porcinen Fibrozyten.

3. Antivirale Aktivität der Fibrozytenüberstände

Die Sekretion von Interferon alpha (IFN- α) wird hauptsächlich durch Doppelstrang-RNA-Viren induziert. Aber auch andere Viren und Mikroorganismen, sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren können eine Interferonfreisetzung bewirken (Bekisz et al., 2004; Colby und Duesberg, 1969). IFN- α gehört zu den Typ-I Interferonen und kann bei Anwesenheit von Viren durch alle kernhaltigen Zellen synthetisiert werden (Weber et al., 2003).

In bisherigen Untersuchungen zeigten Balmelli et al. (2005), dass porcine Fibrozyten T-Lymphozyten aktivieren können und diese daraufhin proinflammatorische Zytokine - wie Interferon gamma (IFN- γ) - sezernieren. Bei der Infektion von porcinen Fibrozyten mit dem Klassischen Schweinepestvirus (CSFV) konnte keine Sekretion von INF- α durch Fibrozyten detektiert werden (Balmelli et al., 2007). Wird anstatt des natürlichen CSFV ein defizientes CSFV als Stimulus eingesetzt, bei dem das Gen für das Protein N^{pro} - welches hemmend auf die IFN-Ausschüttung wirkt - ausgeschaltet ist, (Bauhofer et al., 2007), konnte hingegen bei porcinen Fibrozyten eine geringe Produktion von IFN- α nachgewiesen werden (Balmelli et al., 2007). Ein derartiger Interferon antagonistischer Effekt ist auch bei Influenza A Viren bekannt.

Ausschlaggebend für die in dieser Arbeit durchgeführte, vergleichende Untersuchung von PBMC und Fibrozyten war zum einen, dass PBMC nach Stimulation mit verschiedenen Viren zu den wichtigsten Interferon (IFN) Produzenten zählen (Büttner et al., 1995; Siegal et al., 1999; von der Ohe et al., 2001) und damit als Vergleichsmaßstab für die Interferon-Bildungsfähigkeit von Fibrozyten dienen. Zum anderen war entscheidend, dass sich Fibrozyten aus einer PBMC-Subpopulation (CD 14 + Monozyten) differenzieren und hier auch so generiert wurden (Abe et al., 2001). Gut ersichtlich wurde, dass eine aus den PBMC angereicherte Fibrozytenpopulation erheblich mehr IFN- α sezerniert als alle Zellen der PBMC und damit wahrscheinlich an einem Anreicherungsort (Eintrittspforte) eine effektive Abwehrbarriere gegen Viren bilden kann.

In den meisten veröffentlichten Studien wurde die Zytokin-Ausschüttung der Fibrozyten mittels mRNA-Nachweis (Chesney et al., 1998), ELISA (Balmelli et al., 2007) oder Bioassay (Balmelli et al., 2007) untersucht. Mit dem in dieser Arbeit eingesetzten ELISPOT konnte mittels IFN- α spezifischer Spots auf Einzelzellebene - nach der Stimulation der porcinen Fibrozyten mit den verschiedenen Influenza A Virussubtypen - ein signifikant größeres Potential zur Produktion und Sekretion von IFN- α ($p < 0,0001$, Wilcoxon-Test) als bei den parallel untersuchten PBMC festgestellt werden. Auch die im VSV-Test nachgewiesene antivirale Wirksamkeit von porcinen Fibrozyten-Überständen ist signifikant größer, als diejenige der parallel untersuchten PBMC vom gleichen Blutspender ($p = 0,004$, $p < 0,01$; Wilcoxon-Test). Diese erheblich höhere antivirale Wirksamkeit im Vergleich zu PBMC verdeutlicht die wichtige Funktion porciner Fibrozyten in der Immunantwort und die lokale Abwehrbarriere an Eintrittspforten. Die Hemmung der VSV-Vermehrung kann durch ein Gemisch an antiviral wirksamen Zytokinen verursacht worden sein, u.a. muss hier der Tumor Nekrosefaktor (TNF) genannt werden (Beutler und Cerami, 1987).

Vergleicht man die in dieser Studie untersuchte antivirale Wirksamkeit von PBMC und Fibrozyten nach Stimulation mit dem Paramyxovirus (NDV) und den Orthomyxoviren, so fällt auf, dass alle eingesetzten Influenza A Viren eine stärkere induktive Eigenschaft zur Erzeugung von VSV-antiviral wirksamer Aktivität haben. Da dem als Referenzvirus herangezogenen Newcastle Disease Virus (NDV) in der Literatur eine gute Interferon-Induktion zugeschrieben wird (Kohase und Vilcek, 1979; Kowal und Youngner, 1978; Marcus et al., 1983), unterstreicht dies das Stimulationspotential der Influenza A Viren zur Sekretion von antiviralen Substanzen trotz der Typ I Interferon hemmenden Genfunktion des viralen Nichtstrukturproteins 1 (NS1) (Haye et al., 2009; Wang et al., 2000). Das NS1 Protein hemmt die Expression von IFN- α und anderen inflammatorische Proteinen, indem es an den RIG-1/IPS-1 Komplex - den Hauptauslöser für antivirale Immunantwort - bindet (Guo et al., 2007; Mibayashi et al., 2007) und so Signalwege blockiert. Darüber hinaus reguliert NS1 auch die

Synthese, den Transport und die Translation zellulärer mRNA und beeinflusst somit die zelluläre Proteinsynthese (Chen et al., 1999; Kochs et al., 2007; Lu et al., 1995; Samuel, 2001).

Ob die von Influenza A Viren ausgehende Interferon antagonistische Genfunktion auch in porcinen Fibrozyten wirksam ist und eventuell bei jedem Subtyp-Isolat anders effektiv ist, bleibt zu klären.

Bei dem in dieser Studie angewandten ELISPOT induzierte NDV bei Fibrozyten die zweithöchste Anzahl an IFN- α spezifischen Spots im ELISPOT, womit die gute Interferoninduktion dieses Virus bestätigt wurde.

Das als guter Stimulator der IFN- α Produktion in humanen, ovinen und porcinen peripheren mononukleären Blutleukozyten (Büttner et al., 1995) beschriebene Parapoxvirus D 1701 (ORFV) (Mayr et al., 1981) wurde neben dem NDV als Kontrollvirus ausgewählt. In dieser Studie konnten jedoch bei der Stimulation der porcinen Fibrozyten mit dem ORFV im Vergleich mit Influenza A Virussubtypen nur deutlich geringere Mengen VSV-antiviral wirksamer Substanzen gemessen werden. Auch im ELISPOT konnte nach Stimulation mit den aviären Influenza A Viren eine höhere Anzahl an IFN- α spezifischen Spots im Vergleich zum ORFV festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, wie schon der Vergleich mit dem NDV, das gute Stimulationspotential der RNA Viren und speziell der hier eingesetzten Influenza A Viren zur Typ I Interferonbildung durch Fibrozyten und PBMC.

Betrachtet man die unterschiedliche Stimulationspotenz zur Erzeugung VSV-antiviral wirksamer Überstände und die IFN- α Induktion durch die Influenza A Viren der einzelnen Wirtsspezies, fällt das große Potential des aviären Influenza A Subtyps A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 sowohl in Fibrozyten als auch in PBMC auf (vgl. Abschnitt IV 4.1 und Abschnitt IV 4.2).

Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen der IFN- α Sekretion von porcinen Fibrozyten und dazugehörigen PBMC lieferte nur die Berechnung der im IFN- α ermittelten, durchschnittlichen Spotzahlen der aviären Stimuli

A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 ($p=0,047$) und A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 ($p=0,028$, Wilcoxon-Test ohne Bonferroni-Adjustierung). Für eine exakte Aussage müsste die Stichprobenanzahl ($n=12$) erhöht werden. Bei den übrigen eingesetzten Stimuli war zwar eine höhere antivirale Aktivität von Fibrozyten als von PBMC messbar, aber statistisch nicht berechenbar. Damit wird durch diese Studie herausgestellt, dass die aviären Influenza A Virussubtypen in ex vivo gewonnenen porcinen Zellen nicht nur ein größeres Infektionspotential gegenüber den Schweineisolaten besitzen, sondern auch signifikant größere Mengen an sezerniertem IFN- α induzieren können als die hier eingesetzten porcinen Isolate.

Auffällig war die starke VSV-antivirale Wirkung, der Überstände, die durch die Infektion mit dem Schweinefeldvirusisolat H1N1 140 von Fibrozyten sezerniert wurden. Im IFN- α ELISPOT konnte dagegen nach Stimulation mit diesem Virussubtyp nur eine sehr geringe Anzahl an IFN- α spezifischen Spots erzielt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass andere antiviral wirksame Substanzen, z.B. TNF, von den Fibrozyten in den Überstand abgegeben wurden. Weitere Substanzen mit antiviralen Eigenschaften sind die - auch von Fibrozyten sezernierten - Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β (Chesney et al., 1998), deren antivirale Wirkung gegenüber dem Humanen Immunschwäche Virus (HIV) nachgewiesen wurde (Capobianchi et al., 1998; Virelizier, 1999). Von der Ohe et al. (2001) belegten in ihrer Studie, dass MIP-1 β nach viraler Stimulation mit NDV durch neutrophile Granulozyten sezerniert wird. Um die Gesamtheit der von Fibrozyten nach Stimulation sezernierten antiviralen Substanzen zu bestimmen, müsste eine Differenzierung mit neutralisierenden Antikörpern im ELISA durchgeführt werden oder zumindest eine Analyse auf mRNA Ebene. Eine andere Erklärung für diese gegensätzlichen Befunde im ELISPOT und VSV-Test könnte sein, dass die Interferon-Ausschüttung durch das Schweinefeldisolat H1N1 140 gehemmt wird. Dies würde die geringe Sekretion von IFN- α im ELISPOT erklären. Die Interferon-Ausschüttung von Zellen kann, wie oben erläutert, durch das Binden des Influenza Virus Nichtstrukturproteins 1 (NS-1 Protein) an doppelsträngige DNA gehemmt werden (Lu et al., 1995;

Ludwig et al., 2002; Smith et al., 2001; Talon et al., 2000; Wang et al., 2000). Abschließend muss angemerkt werden, dass aufgrund der geringen Untersuchungsanzahl (n=3) mit diesem Virusisolat (Schweineisolat H1N1 140) keine allgemeingültige Aussage gemacht werden kann.

Das Schweineimpfvirus FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1 induzierte eine durchschnittlich im mittleren Bereich liegende Menge an antiviral wirksamen Substanzen, im Vergleich zu den anderen eingesetzten Influenza A Viren. Der Unterschied in der Sekretion von antiviral wirksamen Substanzen, der sich im ELISPOT und im VSV-Hemmtest zum zweiten Schweineinfluenza Isolat H1N1 140 zeigt, liegt an den - im vorherigen Abschnitt beschriebenen - möglichen Ursachen der Schwankung der durch das H1N1 140 Isolat induzierten Interferonausschüttung und an dessen niedriger Untersuchungsanzahl.

Aufgetretene Schwankungen in der IFN- α Sekretion bei der Stimulierung der Fibrozyten könnten durch Zusammenlagerung bzw. Inselbildung - wie schon in Abschnitt IV 2 bei der Kultivierung der Fibrozyten beschrieben - entstanden sein. Nowacki et al. (1993) beschreiben ferner altersbedingte Schwankungen in der IFN- α Sekretion von Schweinen. Ihrer Studie zufolge ist die IFN-Ausschüttung bei Schweinen in einem Alter von 20 bis 25 Wochen, also unter dem durchschnittlichen Schlachtalter von Schweinen (ca. 31 Wochen) am höchsten (Nowacki et al., 1993). Eine Variation im Alter der Blutspender-Schweine und die damit verbundenen IFN- α Schwankungen könnten, ebenso wie eine durch Transportstress bedingte Beeinträchtigung der IFN- α Produktion (Artursson et al., 1989), eine Rolle bei den Schwankungen der gemessenen IFN- α Werte gespielt haben.

In Ergänzung zu Balmelli et al. (2007) konnte in dieser Studie eine deutliche Interferonproduktion der Fibrozyten durch die Induktion mit Orthomyxoviren, einem Paramyxovirus und einem Parapoxvirus nachgewiesen werden. Wie wichtig Interferone in der Immunantwort bei Virusinfektionen sind, wird im Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener DNA und RNA-Viren beschrieben (Garcia-Sastre et al., 1998; Grieder und Vogel, 1999; Muller et al.,

1994; Siegal et al., 1999; van den Broek et al., 1995). Interferone hemmen die Influenza Virus Replikation, indem sie die Zellen zur Produktion antiviraler Proteine anregen. Die antiviralen Proteine Mx und Threonin Proteinkinase R (PRK) hemmen die Aufnahme des Virusnukleokapsids in den Zellkern und verhindern die virale RNA-Synthese (Haller et al., 1998; Haller und Kochs, 2002; Samuel, 2001). Anhand der in dieser Studie nachgewiesenen, hohen Ausschüttung an antiviral wirksamen Substanzen und einer signifikanten Interferoninduktion, konnte eine Beteiligung der primären porcinen Fibrozyten an der Immunabwehr bei einer Influenza A Virusinfektion bewiesen werden. Durch die direkte antivirale Wirkung des IFN- α , aber auch durch seine Auswirkungen auf andere Immunzellen, wie Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen und T-Helfer-Zellen (Biron et al., 1999; Le Bon et al., 2001; Montoya et al., 2002), wird die Virusvermehrung in Schweinezellen und damit auch die Entstehung potentieller neuer Virussubtypen durch eine Doppelinfektion gemindert. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass porcine Fibrozyten bei den wirtsfremden aviären Influenza A Viren ein deutlich höheres Potential zur Interferonbildung als bei homologen Influenza A Viren haben und somit einer Infektion weiterer Schweinezellen entgegenwirken.

Neben Fibrozyten kann eine Vielzahl von Zellen Interferon produzieren. Natural Interferon Producing Cells (NIPs) gehören zu den potentesten IFN-Produzenten und entsprechen plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). Bei der Inokulation von pDC mit Influenza A Viren können große Mengen an sezerniertem IFN- α gemessen werden (Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004). Die Induktion der IFN- α Sekretion durch NIPs erfolgt über den, auch bei Fibrozyten vorkommenden (Balmelli et al., 2007), Toll-ähnlichen Rezeptor 7 (TLR 7) (Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004). Da bei Fibrozyten der Induktionsmechanismus zu IFN-Sekretion bislang unbekannt ist, sind hierzu an diese Studie anschließende Untersuchungen ebenso wie die Untersuchung weiterer Virusstämme denkbar. Nachdem Fibrozyten den Dendritischen Zellen in ihren anderen immunologischen Funktionen ähnlich sind (Chesney et al., 1997), konnte mit dieser Studie auch das Potential zur Produktion von IFN- α von

porcinen Fibrozyten nachgewiesen werden. Da NIPs eine kleine Teilpopulation der PBMC darstellen und sich Fibrozyten aus einer PBMC-Subpopulation differenzieren, ist die bloße Anreicherung der Fibrozyten durch die Langzeitkultur ein wesentlicher Faktor der quantitativ so starken Zytokinproduktion. Es stellt sich die Frage, ob nicht neben den pDC auch Fibrozyten den NIPs zugeordnet werden müssten.

VI. Zusammenfassung

Interaktion von Influenza A Virus Subtypen mit primären porcinen Fibrozyten

Stephanie Maier

Aus dem peripheren Blut von Schlachtschweinen wurden primäre porcine Fibrozytenkulturen hergestellt und die Zellen charakterisiert. Die Infizierbarkeit der Fibrozyten durch aviäre und porcine Influenza A Viren wurde geprüft. Dazu wurden ein quantitativer Virusgenomnachweis, ein immunhistologischer Antigennachweis sowie eine Virusvermehrung im Ei und in Zellkulturen durchgeführt. Das Potential von porcinen Fibrozyten zur Sekretion von Interferon alpha (IFN- α) und zur Erzeugung von Vesikulären Stomatitis Virus (VSV)-hemmenden, antiviral wirksamen Überständen wurde im ELISPOT und einem Biotest geprüft. Dazu wurden verschiedene Influenza A Virussubtypen aviären und porcinen Ursprungs zur vergleichenden Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und Fibrozyten des gleichen Blutspenders eingesetzt.

Eine Infektion der primären porcinen Fibrozyten mit den aviären Influenza A Virussubtypen A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und dem Schweineisolat H1N1 Sw 140, jedoch nicht mit dem Impfvirus FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, konnte anhand von zytopathogenem Effekt und immunhistologischer Färbung nachgewiesen werden. Die Infektion wurde anhand von quantitativem Virusgenomnachweis als nicht produktiv beurteilt.

Die vergleichende Prüfung der Sekretion von antiviral wirksamen Stoffen (v. a. IFN- α) nach der *in vitro* Stimulation mit den aviären Influenza A Viren und den porcinen Influenza A Virussubtypen H1N1 durch die porcinen Fibrozyten ergab eine signifikant größere Sekretionsleistung, als durch die PBMC desselben Individuums.

Damit konnte erstmals die wichtige Rolle der Fibrozyten des Schweines in der Abwehr von Influenza A Virusinfektionen nachgewiesen werden. Eine

produktive Vermehrung der Influenza A Viren in primären porcinen Fibrozyten und PBMC könnte durch die potente Interferon α Produktion und die Biowirksamkeit ihrer Überstände im VSV antiviralen Test verhindert werden. Dennoch besteht durch das Vorliegen von intrazellulärem Virusgenom über 72 Stunden die Möglichkeit eines Austauschs von Genomsegmenten, bei gleichzeitiger Infektion mit mehreren Influenza A Viren. Ob aber ein genetischer Austausch mit Neuordnung von Genomsegmenten zur Entstehung eines neuen Influenza A Virussubtyps in porcinen Fibrozyten nach Doppelinfektion möglich ist, bleibt zu klären.

Weitere Untersuchungen mit porcinen Fibrozyten sind aufgrund ihrer Eigenschaft Fremdantigene aufzunehmen und zu präsentieren besonders interessant auch im Hinblick auf ihre Abwehrrolle in vivo an Eintrittspforten von Mikroorganismen.

VII. Summary

Interaction of Influenza A virus subtypes with primary porcine fibrocytes

Stephanie Maier

Primary porcine fibrocytes were generated from the peripheral blood of slaughter pigs. The cells were characterised and an infection of the cells with influenza A viruses of avian and porcine origin was tested. For that reason quantitative virus genome and immunohistological antigen detection as well as viral replication in eggs and cell cultures were performed. The potential of porcine fibrocytes to secrete interferon alpha (IFN- α) and to produce antiviral supernatants to inhibit the replication of vesicular stomatitis virus (VSV), was proven by ELISPOT and bioassay. For this purpose different influenza A viruses of avian and porcine origin were used for comparative stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and fibrocytes of the same blood donor.

An in vitro infection of the primary porcine fibrocytes with the avian influenza A virus subtypes A/mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1, A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 and the porcine isolate H1N1 Sw 140, however not for the vaccine strain FLUAV/Sw/Belzig/2/2001 H1N1, could be confirmed by cytopathogenic effect and immunohistological staining. By quantitative virus genome detection the infection was judged as non productive.

Comparative testing of the secretion of antiviral substances (mainly IFN- α) by porcine fibrocytes, after in vitro stimulation with avian and porcine influenza A viruses, revealed a significantly higher amount of secreted substances in comparison to PBMC of the same individual.

Thus an important role of primary porcine peripheral blood fibrocytes in defence against influenza A viruses could be shown for the first time. A productive replication of influenza A viruses in porcine fibrocytes and PBMC might be avoided by the efficient production of interferon α and the VSV antiviral bioactivity of their supernatants. However the possibility of re-assortment of

genome segments after a double influenza A virus infection cannot be excluded since the genome detection was possible over 72 hours. This hypothesis has to be confirmed in further experiments. Future investigations with porcine fibrocytes are of special interest because these cells are potent antigen presenting cells and play a role in vivo defence at the entry sites for pathogens.

VIII. Literaturverzeichnis

- Abe, R., Donnelly, S.C., Peng, T., Bucala, R., und Metz, C.N. (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166, 7556-7562.
- Aiba, S., und Tagami, H. (1997). Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J Cutan Pathol* 24, 65-69.
- Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74, 3-13.
- Alvarez, B., Sanchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., Ezquerra, A., und Dominguez, J. (2000). A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55, 342-351.
- Andersson-Sjoland, A., de Alba, C.G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramirez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., und Selman, M. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2129-2140.
- Artursson, K., Wallgren, P., und Alm, G.V. (1989). Appearance of interferon-alpha in serum and signs of reduced immune function in pigs after transport and installation in a fattening farm. *Vet Immunol Immunopathol* 23, 345-353.
- Balmelli, C., Alves, M.P., Steiner, E., Zingg, D., Peduto, N., Ruggli, N., Gerber, H., McCullough, K., und Summerfield, A. (2007). Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology* 212, 693-699.
- Balmelli, C., Ruggli, N., McCullough, K., und Summerfield, A. (2005). Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol* 77, 923-933.
- Barth, P.J., Ebrahimsade, S., Hellinger, A., Moll, R., und Ramaswamy, A. (2002a). CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 440, 128-133.
- Barth, P.J., Ebrahimsade, S., Ramaswamy, A., und Moll, R. (2002b). CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 440, 298-303.
- Barth, P.J., Ramaswamy, A., und Moll, R. (2002c). CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Arch* 441, 564-568.
- Bauhofer, O., Summerfield, A., Sakoda, Y., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., und Ruggli, N. (2007). Classical swine fever virus Npro interacts with interferon

- regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* 81, 3087-3096.
- Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N.D., und Zoon, K.C. (2004). Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 22, 243-251.
- Bellini, A., und Mattoli, S. (2007). The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 87, 858-870.
- Beutler, B., und Cerami, A. (1987). Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316, 379-385.
- Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E., und Du Clos, T.W. (2001). Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* 166, 6735-6741.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., und Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220.
- Bogdan, C., und Schleicher, U. (2006). Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? *Trends Immunol* 27, 282-290.
- Bouillant, A.M., Dulac, G.C., Willis, N., Girard, A., Greig, A.S., und Boulanger, P. (1975). Viral susceptibility of a cell line derived from the pig oviduct. *Can J Comp Med* 39, 450-456.
- Brown, I.H. (2008). Avian Influenza, Vol 27 (Klenk H-D, Matrosovic MN, Stech J).
- Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M., und Cerami, A. (1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1, 71-81.
- Büttner, M., Czerny, C.P., Lehner, K.H., und Wertz, K. (1995). Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet Immunol Immunopathol* 46, 237-250.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R., und Zuckermann, F.A. (2010). Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet Immunol Immunopathol* 135, 20-33.
- Capobianchi, M.R., Abbate, I., Antonelli, G., Turriziani, O., Dolei, A., und Dianzani, F. (1998). Inhibition of HIV type 1 BaL replication by MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES in macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 233-240.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., und Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.

- Chen, Z., Li, Y., und Krug, R.M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18, 2273-2283.
- Chesney, J., Bacher, M., Bender, A., und Bucala, R. (1997). The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6307-6312.
- Chesney, J., Metz, C., Stavitsky, A.B., Bacher, M., und Bucala, R. (1998). Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 160, 419-425.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., und Joo, H.S. (2002). Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol* 147, 1209-1220.
- Choi, Y.K., Kim, T.K., Kim, C.J., Lee, J.S., Oh, S.Y., Joo, H.S., Foster, D.N., Hong, K.C., You, S., und Kim, H. (2006). Activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway in swine influenza virus-mediated cell death. *Exp Mol Med* 38, 11-17.
- Colby, C., und Duesberg, P.H. (1969). Double-stranded RNA in vaccinia virus infected cells. *Nature* 222, 940-944.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., und Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Cowper, S.E., und Bucala, R. (2003). Nephrogenic fibrosing dermopathy: suspect identified, motive unclear. *Am J Dermatopathol* 25, 358.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., und Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Ferrari, M., Scalvini, A., Losio, M.N., Corradi, A., Soncini, M., Bignotti, E., Milanesi, E., Ajmone-Marsan, P., Barlati, S., Bellotti, D., und Tonelli, M. (2003). Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods* 107, 205-212.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., und Greaves, M.F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.
- Fletcher, J., und Guiffre, A. (2005). Fibrocytes in atherosclerosis. *ANZ Journal of Surgery* 75(Suppl), A119.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., und Osterhaus, A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-2822.

- Frid, M.G., Brunetti, J.A., Burke, D.L., Carpenter, T.C., Davie, N.J., Reeves, J.T., Roedersheimer, M.T., van Rooijen, N., und Stenmark, K.R. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 168, 659-669.
- Fuchs, C. (2009). Biologische, immunologische und molekulare Eigenschaften neuer Isolate des aviären Influenza A Virus (AIV) in Bayern. In Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Gaidet, N., Cattoli, G., Hammoumi, S., Newman, S.H., Hagemeyer, W., Takekawa, J.Y., Cappelle, J., Dodman, T., Joannis, T., Gil, P., *et al.* (2008). Evidence of infection by H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in healthy wild waterfowl. *PLoS Pathog* 4, e1000127.
- Gambaryan, A., Yamnikova, S., Lvov, D., Tuzikov, A., Chinarev, A., Pazynina, G., Webster, R., Matrosovich, M., und Bovin, N. (2005). Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* 334, 276-283.
- Garcia-Sastre, A., Durbin, R.K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D.E., und Durbin, J.E. (1998). The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* 72, 8550-8558.
- Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., *et al.* (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201.
- Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G., Gong, Y., und Tredget, E.E. (1993). Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* 122, 465-473.
- Gomperts, B.N., und Strieter, R.M. (2007). Fibrocytes in lung disease. *J Leukoc Biol* 82, 449-456.
- Green, H., und Goldberg, B. (1965). Synthesis of collagen by mammalian cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53, 1360-1365.
- Grieder, F.B., und Vogel, S.N. (1999). Role of interferon and interferon regulatory factors in early protection against Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Virology* 257, 106-118.
- Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O., und Sambhara, S. (2007). NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 263-269.

- Haller, O., Frese, M., und Kochs, G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech* 17, 220-230.
- Haller, O., und Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3, 710-717.
- Hartlapp, I., Abe, R., Saeed, R.W., Peng, T., Voelter, W., Bucala, R., und Metz, C.N. (2001). Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 15, 2215-2224.
- Haye, K., Burmakina, S., Moran, T., Garcia-Sastre, A., und Fernandez-Sesma, A. (2009). The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol* 83, 6849-6862.
- Herrler, G., Hausmann, J., und Klenk, H. (1995). Sialic acid as receptor determinant of ortho- and paramyxoviruses In: *Biology of the Sialic Acids* (Rosenberg A (ed)).
- Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H., und Beer, M. (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 136, 200-209.
- Hong, K. (2007). Characterization of human fibrocytes as circulating myofibroblast and adipocyte progenitors. (United States, California, University of California, Los Angeles).
- Horisberger, M.A. (1992). Virus-specific effects of recombinant porcine interferon-gamma and the induction of Mx proteins in pig cells. *J Interferon Res* 12, 439-444.
- Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., und Steinman, R.M. (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 172, 631-640.
- Ito, T., Couceiro, J.N., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., und Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72, 7367-7373.
- Iwasaki, A., und Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- Jones, S.A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175, 3463-3468.
- Katz, J.M., Naeve, C.W., und Webster, R.G. (1987). Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* 156, 386-395.
- Katz, J.M., und Webster, R.G. (1988). Antigenic and structural characterization of multiple subpopulations of H3N2 influenza virus from an individual. *Virology* 165, 446-456.

- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., und Webster, R.G. (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75 (Pt 9), 2183-2188.
- Kochs, G., Garcia-Sastre, A., und Martinez-Sobrido, L. (2007). Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 81, 7011-7021.
- Kohase, M., und Vilcek, J. (1979). Interferon induction with Newcastle disease virus in FS-4 cells: effect of priming with interferon and of virus inactivating treatments. *Jpn J Med Sci Biol* 32, 281-294.
- Kovacs, E.J., und DiPietro, L.A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 8, 854-861.
- Kowal, K.J., und Youngner, J.S. (1978). Induction of interferon by temperature-sensitive mutants of Newcastle disease virus. *Virology* 90, 90-102.
- Kraft, W., und Dürr, U.M. (2005). *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Vol 6. Auflage (Schattauer).
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., und Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.
- Lee, C.W., Swayne, D.E., Linares, J.A., Senne, D.A., und Suarez, D.L. (2005). H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? *J Virol* 79, 11412-11421.
- Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., Flavell, R., und Bottomly, K. (1993). Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol* 151, 6742-6750.
- Li, I.W., Chan, K.H., To, K.W., Wong, S.S., Ho, P.L., Lau, S.K., Woo, P.C., Tsoi, H.W., Chan, J.F., Cheng, V.C., *et al.* (2009). Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Virol* 46, 325-330.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M.G., und Krug, R.M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214, 222-228.
- Lucattelli, M., Cavarra, E., de Santi, M.M., Tetley, T.D., Martorana, P.A., und Lungarella, G. (2003). Collagen phagocytosis by lung alveolar macrophages in animal models of emphysema. *Eur Respir J* 22, 728-734.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G., und Wolff, T. (2002). The influenza A virus NS1

- protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* 76, 11166-11171.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., und Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603.
- Marcus, P.I., Svitlik, C., und Sekellick, M.J. (1983). Interferon induction by viruses. X. A model for interferon induction by Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 64 (Pt 11), 2419-2431.
- Massin, P., Kuntz-Simon, G., Barbezange, C., Deblanc, C., Oger, A., Marquet-Blouin, E., Bougeard, S., van der Werf, S., und Jestin, V. (2010). Temperature sensitivity on growth and/or replication of H1N1, H1N2 and H3N2 influenza A viruses isolated from pigs and birds in mammalian cells. *Vet Microbiol* 142, 232-241.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, P., und Wittmann, G. (1974a). Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration) in: *Virologische Arbeitsmethoden* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart), pp. 35-39.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, P., und Wittmann, G. (1974b). *Virologischen Arbeitsmethoden Vol Band I* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).
- Mayr, A., Herlyn, M., Mahnel, H., Danko, A., Zach, A., und Bostedt, H. (1981). Bekämpfung des Ecthyma contagiosum der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff. *J. Vet. Med. B* 28, 535-552.
- Mehrad, B., Burdick, M.D., Zisman, D.A., Keane, M.P., Belperio, J.A., und Strieter, R.M. (2007). Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 104-108.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y.M., Cardenas, W.B., Gale, M., Jr., und Garcia-Sastre, A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* 81, 514-524.
- Midwood, K.S., Williams, L.V., und Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1031-1037.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., und Tough, D.F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99, 3263-3271.
- Moore, B.B., Kolodsick, J.E., Thannickal, V.J., Cooke, K., Moore, T.A., Hogaboam, C., Wilke, C.A., und Toews, G.B. (2005). CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 166, 675-684.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., und Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.

- Nimphius, W., Moll, R., Olbert, P., Ramaswamy, A., und Barth, P.J. (2007). CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch* 450, 179-185.
- Noursadeghi, M., Bickerstaff, M.C., Gallimore, J.R., Herbert, J., Cohen, J., und Pepys, M.B. (2000). Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14584-14589.
- Nowacki, W., Cederblad, B., Renard, C., La Bonnardiere, C., und Charley, B. (1993). Age-related increase of porcine natural interferon alpha producing cell frequency and of interferon yield per cell. *Vet Immunol Immunopathol* 37, 113-122.
- Oh, D.Y., Barr, I.G., Mosse, J.A., und Laurie, K.L. (2008). MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *J Clin Microbiol* 46, 2189-2194.
- Olsen, C.W. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 85, 199-210.
- Peltonen, J., Hsiao, L.L., Jaakkola, S., Sollberg, S., Aumailley, M., Timpl, R., Chu, M.L., und Uitto, J. (1991). Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA. *J Invest Dermatol* 97, 240-248.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P., und Strieter, R.M. (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114, 438-446.
- Pilling, D., Buckley, C.D., Salmon, M., und Gomer, R.H. (2003). Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol* 171, 5537-5546.
- Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B., und Gomer, R.H. (2009a). Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* 4, e7475.
- Pilling, D., Tucker, N.M., und Gomer, R.H. (2006). Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *J Leukoc Biol* 79, 1242-1251.
- Pilling, D., Vakil, V., und Gomer, R.H. (2009b). Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods* 351, 62-70.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., und West, A.B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-9.

- Rabl, S. (2010). Wildvogelmonitoring in Bayern: Vorkommen und Verbreitung aviärer Influenzaviren von 2007 bis 2009. In Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Robertson, Naeve, Webster, Bootman, Newman, und Schild (1985). Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology* *143*, 166-174.
- Rocha, E.P., Xu, X., Hall, H.E., Allen, J.R., Regnery, H.L., und Cox, N.J. (1993). Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *J Gen Virol* *74* (Pt 11), 2513-2518.
- Rogers, G.N., und Paulson, J.C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* *127*, 361-373.
- Rubinstein, S., Familletti, P.C., und Pestka, S. (1981). Convenient assay for interferons. *J Virol* *37*, 755-758.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* *14*, 778-809, table of contents.
- Schleicher, U., Hesse, A., und Bogdan, C. (2005). Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. *Blood* *105*, 1319-1328.
- Schmidt, M., Sun, G., Stacey, M.A., Mori, L., und Mattoli, S. (2003). Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* *171*, 380-389.
- Schmidt, R.C., Maassab, H.F., und Davenport, F.M. (1974). Infection by influenza A viruses of tracheal organ cultures derived from homologous and heterologous hosts. *J Infect Dis* *129*, 28-36.
- Scholtissek, C., Burger, H., Kistner, O., und Shortridge, K.F. (1985). The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* *147*, 287-294.
- Selbitz, J., Truyen, U., und Valentin-Weigand, P. (2011). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Vol 9., überarbeitete Auflage (Enke Verlag).
- Seo, S.H., Goloubeva, O., Webby, R., und Webster, R.G. (2001). Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol* *75*, 9517-9525.
- Shao, D.D., Suresh, R., Vakil, V., Gomer, R.H., und Pilling, D. (2008). Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* *83*, 1323-1333.

- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., und Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Smith, E.J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A., und Levy, D.E. (2001). IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* 276, 8951-8957.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., und Suarez, D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40, 3256-3260.
- Sugimura, T., Murakami, Y., und Ogawa, T. (2000). The susceptibility of culture cells to avian influenza viruses. *J Vet Med Sci* 62, 659-660.
- Summerfield, A., und McCullough, K. (2009). The porcine dendritic cell family. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 299-309.
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P., und Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 74, 7989-7996.
- Tredget, E.E., Yang, L., Delehanty, M., Shankowsky, H., und Scott, P.G. (2006). Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. *J Interferon Cytokine Res* 26, 179-189.
- Vaage, J., und Lindblad, W.J. (1990). Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 48, 274-280.
- van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M., und Zinkernagel, R.M. (1995). Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J Virol* 69, 4792-4796.
- Van Poucke, S.G., Nicholls, J.M., Nauwynck, H.J., und Van Reeth, K. (2010). Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology* 7, 38.
- Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., und Pensaert, M. (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* 67, 47-52.
- Varcoe, R.L., Mikhail, M., Guiffre, A.K., Pennings, G., Vicaretti, M., Hawthorne, W.J., Fletcher, J.P., und Medbury, H.J. (2006). The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia. *J Thromb Haemost* 4, 1125-1133.
- Virelizier, J.L. (1999). Blocking HIV co-receptors by chemokines. *Dev Biol Stand* 97, 105-109.

- von der Ohe, M., Altstaedt, J., Gross, U., und Rink, L. (2001). Human neutrophils produce macrophage inhibitory protein-1beta but not type I interferons in response to viral stimulation. *J Interferon Cytokine Res* 21, 241-247.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., und Garcia-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* 74, 11566-11573.
- Weber, F., Kochs, G., Haller, O., und Staeheli, P. (2003). Viral evasion of the interferon system: old viruses, new tricks. *J Interferon Cytokine Res* 23, 209-213.
- Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., und Murti, K.G. (1978). Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268-278.
- Wynn, T.A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4, 583-594.
- Yang, L., Scott, P.G., Giuffre, J., Shankowsky, H.A., Ghahary, A., und Tredget, E.E. (2002). Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Lab Invest* 82, 1183-1192.
- Zambon, M.C. (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B, 3-9.
- Zhirnov, O.P., Vorobjeva, I.V., Saphonova, O.A., Malyshev, N.A., Ovcharenko, A.V., und Klenk, H.D. (2007). Specific biochemical features of replication of clinical influenza viruses in human intestinal cell culture. *Biochemistry (Mosc)* 72, 398-408.
- Zhu, Y., Koo, K., Bradshaw, J.D., Sutton, W.F., Kuller, L.R., Bucala, R., Anderson, D., Mossman, S.P., Villinger, F., und Haigwood, N.L. (2000). Macaque blood-derived antigen-presenting cells elicit SIV-specific immune responses. *J Med Primatol* 29, 182-192.

IX. Anhang

1. Genomsequenzen

1.1 Gesamtgenomsequenz des Influenza A Virus A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1

Polymerase Basic 2:

AATATATTCAATATGGAGAGAATAAAAAGAACTGAGAGATTTGATGTGCGCAG
TCTCGCACTCGCGAGATACTGACAAAACCCTGTGGACCATATGGCCATA
ATCAAGAAATATACGTCAGGAAGACAGGAGAAGAATCCTGCTCTTAGGATG
AAATGGATGATGGCAATGAAATATCCGATTACAGCAGACAAAAGAATAATG
GAGATGATCCCTGAAAGAAATGAGCAGGGTCAGACTCTTTGGAGCAAACG
AATGATGCTGGATCAGACAGAGTGATGGTGTACCTCTGGCTGTGACGTGG
TGGAACAGAAATGGACCAACGACAAGTACAGTCCATTATCCAAAAGTCTAT
AAAACCTACTTTGAAAAGGTGCGAAAGGTTAAAGCATGGAACCTTCGGTCCC
GTTCAATTTTCGAAATCAGGTTAAAATACGCCGCAGGGTTGACATAAACCCA
GGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAAGAAGCACAAGATGTCATCATGGAGGTC
GTTTTCCCAAACGAAGTCGGAGCCAGGATATTGACATCAGAGTCACAGTTA
ACAATAACAAAAGAAAAGAAGGAGGAGCTTCAGGACTGTAAAATTGCCCC
TTTGATGGTGGCATAACATGTTGGAAAGAGAAGTTCGTTAAACCAGATT
CCTACCAGTGGCTGGCGGGACAAGCAGCGTGTATATAGAGGTGTTGCACTT
AACCCAAGGGACTTGCTGGGAACAAATGTACACACCGGGAGGGGAGGTGA
GAAATGATGATGTTGATCAGAGTTTAATTATTGCTGCTAGAAATATTGTTAG
GAGAGCAACAGTATCAGCAGACCCGTTGGCTTCGCTCTTGAAATGTGCCA
TAGTACACAAATTGGCGGAATAAGGATGGTAGACATCCTTAGACAAAATCC
AACAGAAGAGCAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGCAATGGGCCTAAGGA
TCAGTTCATCCTTCAGCTTTGGAGGTTTCACTTTCAAAGGACAAGTGGGTC
ATCTGTCAAAGAGAAGAAGAAGTGCTCACCGGCAATCTCCAGACATTGAA
AATAAGAGTGCATGAAGGATATGAGGAATTCACAATGGTCCGGGCGAAGAG
CAACAGCCATTCTAAGGAAAGCAACCAGAAGGCTGATTCAATTGATAGTGA
GTGGAAGAGACGAGCAGTCAATAGCCGAAGCAATCATAGTGGCAATGGTGT
TCTCACAGGAAGACTGCATGATAAAAGCAGTACGAGGTGATTTGAATTTTG
TCAACAGAGCGAACCAGCGGCTAAATCCCATGCATCAACTCCTGAGGCATT
TCCAAAAGGATGCAAAGGTGCTCTTTCAAACCTGGGGAGTTGAACCCATTG
ACAAATGTCATGGGGATGATTGGAATATTACCTGACATGACCCCCAGCACAG
AGATGTCACTAAGAGGAGTGAGAGTCAGTAAAATGGGAGTGGATGAATATT
CAAGTACTGAGAGAGTGGTCGTGAGCATTGATCGCTTCTTGAGGGTCCGAG
ACCAGAGGGGAAATGTGCTCTTGTCTCCTGAAGAGGTTAGTGAAACACAGG
GAACAGAAAAGTTGACGATAACATATTCATCGTCCATGATGTGGGAAATCA
ATGGCCCAGAATCAGTATTAGTTAACACATACCAATGGATCATTAGAAACT
GGGAAACTGTGAAGATTCAGTGGTCCCAAGACCCTACAATGCTATAACAATA
AGATGGAGTTTGAGCCCTTTCAGTCCCTTAGTGCCTAAGGCTGCTAGAGGCCA
GTATAGTGGATTTGTGAGGACACTATTCCAGCAGATGCGTGATGTACTGGG
GACATTTGACACTGTCCAGATAATAAAGCTGCTACCATTTGCAGCAGCCCCA
CCAGAACAGAGTAGGATGCAGTTCTCTTCTCTAACTGTGAACGTAAGGGGT
TCAGGAATGAGAATACTTGTGAGAGGCAACTCCCCTGTGTTCAACTATAAC
AAAGCAACCAAGAGGCTTACAGTCCTTGGAAAGGATGCAGGTGCATTGACA

GAAGATCCAGATGAGGGAACAGCAGGAGTAGAGTCTGCGGTATTAAGAGG
ATTTCTAATTCTGGGCAAGGAAGACAAAAGATATGGACCAGCATTGAGCAT
CAACGAATTGAGCAATCTTGCGAAAGGGGAGAAGGCTAATGTGTTGATAGG
GCAAGGAGACGTGGTGTGGTAATGAAACGGAAACGGGACTCTAGCATACT
TACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTG
TCGAATTGTTTAAA

Polymerase Basic 1:

ACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCGC
AAAATGCTATAAGTACTACATTCCCTTACACTGGAGATCCTCCATACAGCCA
TGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACGGTCAACAGAACACATCAAT
ACTCAGAGAAGGGAAAGTGGACAACAAACACAGAGACCGGAGCACCCCAA
CTCAACCCAATTGATGGACCATTACCTGAGGACAACGAGCCAAGTGGATAT
GCACAAACGGATTGCGTGTGGAAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCAC
CCAGGGATCTTTGAAAACCTTGTCTCGAAACGATGGAAATTGTTTCAGCAA
ACAAGAGTGGACAAACTAACCCAAGGTCCGACACTTATGACTGGACACTG
AATAGAAACCAACCAGCTGCAACTGCTTTGGCCAACACTATAGAGGTCTTC
AGATCGAACGGTCTGACAGCCAATGAATCGGGGAGACTAATAGATTTCCCTC
AAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAAGAAGAGATGGAAATAACAACACA
TTTCCAGAGAAAGAGAAGAGTAAGGGACAACATGACCAAGAAGATGGTCA
CACAAAGAACAATAGGAAAGAAGAAGCAGAGGCTAAACAAGAGGAGCTAC
TTAATAAGAGCACTGACATTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGG
CAAATTGAAGAGGGCGGGCAATTGCAACACCCGGGATGCAAATTAGAGGATT
CGTGTATTTTGTTCGAAACACTGGCGAGGAGCATCTGTGAGAAACTTGAGCA
ATCTGGACTCCCTGTTGGAGGGAATGAGAAGAAGGCTAAATTGGCAAATGT
CGTAAGAAAAATGATGACTAACTCACAAGATACAGAGCTCTCCTTTACAAT
TACTGGAGACAACACCAAATGGAATGAGAATCAAAATCCTCGGATGTTCCCT
GGCAATGATAACATACATCACAAGAAACCAACCTGAATGGTTTLAGAAATGT
CTTGAGCATCGCCCCTATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGATTAGGAAA
AGGATACATGTTTGAAGTAAGAGCATGAAGCTACGGACACAAATACCGGC
AGAAATGCTTGCAAACATTGACTTGAATACTTCAACGAATCAACGAAAAA
GAAAATTGAGAAAATAAGACCTCTGCTAATTGATGGCACAGCCTCATTGAG
TCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTGAGCACAGTGTTAGGAGTC
TCAATCCTGAATCTTGGGCAAAAGAGGTACACCAAGACCACATACTGGTGG
GATGGACTCCAATCCTCTGATGACTTCGCTCTCATAGTGAATGCACCGAATC
ATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTCTATAGGACCTGCAAACCTGG
TTGGGATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCTTACATAAACCGGACAGGGACCT
TTGAGTTCACAAGCTTTTTCTACCGCTATGGGTTTGTAGCCAACCTCAGTAT
GGAATTACCCAGCTTTGGAGTGTCCGGAATCAATGAATCGGCTGACATGAG
CATTGGAGTCACAGTGATAAAGAACAATATGATAAACAATGACCTTGGACC
AGCAACAGCTCAGATGGCTCTTCAGCTATTCGTCAAGGACTATAGGTACAC
CTACCGATGCCACAGGGGCGATACACAAATTCAAACGAGGAGATCATTGGA
GCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAGACCCGCTCAAAGGCGGGGCTGTTGGTATC
AGATGGAGGCCCAAACCTGTACAACATTAGGAATCTCCACATTCCAGAGGT
CTGCTTGAAGTGGGAACTGATGGATGAAGATTACCAGGGCAGGCTGTGTAA
TCCTCTGAATCCGTTTGTTCAGTCATAAGGAAATTGAGTCCGTAAACAATGCT
GTTGTAATGCCAGCCCATGGGCCAGCCAAGAGCATGGAATATGATGCTGTT
GCGACTACACACTCATGGATCCCTAAGAGGAACCGTTCCATTCTCAATACCA
GCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAGCAAATGTATCAGAAGTGCTGCAGTC
TGTTTCGAGAAATTCTTCCCCAGTAGTTCATATAGAAGGCCAGTTGGAATTC

CAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGAATTGATGCACGCATTGA
TTTCGAATCTGGAAGGATTAAGAAAGAAGAGTTTGCTGAGATCATGAAGAT
CTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTGTC
CTTCATGAAAAAATGC

Polymerase Acid:

GATCCAAAATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTCG
AGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGACCCGAAAATCGAG
ACGAACAAGTTTGCTGCGATATGCACACACTTAGAAGTCTGTTTCATGTATT
CGGATTTCCACTTTATTGATGAACGAGGTGAATCAATAATTGTAGAATCGGG
CGATCCGAATGCATTACTGAAACACCGTTTTGAAATAATTGAAGGGAGAGA
CCGAACAATGGCCTGGACAGTGGTGAATAGCATCTGCAACACCACAGGAGT
CGAGAAACCTAAATTTCTCCCTGATTTGTACGACTATAAAGAGAACCGATT
ATTGAAATTGGAGTGACACGGAGGGAAGTCCACATATACTATTTGAAAAA
GCCAACAAGATAAAATCCGAGAAGACACACATTCACATATTCTCATTACC
GGAGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTACACTCTTGACGAAGAGAGTAG
GGCAAGAATCAAACTAGGCTGTTCCTATAAAGGCAAGAAATGGCCAGTAG
GGGTCTATGGGATTCCTTTCGTGAGTCCGAGAGAGGGCGAAGAGACAATTGA
AGAAAGATTTGAAATTACAGGAACCATGCGCAGGCTTGCCGACCAAAGTCT
CCCACCGAACTTCTCCAGCCTTGAAAACCTTTAGAGCCTATGTGGATGGATT
GAACCGAACGGCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTG
AACGCCAGAATTGAGCCATTTCTGAAAACAACACCGCGCCCCCTCAAGTTG
CCTAATGGACCTCTTTGCTCTCAGCGGTGCAAATTCCTTGCTGATGGATGCTC
TTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCATGAGGGGGGAGGGGATACCGCTAT
ATGATGCAATTAATGCATGAAGACATTTTTTCGGCTGGAAAGAGCCCACCA
TCGTAAAGCCACATGAAAAAGGCATAAACCCCAATTACCTCCTGGCTTGGA
AGCAGGTACTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAATCCCA
AGAACAAAGAACATGAAGAAAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTTGGTGA
GAACATGGCACCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGATTGCAAAGATGTTAGTGA
TCTAAGGCAGTATGACAGTGATGAACCAGAGTCTAGATCGCTAGCAAGCTG
GATCCAGAGTGAATCAACAAGGCATGCGAATTGACAGACTCAAGTTGGAT
TGAGCTAGATGAAATAGGAGAGGACATTGCTCCAATTGAGCACATTGCAAG
TATGAGAAGAAATTTTACGGCAGAAGTATCCCATTGCAGAGCTACTGA
ATACATAATGAAGGGAGTGTACATGAACACAGCCTTGTTGAATGCATCCTG
TGCAGCCATGGATGACTTCCAATTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAAC
CAAAGAAGGAAGACGGAAAACCAACCTATACGGATTCATTATAAAAGGAA
GATCCCCTTGAGAAATGACACTGATGTGGTAAACTTTGTGAGTATGGAATT
CTCTCTTACTGACCCGAGGTTGGAGCCACACAAATGGGAAAAGTACTGCGT
TCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTACGGACTGCAATAGGCCAGGTGTCAAG
GCCCATGTTCTGTATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAA
ATGGGGTATGGAAATGAGACGATGCCTTCTTCAATCCCTTCAGCAGATTGA
GAGCATGATTGAGGCTGAGTCTTCTGTCAAAGAGAAGGACATGACCAAAGA
ATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAAAGG
GGTGGAGGAAGGCTCTATCGGGAAGGTGTGCAGAACCTTATTAGCAAATC
TGTGTTCAACAGTCTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTCTCAGCTGAA
TCAAGAAAATTGCTTCTCATTGTTTCAGGCACTTAGGGATAACCTGGAACCTG
GGACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTA
ATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACACAT
GCACTGAAATAGTTGTGGCAATGCTACTATTTACTATCCATACTGTCCAAAA
AAACAA

Hämagglutinin:

ACAGTCCCTCAAATCAAATCAATCAAGATGGAAGCAAACACTACTCGTATT
ATTCTGCATGTTCACTGCATTAAGCCGATACCATCTGTATAGGCTACCAT
GCAAACAATTCTACAGACTATCGACACAGTGCTAGAGAAGAATGTAAC
GTGACTCACTCAGTTAATTTACTCGAAGACAATCATAATGGAAAACCTCTGCA
ACCTGAACGGAATAGCCCCATTACAGCTAGGGAAATGCAACGTTGCGGGGT
GGCTCCTCGGCAACCCGGAATGTGACCTGCTGCTCACTGCGAATTCATGGTC
CTATATAATAGAACTTCAAATTCAGAAAATGGAACATGCTACCCCGGGGA
ATTCATCGATTATGAAGAATTGAGAGAACAATAAGTTCAGTGTCTTCATTT
GAGAAATTTGAGATTTTCCCGAAGGCAAACCTCGTGGCCAAATCATGAGACA
ACCAAAGGTGTCACAGCTGCATGCTCTTACTCTGGAGCTAGCAGTTTTTATC
GAAATTTGCTATGGATAACAAGAAGGGAACTTCCTATCCTAAACTCAGTA
AATCATAACAAACAACAAGGGAAAAGAAGTGCTTGTACTTTGGGGAGTGC
ATCATCTCCAACACTACAAATGAACAGCAAACACTCTATCAGAATACTGATG
CATATGTTTCAGTTGGGTCATCAAATAACAACCGGAGATTCACACCTGAAAT
AGCTGCCAGACCTAAAGTCAGAGGGCAAGCGGGTAGGATGAATTATTATTG
GACACTATTGGATCAGGGAGACACAATAACCTTTGAAGCAACTGGGAATTT
AATAGCACCATGGTATGCTTTTGCCTAAACAAGGGTTCTGATTCTGGTATT
ATAACATCAGATGCTCCAGTTCATAATTGTGACACAAAATGCCAAACCCCTC
ATGGTGCTATTAACAGTAGTCTCCCTTCCAGAATGTGCATCCCATCACTAT
TGGAGAGTGCCCTAAATATGTTAAAAGCACCAAACCTAAGGATGGCAACAGG
CCTGAGAAACATTCCCTTCCATTCAATCTAGAGGACTCTTCGGTGCAATTGCT
GGGTTCATTGAAGGGGGATGGACAGGAATGATAGATGGGTGGTATGGGTAT
CATCATCAGAATGAGCAAGGGTCTGGTTATGCAGCTGATCAGAAGAGCACA
CAAATGCAATCGACGGGATAATCAACAAGGTGAATTCAGTAATTGAGAAG
ATGAACACTCAATTCAGTGCAGTGGGTAAGGAGTTCAACAATCTGGAAAGG
AGAATTGAGAATCTGAATAAGAAGGTTGACGATGGATTTCTGGATGTTTGG
ACATACAATGCAGAATTGCTTGTCTGCTCGAGAATGAAAGGACCTTGGATT
TCCATGACTCCAATGTGAGGAATCTGTATGAAAAGGTCAAATCACAGCTGA
GGAATAATGCCAAAGAGATTGGGAATGGGTGCTTCGAGTTCTACCACAAAT
GTGATGACGAGTGCATGGAGAGTGTGAAGAATGGCACATATGACTATCCTA
AGTACTCAGAGGAGTCCAAACTGAACAGAGAAGAAATAGGCGGGGTAAAA
TTGGAATCAATGGGGGTTTACCAGATTTTGGCGATTTACTCCACAGTCGCCA
GCTCTCTGGTCTTGTTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTTTGGATGTGTTCT
AATGGATCATTGCAATGCAGAATATGCATTTAGAAGTGGGATTTTAAATTAT
ATGGA AAAACAAGGCATNTCAGNGCCAGGCAGGGA

Nucleoprotein:

GATAATCACTCACTGAGTGACATCAACATCATGGCGTCTCAAGGCACCAA
CGATCTTATGAACAGATGGAACTAGTGGAGAACGCCAGAATGCCACTGAG
ATCAGAGCATCTGTTGGAAGAATGGTTGGTGGAAATTGGGAGATTTTATATA
CAGATGTGCACTGAACTCAAACCTCAGCGACTATGAAGGAAGGCTGATTCAG
AACAGCATAACAATAGAGAGAATGGTTCTCTCCGCATTTGATGAAAGGAGG
AACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGTGCTGGGAAAGACCCAAAGAAGAC
TGGAGGTCCAATTTATCGAAGGAGAGACGGGAAATGGATGAGAGAACTGA
TTCTGTATGACAAAGAGGAGATCAGAAGGATCTGGCGTCAAGCGAACAAATG
GAGAAGACGCAACTGCTGGTCTCACTCACCTGATGATCTGGCATTCCAACCT
AAATGATGCCACATAACCAGAGAAGTACTAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGA
CCCCAGAATGTGCTCTCTGATGCAAGGATCAACTCTCCCAAGGAGATCTGG

AGCCGCTGGTGCAGCAGTAAAGGGAGTCGGAACGATGGTGATGGAACATAAT
TCGGATGATAAAGCGAGGGATTAATGATCGGAATTTCTGGAGAGGCGAAAA
CGGACGAAGGACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATTCTCAAAGG
GAAATTCCAAACAGCAGCACAAAGAGCAATGATGGACCAGGTGCGAGAAA
GCAGAAATCCTGGGAATGCTGAAATTGAAGATCTCATCTTTCTGGCACGATC
TGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCCCACAAGTCCTGCTTGCCTGCTTGT
GTGTATGGACTTGCTGTGGCCAGTGGATATGACTTTGAGAGAGAAGGGTAC
TCTCTAGTTGGAATAGATCCTTTCCGTCTGCTTCAAACAGCCAGGTCTTCA
GTCTTATTAGACCAAATGAGAATCCTGCACACAAGAGTCAATTGGTGTGGA
TGGCATGCCATTCTGCAGCATTGGAAGACCTGAGAGTCTCAAGTTTTATCAG
AGGGACAAGAGTAGTTCCAAGAGGACAACACTATCCACCAGAGGAGTTCAAAT
TGCTTCAAATGAGAACATGGAAACAATGGACTCCAGCACTCTTGAACATAAG
AAGCAGATATTGGGCTATAAGAAGTAGAAGCGGAGGGAACACCAACCAAC
AGAGAGCATCTGCAGGACAAATCAGTGTACAGCCTACTTTCTCAGTACAGA
GGAATCTTCCCTTCGAAAGAGCAACCATTATGGCAGCATTACAGGGGAATA
CAGAGGGAAGAACATCTGACATGAGGACTGAAATCATAAGAATGATGGAG
AGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTC
TCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAAT
GAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAAGA
AAACAA

Neuraminidase:

AATGAATCCAAATCAAAGATAATAACCATTGGATCAATCTGTATGGTAAT
TGGAATAGTCAGTTTGATGTTACAAATTGGGAATATAATCTCAATATGGGTT
AGTCATTCAATCCAGACAGGGAATCAGCACCAGCCTGAACCGTGCAATCAA
AGCATCATTACTTATGAAAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTCAAC
ATCAGTAATAACCAATTTTCTTACTGAGCAAGCTGTGGTTTCAGTGACATTAG
CGGGTAATGCATCTCTTTGCCCAATTAGTGGATGGGCTATATACAGTAAGGA
CAACGGTATAAGAATTGGTTCCAAGGGGATGTGTTTGTATAAGGGAGCC
ATTCATCTCATGTTCTCATTTAGAATGCAGAACCTTCTTTTACTCAGGGA
GCCCTGTTGAATGATAAGCACTCTAACGGGACCGTCAAAGATAGAAGCCCT
TATAGGACCTTGATGAGTTGTCCTGTGGGTGAGGCTCCTTCCCATATAACT
CAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTATGACGGCATTAG
TTGGTTGACAATTGGGATCTCTGGCCAGACAATGGGGCCGTGGCTGTATTG
AAATACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATA
CTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAAATGGTTCTTGCTTTACTG
TGATGACCGACGGACCAAGCAACGGACAGGCCTCATATAAAATTTTCAAGA
TAGAAAAGGGAAAGTAGTTAAATCAGTCGAATTGAATGCCCTAATTACC
ACTACGAAGAGTGCTCCTGTTATCCGGATGCGGGCGAAATCATATGTGTGT
GTAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCCGTGGGTATCTTTCAACCAA
ATTTGGAGTATCAAATAGGGTATATATGTAGTGGAGTTTTCGGAGACAATCC
ACGCCCCAATGATGGAACGGGCAGTTGCGGTCCTGTGTCCTCTAATGGAGC
ATACGGAGTAAAAGGGTTCTCATTTAAATACGGCAATGGTGTGGATCGG
GAGAACCAAAAGCACTAGTTCCAGGAGCGGCTTTGAAATGATCTGGGATCC
AAATGGGTGGATTGAAACGGACAGTAGCTTCTCAGTGAACAAGATATCGT
AGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCACCCAGA
ATTGACCGGGTTAGATTGCATGAGACCTTGTCTTCTGGGTGGAGCTAATCAGA
GGGCGGCCCAAAGAGAATAACAATTTGGACCAGTGGGAGCAGCATATCCTTT
TGTGGTGTAAATAGTGACACTGTAGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGT
TGCCATTCACCATTGACAAGTAGTTTGTTCAAAAACTCCACTT

Matrixprotein:

ATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCGT
CCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTT
TGCAGGGAAAAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAG
ACCAATCCTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACGCTC
ACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCC
CTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTCAAAGTGT
CAGGAAGTTGAAAAGAGAGATAACATTCCATGGGGCTAAAGAAGTTGCACT
CAGCTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGTATGGGTCTCATATACAACAGG
ATGGGAACGGTGACCACAGAAGTGGCTTTTGGCCTGGTATGTGCCACCTGT
GAGCAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCCACAGGCAGATGGTAACTACC
ACCAATCCACTAATCAGACATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACTACG
GCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCTGGGTCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGC
CATGGAGGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCGATGAGGACAAT
TGGGACTCACCTAGCTCCAGTGCCGGTCTGAAAGATGATCTCCTTAAAAAT
TTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATGCAGCGATTCAAGTGA
TCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGG
ATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGTATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTT
GAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAGT
ATCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCA
ACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGT

Nichtstrukturprotein:

AGCAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCT
TTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGA
ACTGGGTGATGCCCCATTCCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTA
AGAGGAAGAGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCTACTCGTGCG
GGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAAGAATCTGATGAGGCACTT
AAAATGACTATTGCTTCAGTGCCGGCTTCACGCTACCTAACTGACATGACTC
TTGAAGAGATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCAAGCAGAAAGTGG
CAGGTTCCCTTTGCATCAGAATGGACCAAGCAATAATGGATAAAAAACATCA
TATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTGATTTTGGACCGACTAGAAACCCTAATACT
ACTTAGAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATTGTGGGAGAAATCTCACCGTT
ACCTTCTCTTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTC
CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACT
CTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACCTCCACTC
CCTCCAAAGCAGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTG
AAGAAATAAGATGGCTGATTGAAGAAGTGAGACATAGATTGAAGATTACA
GAGAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACCTATTGCTTG
AAGTGGAGCAAGAGATAAGAACTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAA
AAACACCCTTGTTTCTACT

1.2 Sequenzen Schweineinfluenza H1N1 140

H1 for 907 bp

GATGTGACAGTTACACACTCAGTCAACCTACTAGAGGACAGTCACAATGGG
AAATTATGTAGACTGAAAGGAATAGCCCCATTACAATTGGGGAAATGCAGC
ATTGCTGGATGGATCTTGGGGAACCCAGAATGTGAGTCACTATTTTCTAAGA
AATCATGGTCCTATATTGCAGAAACAACAATTCTGAAAATGCAATATGTT
ACCCAGGGTATTTCTCCGACTACGAGGAGTTAAGGGAGCAATTGAGTTCAG
TATCATCATTCGAGAGATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGTTCATGGCCCA
AACACAGCGTAAACAAAGGAGTAACTGCATCATGCTCCCACAAAGGGAAC
AGCAGTTTTTACAAAAACCTGCTATGGCTAACGGAGAAAAATGGCATTTC
CCAAATCTGAGCAAGTCTTATGTAAACAACAGAGATGAAGAAGTCCTTGTG
TTATGGGGTGTTTCATCACCCGTCTAATATAGAGGATCAAAGGGCCATATACC
GTAAAGAAACTGCTTATGTTTCTGTAGTGTCTCACACTACAACAAGAGGTT
TATCCCAGAAATTGCAAAAAGACCCAAAGTAAGGAATCAAGAAGGGAGAA
TTAACTACTACTGGACTCTACTAGAACCCAAGGACACAATAATATTTGAAG
CAAATGGAAATTTAATAGCGCCATGGTATGCTTTTGCAGTGTAGAGGCTT
TGAGTCAGGAATCATCGTATCAAATGCATCAGTGGATGAGTGTGACACGAA
GTGTCAAACCCCCGGGGGGCAATAAACAGCAGCCTCCCTTCCAGAATGT
ACATCCAGTAACAATAGGAGAATGCCCAAAGTACGTCAGGAGTAAAAAATT
AAGGATGGTTACAGGACTAAAGAAC

H1 rev 957 bp

AGAAGGAATGTTCCCTTAGTCCTGTAACCATCCTTAATTTTTTACTCCTGACGT
ACTTTGGGCATTCTCCTATTGTTACTGGATGTACATTCTGGAAAGGGAGGCT
GCTGTTTATTGCCCCCCGGGGGGTTTGACACTTCGTGTCACACTCATCCACT
GATGCATTTGATACGATGATTCCTGACTCAAAGCCTCTACTCAGTGCAAAAG
CATAACATGGCGCTATTAATTTCCATTTGCGTCAAATATTATTGTGTCCTTG
GGTTCTAGTAGAGTCCAGTAGTAGTTAATTCTCCCTTCTTGATTCTTACTTT
GGGTCTTTTTGCAATTTCTGGGATAAACCTCTTGTTGTAGTGTGAGGACACT
ACAGAAACATAAGCAGTTTCTTTACGGTATATGGCCCTTTGATCCTCTATAT
TAGACGGGTGATGAACACCCCATACACAAGGACTTCTTCATCTCTGTTGTT
TACATAAGACTTGCTCAGATTTGGGTAAATGCCATTTTTCTCCGTTAGCCAT
AGCAGGTTTTTGTA AAAACTGCTGTTCCCTTTGTGGGAGCATGATGCAGTTA
CTCCTTTGTTTACGCTGTGTTTGGGCCATGAACTTTCTTTGGGGAATATTTCC
AATCTCTCGAATGATGATACTGAACTCAATTGCTCCCTTAACTCCTCGTAGT
CGGAGAAATACCCTGGGTAACATATTCCATTTTCAGAATTCGTTGTTTCTGC
AATATAGGACCATGATTTCTTAGAAAATAGTGAATCATTCTGGGTTCCCC
AAGATCCATCCAGCAATGCTGCATTTCCCAATTGTAATGGGGCTATTCCTT
TCAGCCTACATAATTTCCCATTTGTGACTGTCCTCTAGTATGTTGACTGAGTGT
GTA ACTGTCACATTCTTCTCGAGGGACTGTGTCAACA

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Punktediagramm: Als Negativkontrolle wurden primäre porcine Fibrozyten nur mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern inkubiert	55
Abb. 2: Histogramm: Als Negativkontrolle wurden primäre porcine PBMC nur mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 633 (x-Achse) inkubiert; der Marker (Balken; neg.) wurde auf die Alexa Fluor 633 negativen Zellen gesetzt und als Hintergrundrichtwert benutzt.....	57
Abb. 3: PA und NA PCR.....	59
Abb. 4: Schweineinfluenzasubtypisierung der Proben 114, 127 und 140.....	61
Abb. 5a: Wachstumsstadien von primären porcinen Fibrozyten	63
Abb. 5b: Wachstumsstadien von primären porcinen Fibrozyten	64
Abb. 6: Primäre porcine Fibrozyten (14 Tage in Kultur) nach Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) im Punktediagramm (dot plot) mit einem Gate um die Hauptpopulation (88,42 %).	65
Abb. 7: Histogramm: Nachweis von Anti-MHC Klasse I Antigen auf primären porcinen Fibrozyten	66
Abb. 8: Punktediagramm: Primäre porcine Fibrozyten markiert mit Anti-SWC-3 (y-Achse) und Anti-MHC Klasse II (x-Achse) Antikörpern.....	67
Abb. 9: Punktediagramm: Primäre porcine Fibrozyten markiert mit Anti-CD 14 (y-Achse) und Anti-MHC Klasse II (x-Achse) Antikörpern.....	68
Abb. 10: Histogramm: Intrazelluläre Markierung primärer porciner Fibrozyten mit humanen Anti-Kollagen Typ I Antikörpern	69
Abb. 11a: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten	75
Abb. 11b: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten	76
Abb. 12: Immunhistologische Färbung von primären porcinen Fibrozyten	77
Abb. 13: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zellkulturüberständen von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden.....	81
Abb. 14: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zelllysaten von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden	82
Abb. 15: Virusgenomnachweis für die verschiedenen Virussubtypen (n= 3) in Zellkulturüberständen von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb) nach Initialinokulation MOI 0,1 über ein Zeitintervall von 72 Stunden...	83
Abb. 16: Durchschnittliche Anzahl an IFN- α spezifischen Spots (y-Achse) nach der Stimulation von porcinen PBMC mit den angegebenen Viren (x-Achse).....	86
Abb. 17a: IFN- α spezifische Spots nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Virussubtypen	87
Abb. 17b: IFN- α spezifische Spots nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Virussubtypen	88
Abb. 18: Durchschnittliche Anzahl an IFN- α spezifischen Spots (y-Achse) nach der Stimulation von primären porcinen Fibrozyten (10-21 Tage in Kultur) mit den angegebenen Viren (x-Achse).....	89
Abb. 19: Anzahl IFN- α spezifischer Spots (y-Achse) von porcinen PBMC und primären porcinen Fibrozyten (Fb, 10-21 Tage in Kultur) unabhängig vom eingesetzten Virusstimulus	90

Abb. 20: Anzahl IFN- α spezifische Spots von porcinen PBMC und daraus kultivierten primären porcinen Fibrozyten (Fb, 10-21 Tage in Kultur) induziert durch die unterschiedlichen Stimuli.....	92
Abb. 21: Vergleich der Sekretion von antiviralen Substanzen durch porcine PBMC und primäre porcine Fibrozyten Stimulus unabgänglich, HAE.....	94
Abb. 22: Vergleich der Sekretion von VSV-antiviral wirksamen Substanzen durch porcine PBMC und primäre porcine Fibrozyten, durch verschiedene Stimuli. HAE	95

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Expression auf primären humanen Fibrozyten in vitro	9
Tab. 2: Proteine, die von primären humanen Fibrozyten produziert und sezerniert werden.....	11
Tab. 3: Replikationsfähigkeit von Influenza Viren in verschiedenen Schweinezellen..	23
Tab. 4: Antikörper für IFN- α ELISPOT	25
Tab. 5: Antikörper für Immunhistologie.....	26
Tab. 6: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie	26
Tab. 7: Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie	26
Tab. 8: Verwendete Laborvirusstämme	27
Tab. 9: Verwendete Feldvirusisolate.....	27
Tab. 10: Primer für die Subtypisierung der Schweineinfluenzavirusisolate.....	28
Tab. 11: Primer für die Sequenzierung von A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1.....	28
Tab. 12: Primer für die panInfluenza RT-qPCR	29
Tab. 13: Primer für die interne Kontroll-RNA (IC2).....	29
Tab. 14: Sonden für die panInfluenza RT-qPCR	30
Tab. 15: Reaktionsgemisch 1 für Reverse Transkription.....	42
Tab. 16: Reaktionsgemisch 2 für Reverse Transkription.....	42
Tab. 17: Thermalprofil der H1-PCR für Schweineinfluenza Subtypisierung.....	44
Tab. 18: Reaktionsgemisch für Schweineinfluenza Subtypisierung.....	44
Tab. 19: Thermalprofil der PA/NA-PCR.....	45
Tab. 20: Reaktionsgemisch für PA/NA-PCR.....	45
Tab. 21: Thermalprofil für die panInfluenza RT-qPCR nach Spackman et al. (2002)..	46
Tab. 22: Reaktionsgemisch für die panInfluenza RT-qPCR.....	47
Tab. 23: Eingesetzte Induktoren zur Sekretion antiviraler Substanzen	51
Tab. 24: Influenza A Virusgenomnachweis der Schweineproben in der panInfluenza-RT-qPCR.....	59
Tab. 25: Eingesetzte Virussubtypen.....	62
Tab. 26: Infektionstiter der Influenza A Virusisolate in MDCK Zellen	70
Tab. 27: Replikation und Genomnachweis von Influenza A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in MDCK Zellen	71
Tab. 28: Zellzerstörung (cpE) durch Influenza A Virusisolate in primären porcinen Fibrozyten, MOI 1	73
Tab. 29: Zellzerstörung durch Influenza A Virusisolate in primären porcinen Fibrozyten, MOI 0,1	73
Tab. 30: Immunhistologische Färbung primärer porciner Fibrozyten (ca. 10^5 Zellen) .	74
Tab. 31: Virustiter des aviären Influenza A Virus A/Mallard/Bavaria/185-8/2008 H1N1 in den verschiedenen Zellen.....	79

Tab. 32: Im IFN- α ELISPOT eingesetzte Stimuli.....	84
Tab. 33: Eingesetzte Induktoren zur Sekretion antiviraler Substanzen durch Fibrozyten und PBMC	93

X. Danksagung

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner für die sehr gute Betreuung und Unterstützung bei der Entstehung dieser Doktorarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Heike Lang und Susanne Gellert für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und ihre Geduld.

Vielen Dank an Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter für seine Funktion als Doktorvater und die Vertretung der Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Pöllert und die Mitarbeiter des Schlachthofs München für ihre Hilfe bei der Gewinnung des Schweinebluts.

Vielen Dank an Dr. Armin Saalmüller und für die Bereitstellung der Antikörper gegen porcine Zelloberflächenantigene und Dr. Roland Zell, für die Sequenzierung der aviären Influenza A Virussubtypen. Auch möchte ich Francois Lefèvre vom französischen Institut INRA für seine Aushilfe mit dem ELISPOT-Antikörper danken.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz danke ich für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der Veterinärvirologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für ihre Hilfe und Unterstützung.

Frau Katharina Schneider danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Mitstreiter Daniela und Eva: Ohne Euch wäre es nur halb so lustig und viel schwerer gewesen!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, Eike und meinen Freunden dafür danken, dass sie meine Launen während dieser Zeit ertragen, mich unermüdlich unterstützt und an mich geglaubt haben. Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das alles ermöglicht haben und an meinen Bruder Florian: ohne

dich wäre ich im Formatierchaos untergegangen. Eike, danke für die vielen kleinen und großen Aufmunterungen.