

**Molekulare Mechanismen der Adaptation
sowie Impfstudien zur Bekämpfung
von aviären Influenza-A-Viren**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Jana Hundt

geboren am 14.12.1980

in Stralsund

Greifswald, 22.12.2010

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser.....

1. Gutachter : Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter.....

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Zell.....

Tag der Promotion: 25.05.2011.....

"Success consists of getting up just one more time than you fall."

Oliver Goldsmith

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Taxonomie und Nomenklatur von Influenza-Viren.....	- 1 -
1.2 Influenza-A-Viren.....	- 2 -
1.3 Infektionszyklus.....	- 4 -
1.3.1 Adsorption, Internalisierung, Uncoating.....	- 4 -
1.3.2 Transkription und Replikation der viralen RNA.....	- 5 -
1.3.3 Assemblieren und Freisetzung der Viruspartikel.....	- 7 -
1.3.4 Proteolytische Aktivierung des Haemagglutinins.....	- 8 -
1.4 Genetische Variabilität	- 11 -
1.5 Pathogenese und Wirtsspektrum.....	- 12 -
1.6 Virulenzfaktoren	- 14 -
1.6.1 Die Oberflächenproteine HA und NA.....	- 15 -
1.6.2 Die Polymeraseuntereinheiten.....	- 16 -
1.6.3 Das Nukleoprotein.....	- 18 -
1.6.4 Das Nicht-Strukturprotein NS1.....	- 18 -
1.6.5 PB1-F2	- 19 -
1.7 Interaktionspartner der viralen Ribonukleoprotein-Komplexe.....	- 21 -
1.7.1 Virale Interaktionspartner	- 21 -
1.7.2 Zelluläre Interaktionspartner	- 21 -
1.8 Reverse Genetik.....	- 24 -
1.9 Therapie und Prophylaxe	- 26 -
1.9.1 Antivirale Substanzen	- 26 -
1.9.2 Impfstoffe.....	- 27 -
1.9.2.1 Inaktivierte Impfstoffe	- 27 -
1.9.2.2 Lebendimpfstoffe	- 28 -
1.9.2.3 Vektor-Impfstoffe	- 29 -
1.9.2.4 Universelle Influenza-Vakzine.....	- 30 -
1.9.2.5 Impfstoffe gegen Aviäre Influenza	- 30 -
1.9.3 RNA-Technologie	- 32 -
1.10 Zielstellung	- 33 -
2. Material	- 34 -
2.1 Versuchstiere	- 34 -
2.2 Zelllinien.....	- 34 -
2.3 Virusstämme	- 34 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.4	Revers-genetische und Rekombinante Viren.....	- 34 -
2.5	Bakterien.....	- 36 -
2.6	Kits.....	- 36 -
2.7	Enzyme	- 36 -
2.8	Antibiotika	- 37 -
2.9	Antikörper und Seren.....	- 37 -
2.10	Molekulargewichtsstandards	- 37 -
2.11	Plasmide und Nukleinsäuren	- 38 -
2.12	Primer.....	- 38 -
2.12.1	Primer für die universelle Klonierung von Influenza-A-Gensegmenten ..	- 38 -
2.12.2	Primer für die Genotypisierung von Influenza-A-Viren	- 38 -
2.12.3	Primer für die Sequenzierung von Influenza-A-Gensegmenten und Plasmiden	- 39 -
2.12.4	Mutagenese-Primer	- 41 -
2.12.5	Primer für die quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	- 43 -
2.13	Chemikalien	- 43 -
2.14	Medien Puffer und Lösungen.....	- 45 -
2.14.1	Bakteriologische und molekulargenetische Arbeiten.....	- 45 -
2.14.2	Zellkultur-Arbeiten.....	- 46 -
2.14.3	Biochemische Arbeiten	- 48 -
2.15	Gebrauchsmaterialien	- 50 -
2.16	Geräte.....	- 51 -
2.17	Bioinformatik.....	- 52 -
3.	Methode.....	- 53 -
3.1	Molekulargenetische Methoden.....	- 53 -
3.1.1	RNA-Methoden.....	- 53 -
3.1.1.1	RNA-Isolierung aus Allantoisflüssigkeit oder Zellkulturüberstand ..	- 53 -
3.1.1.2	RNA-Isolierung aus Tupferproben	- 53 -
3.1.1.3	Reverse Transkription	- 53 -
3.1.1.4	OneStep-RT-PCR.....	- 53 -
3.1.1.5	Quantitative real-time RT-PCR.....	- 54 -
3.1.2	DNA-Methoden.....	- 55 -
3.1.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur	- 55 -
3.1.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	- 55 -
3.1.2.3	Präzipitation von DNA.....	- 55 -
3.1.2.4	Endonukleolytische Spaltung von DNA-Molekülen	- 55 -

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	- 56 -
3.1.2.6	Gelextraktion	- 56 -
3.1.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktions-Ansätzen	- 56 -
3.1.2.8	Sequenzierung	- 56 -
3.1.2.9	Amplifikation von Influenza-A-Gensegmenten	- 57 -
3.1.2.10	Klonierung von Influenza-A Gensegmenten mittels QuickChange-Reaktion	- 57 -
3.1.2.11	QuickChange-Mutagenese	- 59 -
3.1.2.12	Einfügen von Punktmutationen in das PB1-Plasmid	- 59 -
3.1.2.13	Herstellung der <i>Strep</i> -getaggtten PB2-Plasmide	- 60 -
3.1.2.14	Klonierung von HA-getaggttem PA	- 61 -
3.1.2.15	Einfügen einer Elastase-Spaltstelle in das Haemagglutinin des R65-Virus	- 61 -
3.1.2.16	Genotypisierung von Viren	- 62 -
3.1.3	Kultivierung von Bakterien	- 62 -
3.1.4	Konservierung von Bakterien	- 62 -
3.1.5	Transformation von Bakterien	- 62 -
3.2	Zellkultur und virologische Methoden	- 62 -
3.2.1	Passage und Kultivierung von Zellen	- 62 -
3.2.2	Infektion von Zellen	- 63 -
3.2.3	Transiente Transfektion von Zellen	- 63 -
3.2.4	Herstellung rekombinanter Viren mittels reverser Genetik	- 63 -
3.2.4.1	Suspensions-Rescue	- 64 -
3.2.4.2	Mischkultur-Rescue	- 64 -
3.2.5	Rescue der R65-E-Mutante	- 64 -
3.2.6	Bestimmung des Virustiters	- 65 -
3.2.6.1	Haemagglutinations-Test	- 65 -
3.2.6.2	Plaquetest	- 65 -
3.2.6.3	Zellkultur infektiöse Dosis 50	- 66 -
3.2.7	Berechnung der Multiplizität der Infektion	- 66 -
3.2.8	Wachstumskinetik	- 66 -
3.2.9	Virus-Anzucht	- 67 -
3.2.9.1	Anzucht auf Zellkultur	- 67 -
3.2.9.2	Anzucht in embryonierten Hühnereiern	- 67 -
3.2.10	Plaquereinigung	- 68 -
3.2.11	Aufreinigung von Virionen durch Ultrazentrifugation	- 68 -
3.2.12	Reversionsexperiment	- 68 -

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Biochemische Methoden.....	- 69 -
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten	- 69 -
3.3.2	Herstellung von Zellextrakten	- 69 -
3.3.3	Aufreinigung viraler RNP-Komplexe durch Affinitätschromatographie..	- 69 -
3.3.4	Trichloressigsäure-Fällung.....	- 70 -
3.3.5	Proteinbestimmung.....	- 70 -
3.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 71 -
3.3.7	Western-Blot	- 71 -
3.3.8	Unspezifisches Anfärben von Proteinen	- 72 -
3.3.8.1	Silberfärbung.....	- 72 -
3.3.8.2	Coomassie-Färbung.....	- 72 -
3.3.9	Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie	- 72 -
3.3.10	Immunfluoreszenz.....	- 72 -
3.3.11	Polymerase-Assay	- 73 -
3.3.12	PA-Bindungsstudie mittels ELISA	- 73 -
3.4	Durchführung und Auswertung der Tierversuche im Huhn	- 74 -
3.4.1	Infektion der Versuchstiere	- 74 -
3.4.1.1	Okulonasale Infektion	- 74 -
3.4.1.2	<i>In ovo</i> Infektion	- 74 -
3.4.2	Charakterisierung von R65-E <i>in vivo</i>	- 74 -
3.4.2.1	Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach okulonasaler Applikation	- 74 -
3.4.2.2	Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach <i>in ovo</i> Applikation.....	- 75 -
3.4.3	Klinische Beurteilung der Versuchstiere.....	- 76 -
3.4.4	Gewinnung von Tupferproben	- 77 -
3.4.5	Gewinnung von Blut- und Serumproben	- 77 -
3.4.6	Pathomorphologische Untersuchungen.....	- 77 -
3.4.6.1	Sektion.....	- 77 -
3.4.6.2	Histologie	- 77 -
3.4.7	Immunologische Untersuchungen.....	- 78 -
3.4.7.1	Antikörpernachweis durch Haemagglutinations-Hemmtest	- 78 -
3.4.7.2	Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenz	- 79 -
3.4.7.3	FACS-Analyse	- 79 -
4.	Ergebnisse	- 81 -
4.1	Klonierung von Influenza-A-Viren	- 81 -
4.1.1	Klonierung des Hk68-Virus	- 81 -

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.2	Klonierung des Seal80-Virus	- 81 -
4.1.3	Klonierung des R65-Virus	- 82 -
4.2	Generierung getaggtter Viren	- 83 -
4.2.1	Einfügen eines <i>Strep</i> -tag am PB2-N-Terminus.....	- 84 -
4.2.2	Einfügen eines <i>Strep</i> -tag am PB2-C-Terminus.....	- 85 -
4.3	In-vitro Charakterisierung der <i>Strep</i> -getaggtten Viren	- 86 -
4.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz	- 86 -
4.3.2	Wachstumskinetiken	- 89 -
4.3.3	Western-Blot	- 91 -
4.4	Aufreinigung von viralen Ribonukleoprotein-Komplexen.....	- 93 -
4.5	Einfluss von Punktmutationen im PB1 auf die Polymerase-Aktivität.....	- 96 -
4.5.1	Herstellung der PB1-Mutanten.....	- 97 -
4.5.2	Polymerase-Reporter-Assay.....	- 97 -
4.5.3	Herstellung der PB1-Virusmutanten und Wachstumskurven	- 100 -
4.5.4	Untersuchung der PA-Bindungsaffinität.....	- 101 -
4.6	Herstellung einer Elastase-abhängigen Spaltstellenmutante eines HPAIV H5N1	- 103 -
4.7	Charakterisierung der R65-E-Mutante <i>in vitro</i>	- 104 -
4.7.1	Charakterisierung der Spaltstellenmutante durch Plaquetest.....	- 104 -
4.7.2	<i>In vitro</i> Replikationsverhalten der Spaltstellenmutante	- 104 -
4.7.3	Nachweis der Spaltbarkeit des Haemagglutinin-Proteins im Western-Blot	- 105 -
4.7.4	Bestimmung der Reversionswahrscheinlichkeit der Elastase-abhängigen Spaltstelle der R65-E-Mutante zu einer Trypsin-abhängigen Spaltstelle	- 107 -
4.8	Charakterisierung der R65-E-Mutante <i>in vivo</i>	- 108 -
4.8.1	Attenuierung der R65-E-Mutante <i>in vivo</i>	- 108 -
4.8.1.1	Klinik und Virusausscheidung	- 108 -
4.8.1.2	Pathomorphologische Untersuchung	- 109 -
4.8.2	Untersuchung der Immunantwort nach okulonasaler Infektion mit R65-E	- 111 -
4.8.2.1	Untersuchung der zellulären Immunantwort.....	- 111 -
4.8.2.2	Untersuchung der humoralen Immunantwort nach R65-E-Infektion	- 112 -
4.8.3	Untersuchung der protektiven Wirkung der R65-E-Mutante <i>in vivo</i>	- 112 -
4.8.3.1	Klinik nach Challenge mit dem homologen Virus rgR65.....	- 112 -
4.8.3.2	Klinik nach Challenge mit dem heterosubtypischen Virus R65- H9 _{R66mutR65}	- 114 -
4.8.4	Virusausscheidung nach HPAIV Challenge	- 115 -

INHALTSVERZEICHNIS

4.8.4.1	Virusausscheidung nach rgR65-Challenge	- 115 -
4.8.4.2	Virusausscheidung nach Challenge mit R65-H9 _{R66mutR65}	- 118 -
4.8.5	Immunantwort nach homologem und heterologem Challenge	- 119 -
4.8.6	Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach <i>in ovo</i> Applikation	- 122 -
4.8.6.1	Klinik und Virusausscheidung nach Applikation von R65-E <i>in ovo</i>	- 123 -
4.8.6.2	Humorale Immunantwort vor Challenge	- 124 -
4.8.6.3	Klinik und Virusausscheidung nach Challenge	- 124 -
4.8.6.4	Humorale Immunantwort nach rgR65-Challenge	- 126 -
5.	Diskussion	- 127 -
5.1	Protein-Protein-Interaktionen	- 127 -
5.1.1	Herstellung rekombinanter Influenza-A-Viren mit einem <i>Strep</i> -tag im PB2	- 127 -
5.1.2	Aufreinigung viraler RNP-Komplexe mittels Affinitätschromatographie	- 129 -
5.1.3	Identifizierung von Interaktionspartnern der viralen RNP-Komplexe....	- 132 -
5.1.4	Einsatz der <i>Strep</i> -tag-Technologie für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	- 134 -
5.2	Adaptive Punktmutationen im PB1	- 134 -
5.2.1	Einfluss der Mutation PB1-12I/V auf die Polymeraseaktivität humaner und aviärer Polymerase-Komplexe	- 135 -
5.2.2	Einfluss der Mutation PB1-12I/V auf die PA-Bindung	- 139 -
5.3	Impfstudien	- 141 -
5.3.1	Herstellung einer <i>in vivo</i> attenuierten HPAIV-Spaltstellenmutante	- 141 -
5.3.2	Attenuierung, Immunogenität und Protektivität der R65-E-Mutante <i>in vivo</i>	- 143 -
6.	Zusammenfassung	- 151 -
7.	Summary	- 154 -
	Literaturverzeichnis	- 156 -
	Abkürzungsverzeichnis	- 193 -
	Anhang	- 196 -
	Eidesstattliche Erklärung	- 198 -
	Lebenslauf	- 199 -
	Veröffentlichungen	- 200 -
	Danksagung	- 202 -

1. Einleitung

Influenza-A-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Weitere Gattungen dieser Familie sind die Influenza-B-, Influenza-C-, Thogoto- und Isaviren (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). In einer aktuellen Studie wurde zudem die Einordnung des Quaranfil-Virus, des Johnston-Atoll-Virus und des Lake-Chad-Virus als neue Mitglieder der *Orthomyxoviridae* vorgeschlagen (Presti *et al.*, 2009).

Die Orthomyxoviren sind eine Gruppe behüllter Viren mit einem segmentierten, einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Genom in negativer Orientierung (-ssRNA). Die Influenza-A- und Influenza-B-Viren sind diejenigen Vertreter dieser Familie, die die beim Menschen saisonal auftretenden Grippeerkrankungen bzw. Grippe-Epidemien hervorrufen, welche Schätzungen zufolge weltweit jährlich 300000 bis 500000 Tote fordern (*World Health Organization*, WHO, 2009a). Influenza-A-Viren befallen neben dem Menschen viele andere Wirtsspezies, die wirtschaftlich bedeutsame Nutztiere wie Geflügel, Schwein und Pferd umfassen. Diese Eigenschaften machen die Untersuchung der Pathogenese und der molekularen Mechanismen der Wirtsadaptation der Influenza-A-Viren sowie die Entwicklung effizienter Impfstoffe zu einem Forschungsbereich von außerordentlichem Interesse.

1.1 Taxonomie und Nomenklatur von Influenza-Viren

Eine Differenzierung der Influenza-Typen A, B und C ist hauptsächlich anhand der serologischen Eigenschaften des innerhalb der drei Gattungen hoch-konservierten Nukleoproteins (NP) und des Matrixproteins (M1) möglich (Palese und Shaw, 2006). Zusätzlich unterscheiden sich die Influenza-A- und Influenza-B-Viren von den Influenza-C-Viren in der Anzahl ihrer Gensegmente und ihrer Oberflächen-Glykoproteine. So besitzen Erstere acht Segmente und zwei Glykoproteine, das Haemagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA), Letztere lediglich sieben Segmente und ein Glykoprotein, das Haemagglutinin-Esterase-Fusionsprotein.

Des Weiteren können die Influenza-A-Viren aufgrund der unterschiedlichen antigenen Eigenschaften ihrer Oberflächenproteine HA und NA in 16 verschiedene HA- (H1 bis H16) und 9 verschiedene NA-Subtypen (N1 bis N9) eingeteilt werden (Hinshaw *et al.*, 1981; 1982; 1985; Kawaoka *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 1992; Fouchier *et al.*, 2005).

Die Benennung von Influenza-A-Viren richtet sich nach einer einheitlichen Nomenklatur, die von der WHO 1980 festgelegt wurde (WHO, 1982). Die Namensgebung erfolgt der Reihenfolge nach Influenza-Typ (A, B oder C), Wirtsspezies (entfällt bei humanen Influenza-Viren), Ort der Isolation, Nummer des Isolats und Isolationsjahr. Bei den Influenza-A-Viren wird zuletzt der Subtyp in Klammern angefügt. Beispiel: A/swan/Germany/R65/06 (H5N1).

1.2 Influenza-A-Viren

Influenza-A-Viren erscheinen im Elektronenmikroskop als sphäroide oder filamentöse Partikel mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm (Abbildung 1.1A; Rossman *et al.*, 2010). Ihr Genom umfasst ~13,5 Kilobasen (kb). Dabei sind die 8 Gensegmente, wie man der schematischen Darstellung eines Influenza-A-Virions in Abbildung 1.1B entnehmen kann, unterschiedlich groß. Sie können für bis zu 12 virale Proteine kodieren.

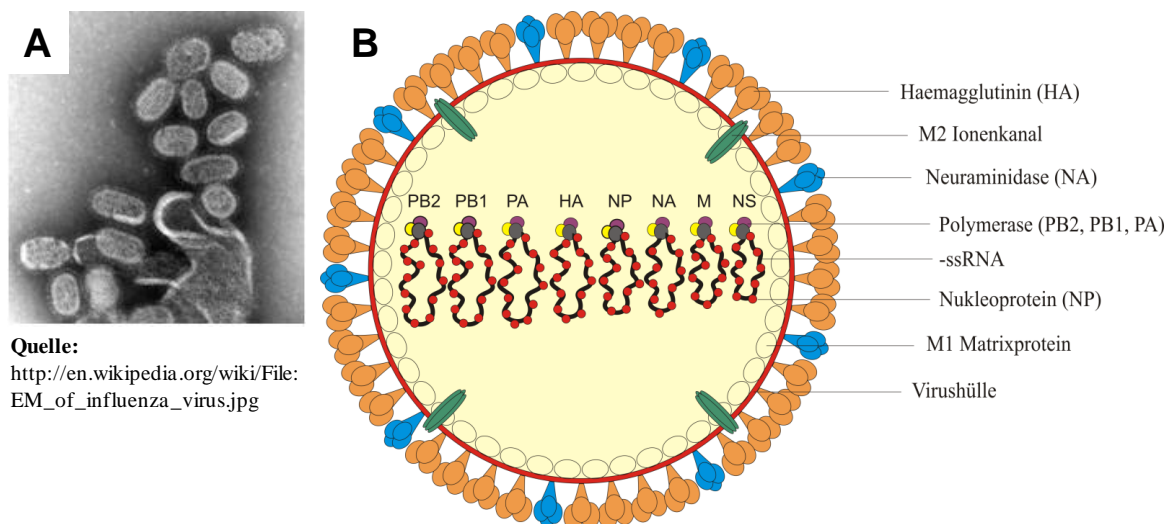


Abbildung 1.1: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza-A-Viruspartikeln und (B) schematische Darstellung vom Aufbau eines Influenza-A-Virions.

Die beiden größten Segmente PB2 (polymerase basic protein 2) und PB1 (polymerase basic protein 1) sowie das drittgrößte Segment PA (polymerase acid protein) bilden einen heterotrimeren Proteinkomplex, die virale RNA-Polymerase. Diese ist für die Transkription und Replikation des Virus-Genoms zuständig. Zusammen mit der viralen RNA und dem Nukleoprotein (Segment 5) bildet die virale RNA-Polymerase virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP). Jedes infektiöse Influenza-Partikel besitzt aufgrund des segmentierten Genoms acht vRNP-Komplexe (Noda *et al.*, 2006). Es konnten jedoch

auch Viruspartikel mit mehr bzw. weniger als acht vRNP-Komplexen und Partikel mit teilweise verkürzten RNA-Segmenten identifiziert werden (Davis und Nayak, 1979; Bancroft und Parslow, 2002; Harris *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). Letztere werden als ‚defective interfering particles‘ (DIs) bezeichnet. Sie können eine Wirtszelle zwar infizieren, sind allerdings bei Einzelinfektion nicht vermehrungsfähig.

Die Hülle der Influenza-A-Viren stammt von der Wirtszelle und besteht demzufolge aus einer Lipid-Doppelschicht. In diese sind die viralen Oberflächenproteine eingelagert. Zu ihnen gehören das Haemagglutinin (Segment 4) und die Neuraminidase (Segment 6). Das Haemagglutinin, ein trimeres Glykoprotein, ist essentiell für die Infektion einer Zelle (Abschnitt 1.3). Es dient der Rezeptor-Erkennung und vermittelt die Anhaftung an und somit den Eintritt der Viruspartikel in die Zelle. Es ist zudem für die Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran verantwortlich. Die Neuraminidase-Aktivität ermöglicht den neu gebildeten Viruspartikeln die Ablösung von der Wirtszelle und begünstigt auf diese Weise die Virusverbreitung.

Ein weiteres Oberflächenprotein, das M2-Protein, dient als Ionenkanal und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Infektionsprozess (Hay *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1992). M2 ist ein Spleiß-Produkt des 7. RNA-Segmentes, welches auch für das Matrixprotein (M1) kodiert. Das M1-Protein bildet die Matrix eines Virus-Partikels und kleidet die Virushülle von innen aus. Es interagiert mit den drei Hüllproteinen HA, NA und M2 (Enami und Enami, 1996; Chen *et al.*, 2008a) und auch mit den vRNP-Komplexen im Inneren der Viruspartikel (Bui *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002).

Auf dem kleinsten Segment 8 sind ebenfalls zwei Proteine kodiert, das Nicht-Strukturprotein NS1 und das NS2-Protein, auch NEP (nuclear export protein) genannt. NS1 nimmt als Immunmodulator Einfluss auf die Interferon-vermittelte antivirale Immunantwort des Wirtes (Wang *et al.*, 2000). NEP ist am Transport der vRNP-Komplexe aus dem Kern in das Zytoplasma beteiligt (O'Neill *et al.*, 1998).

Ein Influenza-Protein, dessen Existenz noch nicht allzu lange bekannt ist und das nicht von allen Influenza-A-Viren gebildet wird, ist das PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001; Zell *et al.*, 2007). Es ist auf Segment 2 kodiert, das neben dem Leserahmen (ORF1) für PB1 einen weiteren Leserahmen (ORF2) für das kleinere PB1-F2-Protein aufweist. PB1-F2 ist ein Nicht-Struktur-Protein. Seine genaue Funktion ist noch nicht vollständig verstanden. Es soll jedoch beim Induzieren apoptotischer Signalwege in der Wirtszelle von Bedeutung sein (Lowy, 2003; Zamarin *et al.*, 2005) und ist außerdem ein wichtiger Virulenzfaktor in der

Pathogenese von Influenza-A-Viren (McAuley *et al.*, 2007). Segment 2 kodiert zudem für ein drittes Protein. Es entsteht durch die Nutzung eines alternativen Start-Codons bei der Translation. Das daraus resultierende 12. Influenza-Protein wird als PB1-N40 bezeichnet und ist eine N-terminal verkürzte PB1-Variante. Deren Rolle im viralen Lebenszyklus ist bisher ungeklärt, die Deletion führt aber zu einer reduzierten Replikationsrate (Wise *et al.*, 2009).

Bis auf NS1, PB1-F2 und PB1-N40 sind alle Influenza-Proteine strukturelle Bestandteile der Viruspartikel (Palese und Shaw, 2006; Shaw *et al.*, 2008; Wise *et al.*, 2009).

1.3 Infektionszyklus

Die Influenza-A-Viren gehören neben den Borna-Viren zu den einzigen animalen Negativstrang-RNA-Viren, die im Zellkern und nicht im Zytoplasma der Wirtszelle replizieren. Ein wesentlicher Grund hierfür mag u. a. die Abhängigkeit der Virusvermehrung von der zellulären Spleiß-Maschinerie sein, mit deren Hilfe die beiden essentiellen Influenza-Proteine M2 und NEP bzw. die Borna-Virusproteine M, L und P gebildet werden (Boulo *et al.*, 2007). Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte im Replikationszyklus der Influenza-A-Viren näher beschrieben werden.

1.3.1 Adsorption, Internalisierung, Uncoating

Als Rezeptoren der Wirtszell-Erkennung durch Influenza-A-Viren dienen Sialinsäuren, die zumeist in einer α -2,3- oder α -2,6-Konfiguration an Galaktose-Moleküle von zellulären membranassoziierten Glykoproteinen und Glykolipiden gebunden sind (Schauer, 2000; Nicholls *et al.*, 2008). Sialinsäuren, deren häufigste Form die N-Acetylneuraminsäure ist, sind Monosaccharide mit einem Gerüst aus neun Kohlenwasserstoff-Resten. Sie fungieren als Liganden für das Rezeptor-bindende Oberflächenprotein der Influenza-A-Viren, das Haemagglutinin. Dabei wurde festgestellt, dass humane Influenza-A-Viren bevorzugt an Zellen mit α -2,6-verknüpften Sialinsäuren binden, während aviäre Influenza-A-Viren überwiegend α -2,3-verknüpfte Sialinsäure-Rezeptoren erkennen (Rogers und Paulson, 1983). Die Bindung von Sialinsäuren durch Influenza-A-Viren ist außerdem verantwortlich für die Fähigkeit der Viren, eine Verklumpung von roten Blutkörperchen herbeizuführen (Schauer, 2000). Dieser Vorgang wird auch als Haemagglutination bezeichnet.

Die Influenza-Virionen werden im Anschluss an ihre Adsorption an die Zelloberfläche über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (Matlin *et al.*, 1982;

Marsh und Helenius, 1989; Martin und Helenius, 1991). Die Freisetzung der vRNP-Komplexe in das Zytoplasma erfolgt über eine Ansäuerung der Endosomen durch zelluläre Protonenpumpen. Der Einstrom von Wasserstoff-Protonen in das Endosomen-Innere führt zum Absinken des pH auf einen Wert von 5-6. Dies hat eine Konformationsänderung im Haemagglutinin zur Folge (Skehel *et al.*, 1982; White *et al.*, 1982; Bullough *et al.*, 1994). Auf diese Weise wird das Fusionspeptid – eine hoch-konservierte Domäne aus hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus der HA2-Untereinheit des Haemagglutinins (Skehel und Waterfield, 1975; Skehel *et al.*, 1982) – exponiert. Eine wichtige Voraussetzung für die Konformationsänderung ist eine vorausgegangene endoproteolytische Spaltung des Haemagglutinin-Vorläuferproteins (Klenk *et al.*, 1975), auf die in Kapitel 1.3.4 näher eingegangen wird. Das Fusionspeptid ist für die Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomen-Membran zuständig, indem es in diese interkaliert (Han *et al.*, 2001). Der Mechanismus der Verschmelzung ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Wahrscheinlich wird hierfür jedoch die Energie, die bei der Konformationsänderung des Haemagglutinins frei wird, eingesetzt (Harrison, 2008). Im Zuge der Membran-Verschmelzung entstehen Fusionsporen, durch die die vRNP-Komplexe in das Zytoplasma gelangen können. Zuvor müssen sich allerdings die Matrixproteine von den vRNP-Komplexen ablösen. Dies wird über eine Ansäuerung des Virus-Inneren aufgrund des Einstroms von Protonen durch die M2-Ionenkanäle erreicht (Martin und Helenius, 1991; Zhirnov, 1992). Die frei gesetzten vRNP-Komplexe werden aktiv mit Hilfe ihrer nukleären Signalsequenzen (NLS), die von zellulären Importinen erkannt werden, durch die Kernporen in den Zellkern transportiert. NLS-Sequenzen sind in jedem der Polymerase-Proteine und im NP in teilweise mehrfacher Ausführung enthalten (Boulo *et al.*, 2007). Dabei könnten NLS1 und NLS2 im Nukleoprotein beim Import der vRNP-Komplexe von Vorrang sein (Wu *et al.*, 2007; Wu und Pante, 2009).

1.3.2 Transkription und Replikation der viralen RNA

Die Transkription der viralen RNA wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Während der frühen Phase werden hauptsächlich die Proteine exprimiert, die für die Replikation benötigt werden, wie die Polymerase-Untereinheiten PB2, PB1, PA und das Nukleoprotein NP. Das NS1-Protein, das als Interferon-Antagonist die antivirale Immunantwort des Wirtes beeinträchtigt (Abschnitt 1.6.4), wird ebenfalls schon während der frühen Phase gebildet. In der späten Phase der Transkription kommt es dann

überwiegend zur Expression der Oberflächenproteine, des Matrixprotein und von NEP (Read und Digard, 2010). Während die Synthese der viralen mRNA in der späten Phase langsam zurück geht, nimmt zugleich die Synthese von vRNA zu (Palese und Shaw, 2006). Der Übergang von Transkription zu Replikation wird vermutlich durch das Vorhandensein an freiem NP und Polymerasekomplexen bestimmt, die an neu synthetisierte cRNA-Moleküle binden und diese stabilisieren. Gemäß des Stabilisierungsmodells nach Vreede *et al.* (2004) werden bereits zu Beginn der Infektion kontinuierlich cRNA-Moleküle gebildet, die jedoch durch zelluläre Nukleasen degradiert werden. Erst die Expression von ausreichend NP und Polymeraseproteinen, die durch ihre Bindung an die virale cRNA einen Abbau dieser verhindern, kann die Synthese der vRNA eingeleitet und vollendet werden.

Die jeweils ersten 12 Nukleotide am 3'-Ende und 13 Nukleotide am 5'-Ende der Gensegmente sind bei allen acht Segmenten und jedem Stamm identisch. Sie bilden hochkonservierte Promotorstrukturen, an die die virale RNA-Polymerase spezifisch bindet (Parvin *et al.*, 1989; Li und Palese, 1992). Das „Pfannenstiel-Modell“ besagt, dass beide Segment-Enden weitestgehend komplementär zueinander sind und doppelsträngige Bereiche ausbilden, so dass eine quasi-zirkuläre, Pfannenstiel-ähnliche Struktur entsteht (Hsu *et al.*, 1987). Dem „Korkenzieher-Modell“ zufolge gehen nur einzelne Basen am 3'- und am 5'-Ende Basenpaarungen miteinander ein (Flick *et al.*, 1996; Flick und Hobom, 1999). Am 3'-Ende jedes Segmentes ist der virale Polymerasekomplex gebunden, der zudem mit dem 5'-Ende in Verbindung steht. Die Initiation der Transkription erfolgt durch einen Prozess, der als „cap-snatching“ bezeichnet wird. Die virale RNA-Polymerase bindet über die PB2-Untereinheit an zelluläre pre-mRNAs. Diese werden etwa 15 Nukleotide (Nt) Strang-abwärts ihrer Cap-Struktur durch die PA-Untereinheit endonukleolytisch gespalten (Dias *et al.*, 2009). Die daraus resultierenden Oligonukleotide mit Cap-Struktur dienen als Primer für die Synthese der viralen mRNAs. Die PB1-Untereinheit hat dabei die Polymerase-Aktivität inne (Krug *et al.*, 1979). Die Transkription jedes Segmentes wird mit dem Anhängen eines Poly-A-Schwanzes an die neu synthetisierten mRNA-Moleküle abgeschlossen. Ausschlaggebend hierfür ist ein Polyadenylierungssignal, das am 5'-Ende jedes Virus-Segmentes lokalisiert ist (Poon *et al.*, 1998). Das Verwenden zellulärer mRNAs als Primer für die virale Transkription führt zum „Virus-host-shut-off“ und zum Ausrichten der zellulären Translationsmaschinerie auf die Produktion viraler Proteine.

Die Replikation der viralen RNA ist Primer-unabhängig und verläuft über die Generierung von Vollängen-cRNA-Zwischenprodukten. Anhand der positiv orientierten cRNA-Moleküle, welche weder eine Cap-Struktur noch einen Poly-A-Schwanz aufweisen, wird die virale RNA vervielfältigt. Die cRNA-Moleküle sind mit Nukleoproteinen und der viralen RNA-Polymerase assoziiert. Obwohl die cRNPs nicht in großen Mengen generiert werden, werden von ihnen ausgehend effizient große Mengen an neuen vRNPs produziert (Jorba *et al.*, 2009).

1.3.3 Assemblieren und Freisetzung der Viruspartikel

In polarisierten Epithelzellen erfolgt die Entstehung und Freisetzung der Virionen in der Regel in der apikalen Domäne der Plasmamembran (Nayak *et al.*, 2009). Der Vorgang, bei dem es zur Ausbildung und Ablösung der Viruspartikel von der Wirtszelle kommt, wird als „Budding“ bezeichnet. Dazu müssen sich zunächst alle Komponenten, aus denen ein Influenza-Virion aufgebaut ist, am Ort der Partikel-Formation zusammen finden. Welche molekularen Mechanismen dem Assemblieren der Virus-Bestandteile zu Grunde liegen, ist nicht im Einzelnen bekannt. Eine Reihe von Protein-Interaktionen zwischen den C-terminalen Domänen der viralen Membranproteine, dem Matrixprotein und den Ribonukleoproteinkomplexen sollen hierbei involviert sein (Schmitt und Lamb, 2005).

Die Membranproteine HA, NA und M2 werden über den sekretorischen Weg durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, in dem sowohl HA als auch NA glykosyliert und M2 phosphoryliert werden, zur Plasmamembran befördert (Ponimaskin und Schmidt, 1998; Schroeder *et al.*, 2005; Veit und Schmidt, 2006). Ein Einbau der beiden Glykoproteine erfolgt in den Lipid-Raft-Domänen der Zellmembran. Die hierfür verantwortlichen Signalsequenzen sind in den Transmembran-Domänen (TMD) von HA und NA enthalten (Kundu *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998). Das M2-Protein hingegen ist nicht mit den Raft-Domänen der Zellmembran assoziiert (Nayak *et al.*, 2009).

Ein Großteil der M1-Matrixproteine gelangt aufgrund ihrer Fähigkeit, an Lipide und die zytoplasmatischen Domänen der Membranproteine zu binden, an den Ort der Partikel-Bildung (Barman *et al.*, 2001; Schmitt und Lamb, 2005). Eine weitaus kleinere M1-Population wird jedoch über eine NLS-Sequenz im M1-Protein in den Nukleus transportiert (Ye *et al.*, 1995). Dort vermittelt es in Wechselwirkung mit NEP und CRM1/RanGTP den Export der vRNP-Komplexe aus dem Zellkern (Whittaker *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2000; Akarsu *et al.*, 2003). Dabei werden nur vRNPs, aber keine

cRNPs, in das Zytoplasma transportiert (Shapiro *et al.*, 1987). Bevor allerdings überhaupt ein solcher Export stattfinden kann, müssen größere Mengen M1 und NEP im Zellkern akkumulieren (Whittaker *et al.*, 1995). Auf welche Weise die vRNPs zusammen mit M1/NEP anschließend zur apikalen Plasmamembran transportiert werden ist noch unklar. Man vermutet allerdings, dass die Interaktion von NP mit kortikalen Aktinfilamenten und Lipid-Raft-Domänen eine zentrale Funktion übernimmt (Avalos *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 2004).

Es gibt zwei Modelle, nach denen eine Verpackung der acht vRNP-Komplexe in die Virionen erfolgen könnte. Das „Random-packaging“-Modell geht von einer zufälligen Verteilung der viralen Segmente aus, während das „Specific-packaging“-Modell eine selektive Anordnung der Segmente vorschlägt (Compans *et al.*, 1970; Hutchinson *et al.*, 2010). Letzteres impliziert das Vorhandensein von spezifischen Verpackungssignalen in jedem Segment. Tatsächlich konnten derartige Signale an den Enden der viralen RNA-Segmente von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert werden (Fujii *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005; Muramoto *et al.*, 2006; Marsh *et al.*, 2008). Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Influenza-Virionen konnten des Weiteren sieben Elektronen-dichte Ansammlungen, die um eine achte Elektronen-dichte Ansammlung herum angeordnet sind, beobachtet werden. Diese geordneten Formationen sprechen ebenfalls für das „Specific-packaging“-Modell (Noda *et al.*, 2006).

Nach dem Assemblieren aller Virusbestandteile kommt es zum Auswachsen und letztendlich zum Ablösen der Virionen von der Zellmembran. Sowohl M1 als auch M2 spielen bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle (Nayak *et al.*, 2009). Jüngere Studien legen zudem eine Beteiligung des zellulären Rab11-Signalweges am „Budding“-Vorgang nahe (Bruce *et al.*, 2010). Um nach Abschluss des „Budding“ eine effiziente Verbreitung der entstandenen Nachkommen-Viren zu gewährleisten, spaltet die Neuraminidase Sialinsäure-Reste von der Zelloberfläche und dem HA der Viren ab, so dass eine Vernetzung oder Verklebung der Viruspartikel mit der Wirtszelle oder untereinander verhindert wird (Nayak *et al.*, 2009).

1.3.4 Proteolytische Aktivierung des Haemagglutinins

Die Spaltung des Haemagglutinin-Vorläuferproteins HA₀ in seine Untereinheiten HA₁ und HA₂ ist ein wichtiger Schritt im Infektionszyklus und von großer Bedeutung in der

Pathogenese von Influenza-A-Viren. Die Aktivierung des Haemagglutinins kann durch Proteasen mit monobasischer Spezifität wie z.B. Trypsin oder durch Proteasen mit polybasischer Spezifität wie z. B. Furin erfolgen (Klenk *et al.*, 1975; Garten *et al.*, 1981; Stieneke-Grober *et al.*, 1992; Klenk und Garten, 1994). Im Organismus kommen Trypsin und Trypsin-ähnliche Proteasen hauptsächlich als sekretorische Enzyme im Respirations- und Verdauungstrakt vor, während Furin, das den Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen zugeordnet wird, ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert wird (Walker *et al.*, 1992; Klenk und Garten, 1994).

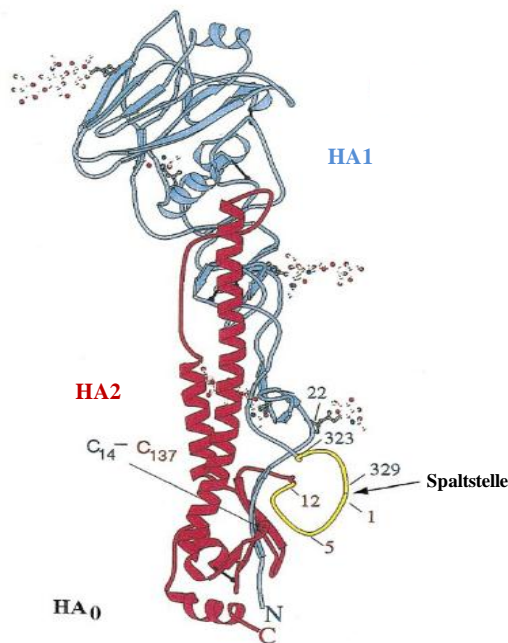


Abbildung 1.2: Darstellung eines HA-Monomers mit den Untereinheiten HA₁ (blau) und HA₂ (rot) nach Steinhauer (1999). Die Spaltstelle ragt als zirkuläre Schleife aus dem Molekül heraus (gelb).

Voraussetzung für eine Spaltung durch Trypsin oder Trypsin-ähnliche Proteasen ist das Vorhandensein von mindestens einem Arginin-Rest an der Spaltstelle des Haemagglutinins (monobasisches Spaltmotiv). Die Spaltstelle befindet sich dabei in einer zirkulären Schleife, die aus dem restlichen HA-Molekül räumlich heraus weist (Abbildung 1.2). Trypsin schneidet das HA hinter der basischen Aminosäure und somit direkt vor dem Fusionspeptid. Dieses kann nun nach Absinken des pH-Wertes im Endosom und einer daraus resultierenden Konformationsänderung des Haemagglutinins exponiert werden. Wie bereits zuvor erwähnt ist dieser Vorgang essentiell für die Fusion der Virus- mit der Endosomenmembran und einer Freisetzung der vRNP-Komplexe in das Zytoplasma.

Im Gegensatz zu Trypsin-ähnlichen Proteasen benötigen Subtilisin-ähnliche Proteasen wie Furin ein polybasisches Spaltmotiv, d. h. eine Folge von mehreren basischen Aminosäuren, um eine proteolytische Aktivierung des Haemagglutinins herbeiführen zu können (Stieneke-Grober *et al.*, 1992; Senne *et al.*, 1996). Das minimale Erkennungsmotiv hierfür lautet: R-X-R/K-R (‚R‘ steht für Arginin, ‚X‘ für jede beliebige Aminosäure, ‚K‘ für Lysin) oder R-X-X-R (Klenk und Garten, 1994; Neumann und Kawaoka, 2006). Als mögliche Ursachen für die Entstehung der polybasischen Spaltstelle hoch-pathogener Influenza-A-Viren werden eine Rekombination des HA-Segementes mit zellulärer ribosomaler 28S-RNA (Khatchikian *et al.*, 1989) oder mit Sequenzen anderer Influenza-Segmente wie dem Matrixgen (Pasick *et al.*, 2005) oder NP-Gen (Suarez *et al.*, 2004) vorgeschlagen. Eine weitere Ursache könnte eine auf ein Stottern der viralen RNA-Polymerase im Replikationsprozess zurückgehende Insertionsmutation in der HA-Spaltstellenregion sein (Perdue *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2001).

Wie Trypsin spaltet die Protease Furin das Haemagglutinin hinter dem letzten basischen Aminosäure-Rest und vor dem Fusionspeptid. Dabei findet die Spaltung durch Furin bereits intrazellulär im Golgi-Apparat im Zuge des Proteintransports zur Zellmembran statt, wohingegen eine Spaltung durch sekretorische, Trypsin-ähnliche Proteasen in der Regel extrazellulär geschieht (Klenk und Garten, 1994). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte außerdem zeigen, dass die in der menschlichen Lunge exprimierte Trypsin-ähnliche Protease HAT (human airway trypsin-like protease) eine HA-Spaltung extrazellulär in Membran-gebundener Form katalysiert. In derselben Arbeit wurden zudem Hinweise auf eine intrazelluläre proteolytische HA-Aktivierung durch die Trypsin-ähnliche, im Respirationstrakt vorkommende Protease TMPRSS2 (transmembrane protease serine S1 member 2) gefunden (Bottcher-Friebertshauer *et al.*, 2010).

Das unterschiedliche Vorkommen Trypsin-ähnlicher und Subtilisin-ähnlicher Proteasen führt dazu, dass sich Influenza-Viren mit einer monobasischen Spaltstelle nur lokal begrenzt im Respiration- und Verdauungstrakt eines Organismus vermehren können. Influenza-Viren mit einem polybasischen Spaltmotiv können sich indessen aufgrund der ubiquitären Expression von Furin im gesamten Organismus ausbreiten und auf diese Weise eine systemische Infektion hervorrufen (Horimoto und Kawaoka, 2001). Dies ist von enormer Bedeutung für das Virulenzpotential eines Influenza-Virus und entscheidend für eine Klassifizierung der Influenza-Viren nach ihrer Virulenz (Kapitel 1.5).

Für die Vermehrung von Influenza-Viren im Labor werden neben der Zellkultur auch embryonierte Hühnereier verwendet. In der Allantoisflüssigkeit eines Hühnereis ist eine Faktor-X-ähnliche Protease enthalten. Diese hat eine monobasische Erkennungssequenz und ist ebenfalls dazu in der Lage, das HA-Vorläuferprotein zu spalten (Gotoh *et al.*, 1992; Ogasawara *et al.*, 1992).

1.4 Genetische Variabilität

Eine hohe genetische Variabilität ist charakteristisch für Influenza-A-Viren. Sie ist ausschlaggebend dafür, dass die jährliche Grippe-Schutzimpfung an die jeweilig zirkulierenden Virusstämme angepasst werden muss (WHO, 2010a).

Mit der hohen genetischen Variabilität der Influenza-A-Viren werden zwei Prozesse in Verbindung gebracht: die „antigene Shift“ sowie die „antigene Drift“. Aufgrund ihres segmentierten Genoms ist es Influenza-Viren möglich, untereinander genetisches Material auszutauschen und neu zu rekombinieren (Palese und Young, 1982). Dies wird als Reassortment oder auch als „antigene Shift“ bezeichnet. Bei der „antigenen Drift“ ist es eine Ansammlung von Punktmutationen, basierend auf der fehlenden „proof-reading“-Aktivität der viralen RNA-Polymerase, die einen stark veränderten Phänotyp herbeizuführen vermag (Bouvier und Palese, 2008).

Das Ereignis der „antigenen Shift“ liegt zwei Pandemien des letzten Jahrhunderts nachweislich zu Grunde. Die im Jahr 1957 durch ein H2N2 (A/Singapore/1/57 (H2N2)) Virus ausgelöste „Asiatische Grippe“ war die Folge eines Reassortments zwischen einem aviären H2N2 und einem humanen H1N1 Virus. Dabei wurden die Gensegmente HA, NA und PB1 des aviären Stammes in den humanen Stamm integriert. Der „Hong-Kong-Grippe“ von 1968, hervorgerufen durch einen neuartigen H3N2 Stamm (A/Hong Kong/1/68 (H3N2)), ist wiederum ein Reassortment zwischen einem aviären H3 und einem humanen H2N2 Virus voraus gegangen. Dabei wurden jedoch nur das aviäre HA- und PB1-Gensegment in den humanen Stamm eingebracht (Kawaoka *et al.*, 1989). Das aktuellste Beispiel für das Auftreten einer Pandemie nach vorhergehender Neukombination von Gensegmenten verschiedener Influenza-A-Viren ist das pandemische H1N1 Virus von 2009. Hierbei kam es zu einem Reassortment der Gensegmente einer Tripelreassortante eines aviären, humanen und porcinen Influenza-Stammes mit einem eurasischen Schweinegrippe-Virus (Neumann *et al.*, 2009). Das pandemische H1N1 Virus, die Grippe-Erkrankung wird auch als „Mexikanische Grippe“ oder „Schweinegrippe“ bezeichnet,

konnte sich innerhalb kürzester Zeit weltweit ausbreiten, die registrierte Mortalität ist aber weitaus geringer als die aller vorhergehenden Pandemien (Tabelle 1.1). Die mit Abstand tödlichste aller Grippe-Pandemien ist die „Spanische Grippe“ von 1918. Schätzungen gehen von mindestens 50 Millionen Toten aus, ganze Siedlungen wurden ausgelöscht. Dabei erreichte die „Spanische Grippe“ eine besonders hohe Mortalität bei jungen Erwachsenen zwischen 18 und 30 Jahren (Ahmed *et al.*, 2007). Das Entstehen der 1918 Pandemie ist nicht genau bekannt. Aber man vermutet, dass es sich bei diesem Virus um einen aviären Stamm handelt, der direkt vom Vogel auf den Menschen übertragen worden sein könnte (Belshe, 2005; Taubenberger, 2005a; Tumpey *et al.*, 2005a).

Tabelle 1.1: Influenza-Pandemien der letzten 100 Jahre

Pandemie	Zeitraum	Opfer*	Subtyp
Spanische Grippe	1918-1920	50 Millionen	H1N1
Asiatische Grippe	1957-1958	1,5-2 Millionen	H2N2
Hong-Kong Grippe	1968-1969	1 Million	H3N2
Mexikanische Grippe	seit April 2009	> 18.209	H1N1

*WHO, (2009b, 2010b)

1.5 Pathogenese und Wirtsspektrum

Aviäre Influenza-A-Viren können ihrer Virulenz nach in niedrig-pathogene (LPAIV) und hoch-pathogene (HPAIV) aviäre Influenza-Viren unterteilt werden. Folgende Kriterien werden für die Einstufung eines Influenza-Virus als hoch-pathogen herangezogen (Alexander, 2008; *Office International des Epizooties*, OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010):

1. eine Mortalitätsrate von mehr als 75% in intravenös infizierten Hühnern
2. IVPI (intravenöser Pathogenitätsindex) in Hühnern gleich oder größer als 1,2
3. H5 oder H7 Viren mit einer polybasischen Spaltstelle

Sollte ein Influenza-Virus keines dieser Merkmale erfüllen ist es als niedrig-pathogen einzuordnen. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass diese Art der Klassifizierung auf Untersuchungen in Hühnern basiert, und deshalb ein HPAIV nicht zwangsläufig letal für andere Vogelspezies sein muss.

Als Reservoir für alle niedrig-pathogenen Influenza-A-Viren wird das Wassergeflügel mit den Ordnungen *Anseriformes* und *Charadriiformes* angesehen. Bei ihnen konnten bisher

alle 16 HA- und 9 NA-Serotypen in zahlreichen Kombinationen nachgewiesen werden (Peiris *et al.*, 2007; Salomon und Webster, 2009). Die meisten Influenza-A-Viren rufen nur sehr milde bis keine klinischen Symptome in ihren natürlichen Wirten hervor. Dies spricht für eine optimale Anpassung der LPAIV an das Wassergeflügel (Lipatov *et al.*, 2004). Die Replikation der Influenza-A-Viren ist im Wassergeflügel auf die Epithelzellen des Gastro-Intestinaltraktes beschränkt, was mit einer Expression der von aviären Influenza-Viren bevorzugten α -2,3-verknüpften Sialinsäure-Rezeptoren in diesen Geweben einhergeht (Fouchier *et al.*, 2003; Munier *et al.*, 2010).

In regelmäßigen Abständen kommt es zu einer Übertragung von Influenza-A-Viren aus dem Wassergeflügel in Hausgeflügelbestände. Hühner, Puten, Fasane und Wachteln zählen dabei zu den empfänglicheren Spezies. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung hoch-pathogener Influenza-A-Viren. So kann der Eintrag von niedrig-pathogenen Influenza-Viren der Subtypen H5 und H7 in das Hausgeflügel zur Entwicklung hoch-pathogener H5- und H7-Stämme mit einer polybasischen HA-Spaltstelle führen (Horimoto *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1996; Suarez *et al.*, 2004; Pasick *et al.*, 2005; Garten und Klenk, 2008). Diese sind wiederum auf Wildvögel übertragbar, zeigen dort eine zum Teil sehr hohe Mortalität und können sich über große Entfernungen hinweg ausbreiten. Bei der Virusverbreitung sind aber nicht nur die Wildvögel sondern auch der Handel mit Lebend-Geflügel oder mit Geflügelprodukten maßgeblich beteiligt (Webster, 2004; Peiris *et al.*, 2007). Hoch-pathogene H5- und H7-Viren haben eine enorme wirtschaftliche Bedeutung, da sie eine schwere systemische Infektion – dazu zählen Nekrosen, Entzündungen der Haut, in den Eingeweiden und im Gehirn – mit einer bis zu 100%igen Mortalität im Geflügel auslösen können und darüber hinaus hoch-ansteckend sind. Im Gegensatz dazu sind Infektionen von Geflügel mit niedrig-pathogenen Viren meist subklinisch und können mit gelegentlichen respiratorischen Erkrankungen oder einem Rückgang in der Eiproduktion verbunden sein (Jackwood *et al.*, 2009).

Diverse Säugerspezies wie Mensch, Schwein, Pferd oder Seehund stellen ebenfalls Wirte für Influenza-A-Viren dar. Beim Menschen treten vorrangig die HA-Typen H1, H2, H3 und die NA-Typen N1, N2 auf (Subbarao und Katz, 2000). Sporadische Infektionen ausgehend von einer direkten Übertragung von Vogel zu Mensch wurden zudem mit Influenza-Viren vom Subtyp H5N1, H9N2 und H7N7 beobachtet (Bender *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 1999; Fouchier *et al.*, 2004). Als besonders gefährlich werden dabei die Influenza-Viren des Subtyps H5N1 eingestuft. Hoch-pathogene H5N1 Viren haben im

Menschen eine Mortalitätsrate von mehr als 60% und können fatale Pneumonien sowie ein Multiorganversagen verursachen (WHO, 2009c; de Jong *et al.*, 2006). Da es keine humanen H5-Viren gibt und eine direkte Übertragung der hoch-pathogenen Varianten von Mensch zu Mensch bislang nicht nachgewiesen wurde (Peiris *et al.*, 2007), gilt die Weltbevölkerung gegenüber den H5-Viren als naiv. Bei Ausbruch einer H5N1-Pandemie wäre demzufolge kein Schutz durch bereits vorhandene Antikörper gewährleistet.

Humane Influenza-A-Viren replizieren bevorzugt in den Epithelzellen des oberen Respirationstraktes, da hier überwiegend die favorisierten α -2,6-verknüpften Sialinsäure-Rezeptoren ausgebildet werden (Shinya *et al.*, 2006).

Dem Schwein kommt als Zwischenwirt, auch „mixing-vessel“ genannt, bei der Übertragung aviärer Influenza-Viren auf den Menschen und der Entstehung von Reassortanten eine besondere Bedeutung zu (Scholtissek *et al.*, 1985; Webster *et al.*, 1995). Im Schwein werden sowohl α -2,3- als auch α -2,6-verknüpfte Sialinsäure-Rezeptoren exprimiert (Suzuki *et al.*, 2000; Nicholls *et al.*, 2008), wodurch es zu Doppelinfektionen mit humanen und aviären Influenza-Erregern kommen kann. Dies kann wiederum zur Erzeugung von für den Menschen potentiell gefährlichen Reassortanten führen. Als aktuelles Beispiel hierfür wäre die Entstehung des pandemischen H1N1 Virus von 2009 zu nennen (Smith *et al.*, 2009). Außerdem kann sich die Rezeptor-Spezifität aviärer Viren im Zuge des Adaptationsprozesses im Schwein so ändern, dass diese Viren auch für den Menschen potentiell gefährlich werden können (Ito *et al.*, 1998).

Andere Zwischenwirte neben dem Schwein, zu denen der Mensch ebenfalls in engem Kontakt steht, sind Hühner und Wachteln (Matrosovich *et al.*, 1999; Wan und Perez, 2006).

1.6 Virulenzfaktoren

Die Virulenz gibt den Grad der Pathogenität eines Erregers an und kann anhand der krankheitsauslösenden oder letalen Eigenschaften des Erregers tierexperimentell quantifiziert werden. Der für die Klassifizierung von niedrig- und hoch-pathogenen Influenza-A-Viren relevante IVPI wird nach intravenöser Applikation von 10 Hühnern mit 100 μ l einer 1:10 in isotonischer Kochsalzlösung verdünnten Allantois-Virusflüssigkeit (HA-Titer $\geq 2^4$) bestimmt. Die Tiere werden über einen Zeitraum von 10 Tagen hinweg klinisch beobachtet und mit Hilfe eines einheitlichen Punktesystems bewertet. Alle vergebenen Punkte werden am Ende des Versuches addiert und durch die Anzahl der Tiere

und Tage dividiert. Ein IVPI gleich oder größer als 1,2 ist charakteristisch für hoch-pathogene Influenza-Viren (OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010).

Das Virulenzpotential von Influenza-A-Viren wird durch eine Kombination verschiedener Merkmale, die auf den Genen der Oberflächen- und Polymeraseproteine sowie des NP, NS1- und PB1-F2-Proteins kodiert sind, determiniert (Klenk und Rott, 1988; Garten und Klenk, 1999; Chen *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Wasilenko *et al.*, 2008). Dabei sind Genkonstellation und Genkompatibilität entscheidend für die Virulenz eines Virusstammes (Palese, 2004).

1.6.1 Die Oberflächenproteine HA und NA

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren ist das Haemagglutinin (Bosch *et al.*, 1979). Sowohl das Vorhandensein einer polybasischen Spaltstelle als auch die Rezeptor-Spezifität des HA sind ausschlaggebend dafür, wie effizient ein Influenza-Virus eine Wirtszelle infizieren und sich im Organismus ausbreiten kann (Senne *et al.*, 1996). Das Virulenzpotential des Haemagglutinins wird jedoch nicht nur durch diese beiden Faktoren geprägt. Es müssen noch andere Determinanten innerhalb des Haemagglutinins existieren, die für die Virulenz relevant sind (Gohrbandt *et al.*, 2010; Bogs *et al.*, 2010). So kann das Einfügen einer polybasischen Spaltsequenz in das HA eines niedrig-pathogenen Influenza-Virus zwar genügen, um einen hoch-pathogenen Phänotyp zu erhalten (Munster *et al.*, 2010), muss es aber nicht (Stech *et al.*, 2009; Bogs *et al.*, 2010). Der Austausch einer polybasischen gegen eine monobasische Spaltstelle führt hingegen zu einem drastischen Virulenzverlust (Horimoto und Kawaoka, 1994).

Die HA-Spaltung kann zudem durch das Anfügen von Kohlenhydrat-Seitenketten an Aminosäuren in räumlicher Nähe der Spaltstelle beeinträchtigt werden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Verlust einer Kohlenhydrat-Seitenkette die HA-Spaltbarkeit und die Virulenz eines niedrig-pathogenen H5N2-Stammes deutlich erhöht (Kawaoka *et al.*, 1984).

Des Weiteren hängt die Adsorption der Influenza-Viren an die Wirtszelle nicht nur von der Affinität des Haemagglutinins für die terminale Sialinsäure ab sondern auch von der Art des verknüpften Zuckers sowie der Häufigkeit und Zugänglichkeit der Sialinsäure-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Gambaryan *et al.*, 1995; Salomon und Webster, 2009). Durch Mutationen in der Rezeptor-Bindedomäne des HA oder Mutationen, die den

Glykosylierungsstatus (Kawaoka und Webster, 1988) oder die elektrostatische Ladung der HA-Kopfdomäne betreffen, kann der komplexe Vorgang der Rezeptor-Bindung beeinflusst werden (Matrosovich *et al.*, 2007).

Für die effektive Infektion einer Wirtszelle ist außerdem das ausgewogene Zusammenspiel der Rezeptorspezifität des Haemagglutinins und der Substrat-Spezifität der Neuraminidase von Bedeutung (Matrosovich *et al.*, 1999; Mitnaul *et al.*, 2000). Es ist z. B. erwiesen, dass eine Deletion in der Stieldomäne der Neuraminidase, der flexiblen Region zwischen deren enzymatisch-aktiver Domäne und Transmembran-Domäne, eine Rolle im Adaptationsprozess aviärer Viren an das Hausgeflügel spielt (Matrosovich *et al.*, 1999; Banks *et al.*, 2001). Eine solche Deletion konnte wiederum mit einer gesteigerten Virulenz im Huhn in Verbindung gebracht werden (Banks *et al.*, 2001; Munier *et al.*, 2010). Dieser scheinbare Widerspruch könnte damit begründet werden, dass die verkürzte „Stalk“-Region als Ausgleich für eine erniedrigte HA-Affinität für die Sialinsäure-Rezeptoren im Hausgeflügel dienen könnte (Mitnaul *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002).

1.6.2 Die Polymeraseuntereinheiten

Die virale RNA-Polymerase besitzt keine „Proof-reading“-Aktivität und baut deshalb bei jeder Replikationsrunde Punktmutationen in das virale Genom ein. Die Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Influenza-A-Viren beträgt 10^{-5} , d. h. 1 Fehler auf 10000 Nukleotide. Dies ermöglicht die Entstehung einer hohen Vielfalt an genetisch nahezu identischen Viren, der so genannten Quasispezies, und stellt ein Überleben der Influenza-Viren unter erheblichem Selektionsdruck sicher (Lauring und Andino, 2010). Das Auftreten von Punktmutationen in den für die RNA-Polymerase kodierenden Genen konnte in vielen unterschiedlichen Studien als Ursache für eine zunehmende Polymerase-Aktivität und eine gesteigerte Virulenz identifiziert werden (Salomon und Webster, 2009). Mutationen in den Polymerase-Genen (P-Gene) haben entweder eine verbesserte Interaktion der Polymerase-Proteine untereinander zur Folge oder sind auf eine veränderte Interaktion mit Wirtszell-Proteinen zurück zu führen. Beispiele für die Polymerase-Aktivität erhöhende Mutationen, die zu einer gesteigerten Virulenz in Mäusen führen, sind: PB2 E627K, PB2 D701N, PB2 S714R, PB1 L13P, PB1 S678N, PA K615N (Subbarao *et al.*, 1993a; Naffakh *et al.*, 2000; Hatta *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2006; Salomon *et al.*, 2006). Darunter ist die PB2-Mutation E627K die mit am häufigsten untersuchte Punktmutation. Sie nimmt bei Adaptationsvorgängen eine herausragende Rolle

ein. Während sich bei den meisten aviären Isolaten Glutamat an PB2-Position 627 befindet, weisen humane Isolate in der Regel Lysin an dieser Position auf. Allein das Einfügen der E627K-Mutation in das PB2 eines nicht-humanen Influenza-Virus kann genügen, um dessen Anpassung an Säugerzellen zu gewährleisten (Subbarao *et al.*, 1995; Naffakh *et al.*, 2000). Dies geht wahrscheinlich mit einer verbesserten Interaktion von PB2 mit NP einher (Rameix-Welti *et al.*, 2009) und zieht eine gesteigerte Replikationsfähigkeit unter Temperaturen von 33-35°C, wie es im oberen Respirationstrakt von Säugern üblich ist, nach sich (Massin *et al.*, 2001).

Eine ebenso gut charakterisierte Punktmutation ist die PB2-Mutation D701N. Gabriel *et al.* (2008b) konnten zeigen, dass Asparagin an Position 701 eine verbesserte Interaktion des PB2 mit Importin α in Säugerzellen bewirkt. Importin α ist für den Import der vRNP-Komplexe in den Zellkern zu Beginn der Infektion und auch für den Import der neu-synthetisierten PB2-Proteine und Nukleoproteine zuständig. Die daraus folgende verbesserte Transkription und Replikation ist demnach auch das Resultat einer erleichterten Rekrutierung von Polymerase-Untereinheiten in den Kern (Gabriel *et al.*, 2008b).

Außerdem konnte der Einfluss von zwei Punktmutationen in den P-Genen, PA T515A und PB1 Y436H, auf die Virulenz eines hoch-pathogenen H5N1-Isolates in Wildenten beobachtet werden (Hulse-Post *et al.*, 2007). So genügte schon die Insertion einer der beiden Mutationen, um ein für Enten letales Virus in ein nicht-letales Virus umzuwandeln. Ob dieser Effekt auf einer veränderten Polymerase-Aktivität basiert oder immunologische Ursachen wie eine veränderte Zytokin-Freisetzung hat, wurden in der Studie von Hulse-Post *et al.* (2007) als mögliche Gründe angeführt, aber nicht eindeutig geklärt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der für die Polymerase-Aktivität von Bedeutung ist, ist die Kompatibilität der Polymerase-Proteine untereinander und mit NP. So ist u. a. die virale Polymerase des pandemischen Virus von 1918 für dessen hohe Virulenz in Mäusen verantwortlich (Tumpey *et al.*, 2005b). Nach Austausch des PB1-Segmentes gegen das PB1 eines niedrig-pathogenen H1N1 Virus kommt es jedoch zu einer signifikanten Erniedrigung der Virulenz (Pappas *et al.*, 2008). Reassortment-Studien von Naffakh *et al.* (2000) konnten zusätzlich belegen, dass bei gemeinsamer Herkunft von PB2 und NP die Effizienz chimärer Polymerase-Komplexe begünstigt wird. Sie konnten auch zeigen, dass ein aviäres PB1 in humanen Zellen besser mit einem PB2, PA und NP humaner Herkunft kooperiert als ein humanes PB1 mit aviären Polymerase-Proteinen und NP. Die beiden

Pandemien von 1957 und 1968, bei denen beide Male ein aviäres PB1 zusammen mit den Genen für die Oberflächenproteine HA und NA oder HA allein in ein humanes Virus integriert wurde, legen zudem einen biologischen Vorteil von aviären im Vergleich zu humanen PB1-Proteinen nahe (Naffakh *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

1.6.3 Das Nukleoprotein

Das Nukleoprotein der Influenza-Viren ist verantwortlich für die Verpackung und den Schutz der viralen RNA vor zellulären Nukleasen. Je Molekül Nukleoprotein werden dabei 24 Nukleotide vRNA oder cRNA mit hoher Affinität gebunden (Ortega *et al.*, 2000). Des Weiteren bildet das Nukleoprotein Homo-Oligomere (Ruigrok und Baudin, 1995) und übernimmt wichtige Funktionen im Infektionszyklus sowohl bei der Transkription und Replikation als auch beim Transport der viralen RNP-Komplexe (Portela und Digard, 2002). Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass das Nukleoprotein mitbestimmend für das Virulenzpotential eines Influenza-Stammes sein kann. Zum Beispiel konnte eine Reassortment-Studie zwischen zwei Viren mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit aber unterschiedlich hohem Virulenzpotential bei Austausch des Nukleoproteins eine Zunahme der Replikationsfähigkeit, des Zelltropismus und der Virulenz des niedrig-virulenten Stammes zeigen (Wasilenko *et al.*, 2008). Als möglicher Grund hierfür wird eine verbesserte NP/PB2-Interaktion angesehen.

Einzelne Aminosäure-Austausche im Nukleoprotein konnten ebenfalls mit einer Erhöhung der Polymeraseaktivität und auch der Virulenz der untersuchten Influenza-Viren in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen die beiden Mutationen N319K und A184K. Erstere Mutation ist bei der Adaptation eines Huhn-adaptierten Virus an die Maus relevant und geht mit einer verbesserten Bindung an Importin α in Säugerzellen einher (Gabriel *et al.*, 2008b). Die Mutation A184K liegt in einer potentiellen RNA-Bindungstasche und könnte insofern einen Einfluss auf die RNA-Bindeaffinität und damit die Replikationsfähigkeit des Virus ausüben (Wasilenko *et al.*, 2009).

1.6.4 Das Nicht-Strukturprotein NS1

Das NS1-Protein ist ein multifunktionelles Protein, das als Interferon-Antagonist die antivirale Antwort des angeborenen Immunsystems unterminiert und durch Interaktion mit zellulären Faktoren die Replikation der Influenza-Viren begünstigt.

Die Wirkung von NS1 als Virulenzfaktor ist stammspezifisch (Hale *et al.*, 2008). Sie

basiert zum einen auf dessen Eigenschaft, durch Bindung an RIG-I/IPS-1-Komplexe (Mibayashi *et al.*, 2007) die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF κ B und cJun/ATF-2 zu verhindern, die essentiell für eine Induktion von Interferon β (IFN β) sind (Talon *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2002). Zum anderen bindet NS1 an verschiedene RNA-Spezies, u. a. virale RNA und doppelsträngige RNA, wodurch die Erkennung durch antivirale, dsRNA-bindende Proteine wie die Proteinkinase R (PKR) und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) unterbunden wird (Min und Krug, 2006; Min *et al.*, 2007). NS1 interagiert ebenfalls mit Proteinen der zellulären Spleißmaschinerie (CPSF30, PABPII) und nimmt somit Einfluss auf die post-transkriptionale Modifikation zellulärer mRNAs (Nemeroff *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Zudem wird der Export der zellulären mRNAs ins Zytoplasma gezielt inhibiert (Qiu und Krug, 1994). Es zeigen sich außerdem Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen NS1 und den viralen RNP-Komplexen (Marion *et al.*, 1997; Twu *et al.*, 2007).

Viren mit verkürztem oder deletiertem NS1 sind attenuiert in IFN- α/β -kompetenten Zellsystemen, was die Bedeutung des NS1-Proteins bei der Inhibierung der Interferon-vermittelten Immunantwort demonstriert (Garcia-Sastre *et al.*, 1998; Kochs *et al.*, 2007). Weiterhin wurde das NS1-Protein des humanen H5N1-Isolates von 1997 (Hk97) in Reassortment-Studien mit einer Zunahme der Virulenz im Schwein und einer Resistenz gegenüber den entzündungsfördernden Zytokinen IFN und TNF α in Zusammenhang gebracht (Seo *et al.*, 2002). Umgekehrt konnte das Einfügen des NS1-Segmentes eines niedrig-pathogenen in ein hoch-pathogenes H5-Virus zu dessen Attenuierung im Huhn führen (Zhu *et al.*, 2008). Dem NS1-Protein des pandemischen Virus von 1918 konnten ebenfalls Virulenz-steigernde Eigenschaften nachgewiesen werden (Geiss *et al.*, 2002).

Untersuchungen von Jackson *et al.* (2008) konnten außerdem zeigen, dass die letzten vier Aminosäuren am C-Terminus des NS1-Proteins eine positive Auswirkung auf das Virulenz-Potential von Maus-adaptierten H1N1-Influenza-Viren haben. Die genauen Ursachen hierfür sind noch unbekannt, der Effekt scheint aber Virus- und Wirts-abhängig zu sein (Zielecki *et al.*, 2010).

1.6.5 PB1-F2

Das PB1-F2-Protein ist ein 87 bis 90 Aminosäuren großes, nicht-essentielles Protein, das als Virulenzfaktor bei der Pathogenese der Influenza-A-Viren eine Rolle spielen kann.

Dies ist jedoch, wie verschiedene Studien nahe legen, Virusstamm-spezifisch und trifft nicht auf alle Influenza-Viren zu (Hai *et al.*, 2010; McAuley *et al.*, 2010).

Nahezu alle aviären Influenza-Stämme exprimieren das PB1-F2 als Volllängen-Protein (Zell *et al.*, 2007). Im Zuge der Anpassung eines aviären Influenza-Virus an einen humanen oder porcinen Wirt kommt es oftmals durch das Einfügen eines oder mehrerer Stop-Codons zur Ausbildung einer verkürzten PB1-F2-Variante (Zell *et al.*, 2007; McAuley *et al.*, 2010). Die Expression und die Funktion des PB1-F2-Proteins können jedoch nicht nur zwischen verschiedenen Viren variieren sondern hängen auch stark von dem jeweiligen Zelltyp ab. So induziert PB1-F2 den Zelltod in Immunzellen, aber nicht in Epithelzellen (Zell *et al.*, 2007). Die pro-apoptotische Eigenschaft des PB1-F2-Proteins korreliert hauptsächlich mit dessen Wechselwirkung mit den mitochondrialen Proteinen ANT3 (adenine nukleotide translocator) und VDAC1 (voltage-dependent anion channel). Dies hat eine Schädigung der Mitochondrien zur Folge, wodurch Cytochrom c austritt und ins Zytoplasma gelangt. Auf diese Weise werden apoptotische Signalwege in Gang gesetzt (Zamarin *et al.*, 2005). PB1-F2 besitzt ebenfalls einen entzündungsstimulierenden Effekt, der u. a. die Etablierung von bakteriellen Sekundärinfektionen begünstigen kann. So wurde eine erhöhte Zahl von Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen in der bronchoalveolaren Flüssigkeit von Mäusen mit der Expression dieses Proteins in Verbindung gebracht (McAuley *et al.*, 2007). Einen positiven Einfluss auf die Polymerase-Aktivität und die Replikationsfähigkeit von Influenza-Viren konnte einer Interaktion des PB1-F2-Proteins mit der Polymerase-Untereinheit PB1 zugeschrieben werden (Mazur *et al.*, 2008). Ob dies jedoch von Relevanz für das Virulenzpotential von Influenza-Viren ist, wird angezweifelt (McAuley *et al.*, 2010).

Das Vorhandensein der Aminosäure Serin an Position 66 des PB1-F2-Proteins konnte als wesentlicher Virulenzfaktor für ein hoch-pathogenes H5-Virus und das pandemische H1N1-Virus von 1918 identifiziert werden. Die Mutation N66S hat eine signifikante Bedeutung für die Virulenz dieser Viren und erhöht deren Morbidität und Mortalität im Mausmodell (Conenello *et al.*, 2007). Da die Mutation innerhalb der MTS-Region (mitochondrial targeting site) des PB1-F2-Proteins liegt, könnte dem eine veränderte Wechselwirkung mit den mitochondrialen Proteinen ANT3 und VDAC1 zu Grunde liegen.

1.7 Interaktionspartner der viralen Ribonukleoprotein-Komplexe

1.7.1 Virale Interaktionspartner

Allein innerhalb der viralen Ribonukleoproteinkomplexe der Influenza-A-Viren existieren vielfältige Proteinwechselwirkungen. So interagiert das zentrale Polymeraseprotein PB1 sowohl mit PB2 als auch mit PA und die NP-Moleküle interagieren untereinander und mit den beiden Polymeraseproteinen PB1 und PB2 (Biswas *et al.*, 1998; Medcalf *et al.*, 1999). Protein-Wechselwirkungen konnten zudem zwischen den vRNP-Komplexen und anderen viralen Proteinen wie NS1, M1 und indirekt NEP nachgewiesen werden. NS1 bindet wahrscheinlich an die virale RNA im vRNP, da eine Bindung von NS1 an eines der drei Polymeraseproteine nicht eindeutig gezeigt werden konnte (Marion *et al.*, 1997). Die biologische Funktion der vRNP/NS1-Interaktion ist bisher noch nicht bekannt. Das Matrixprotein bindet mit seiner C-terminalen Domäne an die vRNP-Komplexe und mit seiner N-terminalen Domäne an den C-Terminus des NEP. Dadurch wird das NLS-Signal im M1 maskiert (Boulo *et al.*, 2007). Der N-Terminus des NEP enthält ein nukleäres Exportsignal (O'Neill *et al.*, 1998). Er interagiert mit dem zellulären Exportprotein CRM1 (chromosome region maintenance protein 1), das wiederum im Zusammenspiel mit RanGTP (GTP assoziierte GTPase) den Transport der vRNP-Komplexe in das Zytoplasma ermöglicht (Digard *et al.*, 1999; Akarsu *et al.*, 2003; Boulo *et al.*, 2007).

1.7.2 Zelluläre Interaktionspartner

Zahlreiche zelluläre Proteine konnten bisher als Interaktionspartner der viralen RNP-Komplexe identifiziert werden. Darunter sind vor allem solche Proteine, die eine Rolle bei der Transkription und beim Spleißen von zellulären mRNAs spielen, aber auch Proteine, die die Chromatin- und Nukleolusstruktur bilden und an der Proteinfaltung oder am Transport von mRNA-Molekülen und Proteinen beteiligt sind. Tabelle 1.2 gibt einen exemplarischen Überblick über bis dato bekannte Wirtszell-Proteine und ihre Funktion.

Die viralen RNP-Komplexe nutzen die Wirtszellproteine für ihre eigene Transkription und Replikation. So ist beispielsweise eine Bindung der vRNPs an die Histon-Enden der Nukleosomen beschrieben, was eine Veränderung der Chromatin-Struktur und des Transkriptions-Musters nach sich zieht (Garcia-Robles *et al.*, 2005). Da die Transkription der Influenza-Gene aufgrund des „Cap-snatching“-Mechanismus von dem Vorhandensein zellulärer mRNAs abhängig ist, ist infolgedessen eine Stimulation der zellulären Transkription in einem frühen Infektionsstadium sehr förderlich. Auf der anderen Seite ist

eine Assoziation der viralen RNA-Polymerase mit der C-terminalen Domäne der zellulären RNA-Polymerase II beschrieben, welche zu einer Inhibierung und Degradation der letzteren führt (Chan *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2007). Dadurch wird insbesondere die Synthese wichtiger Bestandteile des angeborenen Immunsystems unterbunden, ein weiterer Vorteil für die Virusvermehrung. Vreede *et al.* (2010) konnten zeigen, dass der Abbau der RNA-Polymerase II vorwiegend zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion beginnt und dass dies eventuell die Ursache für die drastische Abnahme der viralen mRNA-Produktion im späteren Infektionsstadium sein könnte.

Die Influenza-A-Viren sind dazu in der Lage, die in der Wirtszelle ablaufenden Prozesse optimal zu ihren Gunsten zu nutzen und zu manipulieren. Vor diesem Hintergrund ist es nachvollziehbar, dass schon einzelne Punktmutationen in den Polymerase-Genen über eine veränderte Interaktion mit zellulären Proteinen eine erhebliche Auswirkung auf den viralen Replikationszyklus und somit auch auf die Virulenz der Viren haben können. Vor allem ist dies aber auch für die Anpassung von Influenza-A-Viren an einen neuen Wirt von entscheidender Bedeutung.

Tabelle 1.2: Zelluläre Interaktionspartner der viralen Ribonukleoprotein-Komplexe*

Wirtsfaktor	Interaktion mit	Funktion	Referenz
F-Aktin	NP	Zytoskelett-Protein	Digard <i>et al.</i> , 1999
ATP-abhängige DNA-Helikase II	vRNP	Helikase	Mayer <i>et al.</i> , 2007
BAT 1/UAP56	vRNP	nukleäre RNA-Helikase	Momose <i>et al.</i> , 2001
B23	vRNP	Chaperon-Protein im Nukleolus	Mayer <i>et al.</i> , 2007
DDB1	vRNP	DNA-bindendes Protein, Centromer-assoziiert	Mayer <i>et al.</i> , 2007
Ebp1	PB1	nukleäres Protein der PA2G4-Familie	Honda, 2008
hCLE	PA	mRNA Transkriptions-Modulator	Huarte <i>et al.</i> , 2003
EWS	vRNP	RNA-bindendes Protein, vermutlich wichtig für Transkription u. Spleißen	Mayer <i>et al.</i> , 2007
hnRNP A1, M	vRNP	Spleißosom-Faktor	Mayer <i>et al.</i> , 2007
Histon-Enden	NP	Verpackung von DNA in Nukleosomen	Garcia-Robles <i>et al.</i> , 2005
Hsp70	vRNP	Chaperon-Protein	Hirayama <i>et al.</i> , 2004
Hsp90	PB2	Chaperon-Protein	Momose <i>et al.</i> , 2002 Naito <i>et al.</i> , 2007

EINLEITUNG

Wirtsfaktor	Interaktion mit	Funktion	Referenz
ILF3	vRNP	reguliert Transkription	Mayer et al., 2007
Importin α 1	NP	nukleärer Importfaktor	Wang <i>et al.</i> , 1997 Gabriel <i>et al.</i> , 2008b
Importin α 2	vRNP	nukleärer Importfaktor	Mayer et al., 2007
MCM	PA	DNA-Helikase	Kawaguchi und Nagata, 2007
NPCs	vRNP	Kernporen-Proteine	Babcock <i>et al.</i> , 2004
Nucleolin	vRNP	multifunktionelles Nukleolus-Protein	Mayer et al., 2007
PABP1	vRNP	nukleocytoplasmatisches Shuttleprotein für mRNA- Moleküle	Mayer et al., 2007
PARP 1	vRNP	Chromatin-assoziiertes Enzym poly(ADP-ribose) polymerase	Mayer et al., 2007
RanBP5	PB1	nukleärer Importfaktor	Deng <i>et al.</i> , 2006
RNA Polymerase II	vRNP	Synthese zellulärer mRNA	Engelhardt <i>et al.</i> , 2005
SFR3	vRNP	Spleißfaktor	Mayer et al., 2007
TIF1-beta	vRNP	Transkriptions-Regulator	Mayer et al., 2007

* modifiziert nach Josset *et al.*, 2008

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen können verschiedene Methoden zur Anwendung kommen. Zum einen werden Proteininteraktionen mit Hilfe sogenannter „Affinitätstags“ untersucht. Dies sind Peptide oder Proteine, die in das zu untersuchende Zielprotein integriert werden können. Mit Hilfe einer geeigneten Affinitäts-Matrix kann das rekombinante Zielprotein inklusive assoziierter Proteine über den „Tag“ spezifisch aufgereinigt werden. Ein idealer Affinitätstag sollte bestimmte Kriterien erfüllen. Er sollte eine effiziente und spezifische Aufreinigung des Zielproteins unter physiologischen Bedingungen ermöglichen, nicht mit der Proteinfunktion interferieren und die Aufreinigung sollte möglichst kostengünstig erfolgen. Beispiele für häufig verwendete Affinitätstags sind: FLAG-tag, *Strep*-tag, His-tag, MBP-tag, GST-tag, TAP-tag (Terpe, 2003; Berggard *et al.*, 2007). Dabei stellt der TAP-tag eine Kombination von zwei Affinitätstags dar, zwischen denen sich eine Spaltstelle für die TEV-Protease (tobacco etch virus) befindet (Rigaut *et al.*, 1999). Dies erlaubt eine hoch-spezifische Aufreinigung des Zielproteins.

Weitere Techniken, die für die Detektion von Proteininteraktionen verwendet werden können, sind z. B. der „BiFC-Assay“ und das „Yeast-two-hybrid“-System (Young, 1998;

Hu *et al.*, 2002). Die BiFC-Methode (bimolecular fluorescence complementation) eignet sich hervorragend für die Analyse von transienten Wechselwirkungen. Außerdem können sogar Interaktionen zwischen mehreren Proteinen gleichzeitig untersucht werden (Hu und Kerppola, 2003). Das „Yeast-two-hybrid“-System wird vor allem für Hoch-Durchsatz-Suchen nach potentiellen Interaktionspartnern eines Zielproteins eingesetzt. Während jedoch mit BiFC praktisch das Interaktom jedes Zelltyps und Organismus analysiert werden kann, sollten für „Yeast-two-hybrid“-Studien nur robuste Zellen wie Hefezellen oder *Escherichia coli* benutzt werden.

Eine andere Methode, mit der nicht direkt Protein-Protein-Interaktionen analysiert werden, sondern vielmehr untersucht wird, ob ein bestimmtes Protein in einem bestimmten Prozess – wie z. B. dem Replikationszyklus von Influenza-Viren – eine Rolle spielt, ist das „RNAi-Screening“. Mit Hilfe des „RNAi-Screenings“ konnten kürzlich in zwei Hoch-Durchsatz-Verfahren mehrere tausend humane Gene im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Vermehrung von Influenza-A-Viren untersucht werden (Karlas *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010). Dabei wurden jeweils mehrere hundert Gene identifiziert und verifiziert, deren Inhibierung eine signifikant veränderte Virusreplikation nach sich zog.

1.8 Reverse Genetik

Die Entwicklung der reversen Genetik für Influenza-Viren war ein entscheidender Schritt in der Influenza-Forschung. Sie ermöglicht es, jede gewünschte Veränderung im Virusgenom einzufügen und deren Auswirkung auf den Phänotyp zu untersuchen. Eine derzeit angewendete Methode zur Herstellung eines revers-genetischen Systems für Influenza-Viren beruht auf den Arbeiten von Hoffmann *et al.* (2000) und Stech *et al.* (2008). Dabei wird jedes der acht Gensegmente in den Plasmidvektor pHW2000 bzw. pHWS*ccdB*, einer abgewandelten Variante des pHW2000, kloniert. Nach Transfektion der acht Plasmide in Zellkultur können replikationsfähige Viren generiert werden.

Der pHW2000-Vektor ist von dem Expressionsplasmid pcDNA3 abgeleitet und besitzt Promotoren für die zellulären RNA-Polymerasen I und II sowie einen RNA-Polymerase I - Terminator und ein Polyadenylierungssignal. Der alternative Vektor pHWS*ccdB* enthält zusätzlich das Selektionsgen *ccdB*, das außerdem von den konservierten Gensegment-Enden der Influenza-Viren flankiert wird. Die Influenza-Gensegmente werden, nachdem sie in cDNA umgewandelt und per PCR vervielfältigt wurden, so in den jeweiligen Vektor kloniert, dass sie von beiden Promotoren flankiert werden. Auf diese Weise kann von

einem Plasmid-Konstrukt zugleich die jeweilige virale mRNA und vRNA synthetisiert werden (Abbildung 1.3B). Die Klonierungsmethode nach Stech *et al.* (2008) ist unabhängig von Restriktionsenzymen und erfolgt mittels einer modifizierten QuickChange-Reaktion (Geiser *et al.*, 2001). Dazu werden unter Verwendung genspezifischer Primer, die als universell für eine Vielzahl von Influenza-Subtypen angesehen werden können, die zuvor in cDNA umgeschriebenen Gensegmente amplifiziert (Stech *et al.*, 2008). Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind derart gestaltet, dass sie an ihren 5'-Enden jeweils 13 Nukleotide aufweisen, die homolog zu der Region im pHWS*ccdB* Vektor sind, in die das PCR-Produkt eingefügt werden soll (Abbildung 1.3A). Daran schließen sich Sequenzen an, die den konservierten Segmentenden entsprechen und für jedes Segment und bei allen Influenza-Viren identisch sind. Darauf folgen letztendlich 2 bis 8 Nukleotide, die segmentspezifisch sind. Die beiden Stränge des mit Hilfe dieser Primer amplifizierten PCR-Produktes dienen im Folgenden als Megaprimers. Über die homologen Bereiche an beiden Enden des PCR-Produktes hybridisiert dieses im Verlaufe der modifizierten QuickChange-Reaktion mit den dazu komplementären Regionen im Plasmid. Das *ccdB* Gen fungiert dabei als negativer Selektionsmarker und Platzhalter (Abbildung 1.3A). Die Produkte der QuickChange-Reaktion sind zirkuläre relaxierte Moleküle mit Strangbrüchen, die nach Transformation in kompetente Bakterien „repariert“ und vermehrt werden können.

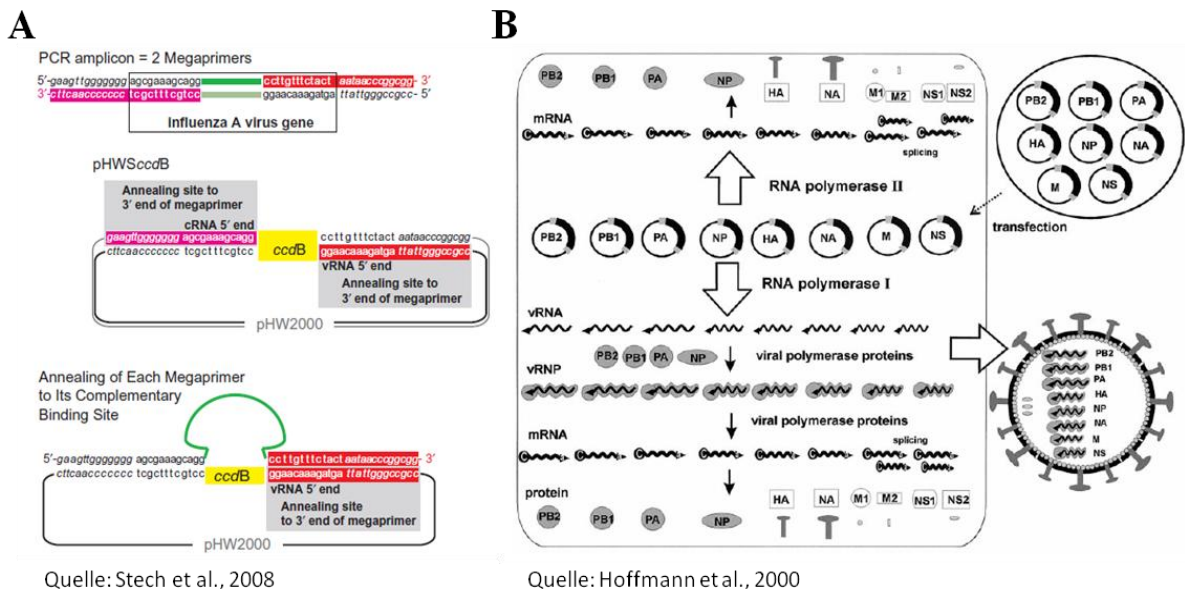


Abbildung 1.3: (A) Restriktionsenzym-unabhängige Klonierung viraler Gensegmente in pHWS*ccdB* mittels QuickChange-Reaktion nach Stech *et al.* (2008) (B) Herstellung infektiöser Viren nach Transfektion des 8-Plasmid-Satzes in HEK-293T-Zellen (Hoffmann *et al.*, 2000).

Auf die hier beschriebene Weise kann prinzipiell jede erdenkliche Klonierung vorgenommen werden, ohne dass man eine aufwendige Suche nach passenden Restriktionsenzymen oder eine notwendige Mutagenese unerwünschter, interner Restriktionsschnittstellen durchführen muss. Limitationen der Methode sind höchstens in der Größe des zu klonierenden Fragmentes oder in der Vektorsequenz, die unter Umständen stark redundante Sequenzbereiche aufweisen kann, gegeben. Diese können mit Hilfe einer geeigneten Polymerase mit hoher Prozessivität und Reparaturmechanismus überwunden werden. Eine weitere Vereinfachung der Klonierungsmethode nach Stech *et al.* (2008) konnte durch eine Verkürzung der Primerpaare erzielt werden, indem die segmentspezifischen Sequenzen an den 3'-Enden der Primer entfernt wurden. Mit dem so generierten Primerpaar können 4 der 8 Gensegmente in nur einem PCR-Ansatz vervielfältigt werden (Kreibich *et al.*, 2009).

1.9 Therapie und Prophylaxe

1.9.1 Antivirale Substanzen

Im Zuge der therapeutischen Behandlung einer Influenza-Infektion mit antiviralen Substanzen kommen derzeit vier verschiedene Wirkstoffe zum Einsatz, die an zwei Punkten im Lebenszyklus der Influenza-A-Viren eingreifen. Dazu gehören zum einen die Neuraminidase-Hemmstoffe Oseltamivir und Zanamivir, auch unter den kommerziellen Namen Tamiflu und Relenza bekannt. Sie hemmen die Neuraminidase-Aktivität und verhindern somit eine Virusausbreitung im Organismus (Calfée und Hayden, 1998). Zum anderen sind die M2-Ionenkanal-Blocker Amantadin und Rimantadin zur Bekämpfung von Influenza-Infektionen auf dem Markt erhältlich. Sie inhibieren den Einstrom von Protonen in das Virusinnere und auf diese Weise die Freisetzung der vRNP-Komplexe in das Zytoplasma („Uncoating“). Auch der Transport viraler Proteine über das ER und den Golgi-Apparat wird beeinträchtigt, so dass die Bildung infektiöser Partikel unterbunden wird (Wharton *et al.*, 1994; Sakaguchi *et al.*, 1996).

Mittlerweile gibt es zahlreiche Influenza-A-Viren, die gegen Amantadin, Tamiflu oder sogar gegen beide Wirkstoffe resistent sind (Cheng *et al.*, 2009a). Aus diesem Grund kommt der Identifizierung neuer antiviraler Substanzen, die möglichst gegen eine Vielzahl von Influenza-Viren eingesetzt werden können, eine außerordentliche Bedeutung zu. Potentielle Angriffspunkte sind hierbei nicht nur die viralen Proteine (Wunderlich *et al.*, 2009; Boltz *et al.*, 2010; Sleeman *et al.*, 2010) sondern auch zelluläre Proteine, die im

Replikationszyklus als Wirtsfaktoren eine Rolle spielen (Karlus *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010).

1.9.2 Impfstoffe

1.9.2.1 Inaktivierte Impfstoffe

Inaktivierte Impfstoffe gegen Influenza-A-Viren sind zum einen effektiv, zum anderen kann ihre Herstellung aber sehr zeit- und kostenintensiv sein. Die Influenza-Viren werden zunächst in embryonierten Hühnereiern angezogen, über Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und mit Formalin oder β -Propiolakton inaktiviert. Die Viruspartikel können anschließend durch chemische Behandlung mit Detergenzien wie Triton-X-100 aufgeschlossen und so gereinigt werden, dass nur noch die Oberflächenantigene erhalten bleiben. Es hat sich herausgestellt, dass diese so genannte „Subvirion“-Vakzine weniger pyrogen ist als inaktivierte Komplet-Virus-Präparationen (Palese, 2006). Sollte sich ein Virus nicht zu hohen Titern im Ei vermehren lassen oder letal für den Embryo sein, so werden in der Regel Reassortanten generiert, die die Gene für Haemagglutinin und Neuraminidase des entsprechenden Virus und die restlichen Gene eines gut im Ei replizierenden Stammes (z. B. A/PR/8/34 (H1N1)) tragen. Dem folgen zu Adaptationszwecken und zur Wachstumsverbesserung zumeist mehrere Ei-Passagen.

Im Fall der Influenza-A-Viren ist das Haupt-Immunogen das Haemagglutinin, das die Bildung neutralisierender Antikörper, bei inaktivierten Impfstoffen hauptsächlich Serum-IgG, induziert. Ein erwachsener Mensch benötigt für eine protektive Immunantwort gegen eine Influenza-Infektion in etwa 15 μ g HA, was der Virusmenge in der Allantoisflüssigkeit eines Hühnereis entspricht (Kreijtz *et al.*, 2009).

Die jährliche Gripeschutzimpfung setzt sich aus drei verschiedenen inaktivierten Viren zusammen: einem H3N2 Stamm, einem H1N1 Stamm sowie einem Influenza-B-Virus. Die Wahl der Impfkomponten hängt von der Empfehlung der WHO ab, die ihre Prognose auf der Basis epidemiologischer Daten erhebt. Je höher die Übereinstimmung der von der WHO empfohlenen Viren mit den sich tatsächlich in der Folgesaison durchsetzenden Viren, desto besser ist die Schutzwirkung der Dreifachvakzine (Palese und Garcia-Sastre, 2002). Eine hohe Kreuzprotektivität ist von den inaktivierten Influenza-Impfstoffen allerdings nicht zu erwarten.

1.9.2.2 Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe basieren auf Viren, deren Replikationsfähigkeit *in vivo* aufgrund von Mutationen in den internen Genen deutlich eingeschränkt ist. Diese so genannten lebend-attenuierten Influenza-Viren (LAIV) können nach nasaler Applikation gezielt den Respirationstrakt infizieren und dort die lokale mukosale Immunität hauptsächlich in Form von IgA, aber auch IgG, sowie die zelluläre Immunität stimulieren. Im Vergleich zu inaktivierten Vollvirus-Impfstoffen ist die Lebendimpfstoff-vermittelte Immunität länger anhaltend und die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzprotektivität weitaus höher (Palese, 2006). Bei beiden Impfstoff-Klassen werden nicht nur Antikörper gegen die Oberflächenproteine HA und NA gebildet sondern auch gegen interne hoch-konservierte Proteine wie NP, M1 oder M2. Diese sind zwar nicht neutralisierend, können aber einen Beitrag zur Eindämmung der Virusausbreitung bei einer Influenza-Infektion leisten (Lee und Suarez, 2005; Johansson und Brett, 2007).

Die einzige von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA bisher zugelassene Lebendvakzine verwendet eine kälte-adaptierte Variante des humanen Stammes A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) als Donor-Virus. Dieses wurde mehrmals in Zellkultur bei niedrigen Temperaturen passagiert (Kendal *et al.*, 1973). Das daraus hervorgegangene Virus repliziert sehr gut bei 25°C, reagiert bei 37-39°C Temperatur-sensitiv und zeigt einen attenuierten Phänotyp im Respirationstrakt von Frettchen (Snyder *et al.*, 1988; Subbarao *et al.*, 1993b). Reassortanten, die die sechs internen Gene des Donor-Virus und die Gene für HA und NA eines zirkulierenden Virus tragen, weisen ebenfalls die zuvor beschriebenen Eigenschaften auf. Sie sind genetisch stabil und damit sicher, hoch-immunogen und bieten einen effektiven Schutz vor einer Infektion mit dem jeweiligen Wildtyp-Virus (Snyder *et al.*, 1988).

Mit Hilfe der Reversen Genetik konnten alternative potentielle Lebendimpfstoffe entwickelt werden. Ein herausragendes Beispiel hierfür sind Viren mit einer Deletion im NS1-Protein (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Viren mit C-terminal verkürztem NS1 sind attenuiert in Mäusen und induzieren eine potente Immunantwort (Talon *et al.*, 2000b). Diese beruht auf der ungehemmten Produktion von Interferon α/β in Epithelzellen des Respirationstraktes und einer Stimulation sowie Reifung von infizierten dendritischen Zellen, die wiederum eine Aktivierung der adaptiven Immunabwehr zur Folge hat (Richt und Garcia-Sastre, 2009). Andere Arbeitsgruppen konnten die erfolgreiche Anwendung von NS1-Deletionsviren als Lebend-Vakzine nicht nur im Mausmodell (Falcon *et al.*,

2005) sondern auch im Schwein (Richt *et al.*, 2006), Pferd (Chambers *et al.*, 2009) und Huhn (Steel *et al.*, 2009) bestätigen.

Eine weitere Methode zur Generierung von attenuierten Viren liegt in der Veränderung der Haemagglutinin-Spaltstelle. Der Austausch der Trypsin- oder Furin-abhängigen HA-Spaltstelle mit einer Spaltstelle für eine im Wirtsorganismus nur begrenzt vorkommende Protease wie Elastase führt zur Attenuierung des rekombinanten Virus *in vivo* (Stech *et al.*, 2005). In Zellkultur kann das Virus durch Zugabe von Elastase in das Medium normal replizieren, so dass ausreichende Mengen an Impfvirus produziert werden können. Die Grundidee für die Verwendung der Spaltstellen-Mutante als Vakzine ist, dass diese lediglich einen Replikationszyklus im Wirt durchläuft und dadurch sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert. Der erfolgreiche Einsatz einer Elastase-abhängigen Virusmutante als Lebendimpfstoff ist für die Maus und das Schwein beschrieben (Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009b). In beiden Tiermodellen konnte ein vollständiger Schutz gegen eine Infektion mit dem entsprechenden Wildtyp-Virus und sogar eine partielle bis vollständige Kreuzprotektivität gegen ein homo- und hetero-subtypisches Virus erreicht werden.

Weitere Ansätze für lebend-attenuierte Viren, die nur zu einem Replikationszyklus *in vivo* befähigt sind, sind Viren mit einer Deletion des NEP oder des M2-Proteins (Watanabe *et al.*, 2001; 2002).

1.9.2.3 Vektor-Impfstoffe

Geeignete Vektoren für die Expression von Influenza-Antigenen, deren Schutzwirkung im Tier eingehend untersucht worden ist, sind: replikations-defiziente Adenoviren, Alphavirus-Replikonsysteme, modifiziertes Vaccinia-Virus, Newcastle Disease Virus (NDV), infektiöses Laryngotracheitis-Virus (ILTV) und Baculoviren (Crawford *et al.*, 1999; Schultz-Cherry *et al.*, 2000; Veits *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Kreijtz *et al.*, 2007). Auf das jeweilige Funktionsprinzip soll im Folgenden nicht weiter eingegangen werden.

Das am häufigsten in einen Virusvektor integrierte Antigen ist das Haemagglutinin. Versuche mit der Neuraminidase, dem M2-Protein und auch einer Kombination von HA mit NA, NP oder M1 wurden ebenfalls durchgeführt (Brett und Johansson, 2005; Tompkins *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2009).

Das Hauptproblem bei der Verwendung von Vektor-Impfstoffen ist eine eventuell bereits vorhandene Immunität des Organismus gegenüber dem verwendeten Vektor. Da das rekombinante Vektorvirus sofort vom Immunsystem eliminiert werden würde, wäre kein Aufbau einer Immunität gegen das Fremd-Antigen möglich.

1.9.2.4 Universelle Influenza-Vakzine

Die Entwicklung einer universellen Influenza-Vakzine, die einen effektiven Schutz gegen ein breites Spektrum von Influenza-A-Viren liefert, wäre ein bedeutender Schritt in der Impfstoffforschung. Bestrebungen in diese Richtung umfassen u. a. die Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln, in deren Membran rekombinante HA-Moleküle eingebaut sind, die aus dem HA2 sowie der hoch-konservierten Stieldomäne des HA1 bestehen (Steel *et al.*, 2010). Antikörper gegen die HA1-Stieldomäne besitzen eine neutralisierende Wirkung (Ekiert *et al.*, 2009). Sie konnten sich entsprechend *in vivo* als protektiv gegenüber einer Infektion mit dem homologen Virus erweisen und zeigten *in vitro* einen kreuz-neutralisierenden Effekt (Steel *et al.*, 2010).

Die zweifache Immunisierung von Mäusen, Frettchen und Affen, initial mit einer H1-DNA-Vakzine gefolgt von der Applikation eines saisonalen Grippe-Impfstoffes, vermittelte ebenfalls eine optimale Immunität gegen eine Vielzahl von Influenza-Viren des Subtyps H1N1 (Wei *et al.*, 2010). Der Erfolg des „Prime-Boost“-Szenarios basiert auf der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen die hoch-konservierte Stiel-Domäne des HA1.

1.9.2.5 Impfstoffe gegen Aviäre Influenza

Eine Vakzinierung von Hausgeflügel gegen aviäre Influenza (AI) wird in vielen Ländern wie den Vereinigten Staaten bisher nur begrenzt durchgeführt (Lee und Suarez, 2005). In Deutschland wird die Impfung gegen die Geflügelpest (HPAIV) und niedrig pathogene Influenzaviren der Subtypen H5 und H7 durch die Geflügelpestverordnung §8 grundsätzlich untersagt (Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung) GeflPestSchV in der Fassung vom 18.12.2009). Doch immer häufiger kommt es zu Einträgen von Influenza-A-Viren in Geflügelbestände, die wirtschaftlichen Schäden sind enorm (Capua und Alexander, 2004). Deshalb erhalten Impfstoffe für die Bekämpfung der aviären Influenza wachsenden Zuspruch (Lee und Suarez, 2005).

Der Einsatz von Impfstoffen gegen LPAIV ist für Truthähne gegen Viren der Subtypen H1, H2, H6 und H9 und für Hühner gegen H6N2 belegt (Lee und Suarez, 2005). Eine Vakzinierung gegen niedrig-pathogene H5- und H7-Viren wird in der Regel nicht empfohlen, da die Gefahr einer nicht-detektierbaren Entstehung hoch-pathogener Influenza-Stämme und potentiell gefährlicherer Reassortanten gegeben ist. Nichtsdestotrotz wurden solche Impfkampagnen z. B. gegen H7N2 in Truthähnen in den USA erfolgreich durchgeführt (Tumpey *et al.*, 2004).

Beim Auftreten von HPAIV-Infektionen im Geflügel werden in der Regel alle Tiere eines infizierten Bestandes und die der umliegenden Betriebe getötet („Stamping out“). In Deutschland werden zudem alle Tiere eines Bestandes beim Eintrag von niedrig-pathogenen H5- und H7-Viren gekeult. Die entsprechenden Bekämpfungsmaßnahmen sind in beiden Fällen durch die Geflügelpestverordnung §19 und §46 geregelt (Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung) GeflPestSchV in der Fassung vom 18.12.2009). Das „Stamping out“ wird, obwohl sehr effektiv was die Virus-Eindämmung betrifft, durchaus kontrovers diskutiert und ist sehr kostenintensiv. Nicht in allen Ländern, in denen es betrieben wird, bekommen die Besitzer eines Bestandes eine angemessene Entschädigung. Des Weiteren besteht auch für den Menschen ein erhöhtes gesundheitliches Risiko, wenn er auf engem Raum mit infizierten Tieren zusammen lebt oder arbeitet, wie es in vielen Entwicklungsländern der Fall ist. Demzufolge ist auch hier der Bedarf eines effektiven Impfstoffes sehr groß, wenn auch nicht als alleinige Bekämpfungsstrategie, so doch zumindest als zusätzliches Hilfsmittel zur Kontrolle von HPAIV-Ausbrüchen (Capua und Marangon, 2007).

Eine optimale Geflügel-Vakzine sollte verschiedene Kriterien erfüllen. Sie sollte eine Erkrankung der Tiere verhindern, die Virusausscheidung signifikant reduzieren und dazu führen, dass eine viel höhere Virusmenge nötig wäre, um ein Tier zu infizieren. Außerdem sollte sie eine DIVA-Diagnostik (differentiation of infected from vaccinated animals) ermöglichen. Bisher verwendete Geflügel-Vakzinen gegen Influenza-Viren sind konventionelle inaktivierte Impfstoffe, die für die DIVA-Diagnostik allerdings nicht geeignet sind, da sie genetisch und immunologisch nicht von einer Infektion mit dem Wildtypvirus zu unterscheiden sind. Das Beistellen nicht-geimpfter Sentinel-Tiere wäre eine Lösung, ist aber eher unpraktisch (Capua und Marangon, 2007). Die Verwendung eines rekombinanten, HA-exprimierenden, aviären Virus als Vektor, wie z.B. das Vogelpocken-Virus, NDV oder ILTV, wurde in verschiedenen Studien getestet (Veits *et*

al., 2003; Park *et al.*, 2006; Steensels *et al.*, 2007). Mit Hilfe eines NP-ELISA-Tests können sehr einfach und schnell geimpfte von infizierten Tieren unterschieden werden. Es ist jedoch zu beachten, dass eine protektive Immunität nur dann erreicht werden kann, wenn die Vogelspezies empfänglich für das als Vektor verwendete Virus ist. Die Entwicklung von Antikörpern gegen den Vektor bzw. das Vorhandensein maternaler Antikörper in jungen Hühnern können zudem unter Umständen mit der Impfung interferieren (Swayne *et al.*, 2000).

Dem bisher Aufgeführten ist zu entnehmen, dass die Neu- und Weiter-Entwicklung von Influenza-Impfstoffen, die effektiv, DIVA-geeignet, günstig und gut applizierbar sind, für die Geflügelwirtschaft dringend notwendig ist.

1.9.3 RNA-Technologie

RNA-Interferenz ist ein Prozess, in dessen Verlauf kurze RNA-Moleküle (siRNA und miRNA) den Sequenz-spezifischen Abbau von mRNA bewirken (Fire *et al.*, 1998). Es ist ein natürlicher Mechanismus, den der Organismus u. a. zur Bekämpfung von Virusinfektionen einsetzt (Baulcombe, 2002). Eine therapeutische Nutzung bei der Behandlung von Influenza-Infektionen auf Grundlage synthetisch hergestellter siRNA- oder miRNA-Moleküle bietet sich daher an. So konnten z. B. siRNA-Moleküle spezifisch für konservierte Regionen im M2-Protein und Nukleoprotein die Viruslast im Lungengewebe von Mäusen stark reduzieren und einen partiellen Schutz nach einer letalen Belastungsinfektion mit hoch-pathogenem H5N1 Virus gewährleisten (Zhou *et al.*, 2007). Eine weitere erfolgversprechende RNA-Technologie sind Morpholinos. Diese stellen synthetische, einzelsträngige Oligonukleotide mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 25 Basen dar, die als Nukleinsäure-Analoga die Expression von Genen gezielt ausschalten können (Summerton und Weller, 1997). Durch Bindung an ihre komplementären mRNA-Moleküle verhindern sie deren Translation oder das Spleißen der pre-mRNAs (Draper *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Wirkungsweise eignen sich Morpholinos als antivirale Substanzen. Eine Hemmung der Virusreplikation, u. a. auch die von Influenza-Viren (Gabriel *et al.*, 2008c), ist bereits vielfach beschrieben (Deas *et al.*, 2007; Swenson *et al.*, 2009; Anantpadma *et al.*, 2010). Der Vorteil der Morpholino-Moleküle gegenüber der RNAi-Technologie liegt in ihrer höheren Stabilität und längeren Halbwertszeit. Da sie keine RNase-Substrate darstellen, werden sie auch weniger schnell abgebaut als andere antisense-RNA-Moleküle.

1.10 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden drei Projekte bearbeitet. Das erste Projekt beschäftigte sich mit der Untersuchung von Proteininteraktionen zwischen den viralen Ribonukleoprotein-Komplexen (vRNP) von Influenza-A-Viren und Proteinen der Wirtszelle im Hinblick auf die Virus-Adaptation. Hierbei sollten mit Hilfe der reversen Genetik rekombinante Viren unterschiedlichen Wirtsspektrums (Vogel, Mensch, zoonotisch) mit einem *Strep*-tag im Polymeraseprotein PB2 generiert und *in vitro* charakterisiert werden. Anschließend sollte anhand eines ausgewählten Beispiels die Eignung der rekombinanten Viren als Werkzeug zur Detektion wirtsspezifischer Interaktionspartner der vRNP-Komplexe überprüft werden. Dazu sollten über das *Strep*-getagte PB2-Protein virale RNP-Komplexe aus infizierten Säuger- und Vogelzellen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die im Komplex mit dem *Strep*-PB2-Fusionsprotein isolierten viralen und/oder zellulären Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

Im Verlauf des zweiten Projektes sollte untersucht werden, ob im pandemischen Virus A/Hong Kong/1/68 (H3N2) (,Hk68‘) bestimmte Punktmutationen des Polymeraseproteins PB1, welches von einem aviären Stamm durch Reassortment erworben wurde, mit einer Adaptation an den humanen Wirt in Zusammenhang stehen. Zunächst sollten durch Sequenzvergleich des Hk68-PB1 mit dem PB1 des Virus A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) (,dUk‘) Unterschiede in der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Mittels gerichteter Mutagenese sollten diese Punktmutationen in das PB1 des dUk-Virus bzw. des Hk68-Virus eingefügt und homologe sowie heterologe RNP-Komplexe in Säugerzellen rekonstituiert werden. Die Aktivitätsbestimmung dieser Komplexe, die anhand eines Luciferase-Reportertests *in vitro* erfolgen sollte, sollte Aufschluss über das adaptive Potential der einzelnen PB1-Mutationen geben.

Im Zuge des dritten Projektes sollte eine Elastase-abhängige Spaltstellenmutante des HPAIV A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) (,R65‘) hergestellt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Huhn charakterisiert werden. Des Weiteren sollte die Immunogenität und Schutzwirkung bei homologer Belastungsinfektion sowie Kreuzprotektivität bei heterosubtypischer Belastungsinfektion und damit eine potentielle Anwendung der Mutante als Lebendimpfstoff im Huhn getestet werden. Neben einer okulonasalen Infektion von Eintagsküken sollte hierbei eine Infektion der R65-Mutante *in ovo* zur Anwendung kommen.

2. Material

2.1 Versuchstiere

White Leghorn Eintagsküken	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
White Leghorn Embryonierte Hühnereier	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven

Alle Versuchstiere entsprachen dem Status spezifiziert pathogen-frei (SPF).

2.2 Zelllinien

HEK293T	Humane Nierenepithelzelle	Zellbank, FLI Riems
A549	Humane Lungenepithelzelle	Zellbank, FLI Riems
MDCKII	Canine Nierenepithelzelle	Phillips Universität, Marburg Institut für Virologie
DF-1	Hühner Fibroblastenzelle	Zellbank, FLI Riems
MDCK-H	Canine Nieren-Epithelzelle ohne detektierbare Proteaseaktivität mit monobasischer Spezifität (Matrosovich <i>et al.</i> , 2003a)	Phillips Universität, Marburg Institut für Virologie
QM9	Fibrosarkom-Zellen aus Wachtel	Zellbank, FLI Riems

2.3 Virusstämme

A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	Wildtyp-Virus, Referenzlabor für Aviäre Influenza, FLI
A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7)	Wildtyp-Virus, Referenzlabor für Aviäre Influenza, FLI
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	Wildtyp-Virus, Referenzlabor für Aviäre Influenza, FLI

2.4 Revers-genetische und Rekombinante Viren

Ausgangsvirus	Beschreibung	Bezeichnung
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	keine Veränderung	Hk68
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	<i>Strep</i> -tag am C-Terminus von PB2	Hk68-C-Strep-PB2

MATERIAL

Ausgangsvirus	Beschreibung	Bezeichnung
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	<i>Strep</i> -tag am N-Terminus von PB2	Hk68-N- <i>Strep</i> -PB2
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	Mutation PB1 V12I	Hk68-PB1-12V/I
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	Reassortante Hk68 mit dUk-PB1	Hk68- PB1 _{dUk}
A/Hong Kong/1/68 (H3N2)	Reassortante Hk68 mit dUk-PB1-12I/V	Hk68-PB1 _{dUk} -12I/V
A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7)	keine Veränderung	Seal80
A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7)	<i>Strep</i> -tag am C-Terminus von PB2	Seal80-C- <i>Strep</i> -PB2
A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	keine Veränderung (Dr. O. Stech)	dUk
A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	<i>Strep</i> -tag am C-Terminus von PB2	dUk-C- <i>Strep</i> -PB2
A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)	Mutation PB1 I12V	dUk-PB1-12I/V
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	keine Veränderung (S. Gohrbandt)	rgR65
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	HA-Mutante S-ETR (Dr. S. Gohrbandt)	R65m
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	ETR-Spaltstelle, <i>Strep</i> -tag am C-Terminus von PB2	R65m-C- <i>Strep</i> -PB2
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	ETR-Spaltstelle, <i>Strep</i> -tag am N-Terminus von PB2	R65m-N- <i>Strep</i> -PB2
A/swan/Germany/R65/06 (H5N1)	Elastase-Spaltstelle	R65-E
A/Chicken/Emirates/R66/02 (H9N2)	keine Veränderung (Dr. S. Gohrbandt)	H9/R66
A/swan/Germany/R65/06 (H9N1)	Reassortante R65 mit H9 von R66 mit der R65-Spaltstelle RSSR-RRRKKR (Dr. S. Gohrbandt)	R65/H9 _{R66mutR65}

2.5 Bakterien

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> Top10 superkompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> SURE2 superkompetente Zellen	Stratagene, La Jolla, USA

2.6 Kits

Omniscript RT-Kit (50)	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR-Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin 96 RNA Kit	Macherey & Nagel, Düren
QIAfilter Plasmid Midi Kit (25)	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN, Hilden
BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing	ABI, Foster City, USA
Dual-Glo (R) Luciferase Test	Promega, Madison, USA
RNeasy RNA Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Sigma Spin TM Post-Reaction Clean-up Columns	Sigma, Taufkirchen
SuperScript TM III One-Step RT-PCR System with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Enzyme

<i>AarI</i> (2000 u/ml)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>DpnI</i> (20000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)
<i>EcoRI</i> (20000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)
Elastase (232 u/mg)	Serva, Heidelberg
<i>NheI</i> (50000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)
Phusion-Polymerase (2000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)
RNA-sin (40000 u/ml)	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase (400000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)
Trypsin, TPCK-behandelt (13500 u/mg)	Sigma, Taufkirchen
<i>XmaI</i> (10000 u/ml)	NEB, Frankfurt (Main)

2.8 Antibiotika

Ampicillin- Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Baytril 10%	BayerHealthCare, Leverkusen
Gentamycin 50	Medistar, Ascheberg
Lincomycin	CeVaSanteAnimale, Düsseldorf
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Taufkirchen

2.9 Antikörper und Seren

α -Strep-tagII, Kaninchen (polyklonal), 1:200-1:2500	GenScript, Piscataway, USA
α -PB2#20C, Maus, 1:50	Dr. J. Ortin, Madrid, Spanien
α -NP HB65, Maus (monoklonal), 1:20	Dr. E. Mundt, FLI, Riems
α -NP, Kaninchen (polyklonal), 1:5000	Dr. E. Mundt, FLI, Riems
α -Vaccinia-H5, Kaninchen (polyklonal), 1:20000	Dr. J. Veits, FLI Riems
α -Maus IgG HRP gekoppelt, Ziege, 1:10000	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen IgG HRP gekoppelt, Ziege, 1:10000	BioVision, San Francisco, USA
α -Maus Alexa Fluor [®] 488, Ziege, 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
α -Kaninchen Alexa Fluor [®] 594, Ziege, 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
α -Huhn Alexa Fluor [®] 488, Ziege; 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
α -H5N2 Serum, Huhn (TV02/06), 1:10	Dr. J. Veits, FLI Riems
α -ILTV Serum, Huhn (TV16/01), unverdünnt	Dr. J. Veits, FLI Riems
α -H9N2 Serum, Kaninchen (polyklonal), 1:10	Dr. T. Harder, FLI Riems

Die kommerziellen Antikörper wurden den Hersteller-Angaben entsprechend verdünnt.

2.10 Molekulargewichtsstandards

O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Benchmark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Benchmark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Plasmide und Nukleinsäuren

pHWSccdB2000	Dr. J. Stech, FLI Riems (Stech <i>et al.</i> , 2008)
pRL-CMV	Promega, Madison, USA
pPolI_LucRT	Dr. M. Schwemmle, Freiburg (Ghanem <i>et al.</i> , 2007)
pieLuc	Dr. G. Keil, FLI
pCAGGS-PA(WSN)-HA-tag	Dr. M. Schwemmle, Freiburg (Wunderlich <i>et al.</i> , 2009)
Kontroll-RNA IC2 (2x10 ⁵ Kopien/μl)	Hoffmann <i>et al.</i> (2006)

2.12 Primer

2.12.1 Primer für die universelle Klonierung von Influenza-A-Gensegmenten

Uni12	AGCAAAAGCAGG
pHW-PB2f	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTC
pHW-PB2-2341r	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT
pHW-PB1-17f	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGCAAAC
pHW-PB1-2341r	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGCATTT
pHW-PAf	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTAC
pHW-PA-2233r	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTA
pHW-HAf	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGG
pHW-NPf	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTA
pHW-NPr	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT
pHW-N67f	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTG
pHW-N67r	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG
pHW-N12458f	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGAGT
pHW-N12458r	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGAGT
pHW-Mf	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGTAG
pHW-Mr	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTAG
pHW-NSf	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTG
pHW-NSr	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG

2.12.2 Primer für die Genotypisierung von Influenza-A-Viren

M13-21-OUniPB2f	TGTAACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAAAAGCAGGTC
M13-rev-OUniPB2r	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGTACAGTGGAACAAGGTC
M13-21-OUniPB1f	TGTAACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAAAAGCAGGCA
M13-rev-OUniPB1r	CAGGAAACAGCTATGACC ATCTGTACAGTGGAACAAGGCA

MATERIAL

M13-21-OUniPAf	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGTAC
M13-rev-OUniPAr	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGT CACAGTGGAACAAGGTAC
M13-21-OuniNPf	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGGTA
M13-rev-OuniNPr	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGT CACAGTAGAAACAAGGGTA
M13-21-HAf	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGGG
M13-21-N12458f	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGAGT
M13rev-N12458r	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGT CACAGTAGAAACAAGGAGT
M13-21-OuniMf	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGTAG
M13-rev-OuniMr	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGT CACAGTAGAAACAAGGTAG
M13-21-OuniNSf	TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTCGAGAGCAA AAGCAGGGTG
M13-rev-OuniNSr	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGT CACAGTAGAAACAAGGGTG

Alle bisher aufgeführten Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und gemäß den Hersteller-Informationen auf eine Stock-Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

2.12.3 Primer für die Sequenzierung von Influenza-A-Gensegmenten und Plasmiden

pHW-F	CTCACTATAGGGAGACCC
pHW-R	GAGGTATATCTTTCGCTCC
NS-519	TGTCAAAAATGCAATTGGGG
NS-R537	CCAATTGCATTTTTGACATC
M-374	GCCAGTTGCATGGGCC
M-R384	CATGCAACTGGCAAGTGC
N2-542	TGTATAGCATGGTCCAGCTC
N2-R561	GAGCTGGACCATGCTATACAC
N2-1171	CACACCTAATTCCAAATCGC
N7-R381	CAATGCATACATCCTACACC
N7-R933	GATATTGACTTGTATGCTCC
N7-913	GGAGCATAACAAGTCAATATC
NP-406	CGTCAAGCAAATAATGGAG
NP-R511	CAGAGAGCACATTCTGGG
NP-R812	AGATCTTCAATTT CAGCATTC
NP-830	CTGCTTGTGTGTATGGAC
NP-1160	TGCTTCAAATGAGAACATGG
H3-517	AGACTGAACTGGTTGACC
H3-R593	TCAA AATTGTCATTGTTTGGC
H3-1059	CCTATTCGGCGCAATAGC
H3-R1059	CTCTAGTTTGTCTCTGG
H3-1422	AAGGAGGCAACTGAGGG
H3-R1414	ATGTCTTCAGCATTTTCC

MATERIAL

H5-471 GCTCAGCATGTCCATACCAGG
H5-1430 GTCCGACTACAGCTTAGGGAT
H7-R509 AATGCCGCATTGTCTGAATC
H7-601 ACCAGACTCTATGGAAGTG
H7-1457 AATGTATGGAGAGCATAAGG
PA-487 ATGGCCACTAAAGCAGAC
PA-525 CAGGGCTAGGATCAAAACC
PA-R533 CTTGCTCTACTCTCTTCATC
PA-R571 CCATCTCTTGTCTTATGGTG
PA-981 GCCTAACATTGTCAAGCCAC
PA-1057 CTGCAGGACATTGAAAATG
PA-R1348 TCATGCTTGCAATATGCTCG
PA-R1561 TCCTTAAGTGAGATCTTCC
PA-1574 TGGTAAACTTTGTGAGCATG
PA-1614 CAGATTAGAGCCACACAAG
PA-R1790 AGGGATTGAAGAAGGCATCG
PB1-586 ACCAAGAAAATGGTCACAC
PB1-R604 GTGTGACCATTTTCTTGGT
PB1-1151 TTGACCTGAAATATTTCAATG
PB1-R1173 CATTGAAATATTTTCAGGTCAA
PB1-1011 ACCTGAATGGTTCAGAAA
PB1-1602 GATAAACAATGACCTTGGAC
PB1- R1621 GTCCAAGGTCATTGTTTATC
PB1-1810 CCAAACCTATACAATATCCG
PB2-R268 GGCATCATTTGTTTTGCTCC
PB2-477 TCATGCAGACCTCAGTG
PB2-502 GCACAGGATGTAATCATGG
PB2-R578 GTTAATTGTGATTCCGACG
PB2-R600 GAATCTAGTTTTGCGGACC
PB2-611 CAAGATGTCATCATGGAGG
PB2-648 GGAAAGAGAGCTGGTTTCGC
PB2-900 GCAAGGCAGCAATGGGCTTGAGG
PB2-975 ACTGAGAATCAGCTCGTC
PB2-R1047 TCTCTTGATTGATGACCC
PB2-1100 GGAATTCACAATGGTTGGG
PB2-R1121 ATTGTGAATTCCTCATACCC
PB2-R1210 GGTTGCCTTTCTGAGGATAGC
PB2-1482 AGATGAATACTCCAGTACAG
PB2-1491 TGGATGAATACTCCAGCAC
PB2-R1585 CACTGACCTCCTCAGGAG
PB2-1700 CGGTCTGAGTCAGTGC
PB2-R1740 GCACTGACTCAGGACCG
PB2-1938 CTTCATTGACTGTGAATG

Die Sequenzierprimer wurden von Biomers (Ulm) hergestellt. Ausgewählte Primer wurden zudem für die Amplifikation von Abschnitten der Gensegmente im Zuge der Genotypisierung (Abschnitt 3.1.2.16) eingesetzt. Die Konzentration der Primer-Stocks wurde auf 100 pmol/µl eingestellt.

2.12.4 Mutagenese-Primer

Für das Einfügen von Punktmutationen in die PB1-Plasmide:

Hk68-PB1-Mut6f

ACTTTTCTTGAAAATTCCAGCGCAAATGCC

Hk68-PB1-Mut6r

GGCATTTCGCGCTGGAATTTCAAGAAAAGT

dUk-PB1-Mut1f

CAAACAAGGGTGGACAGATTGACCCAAGGTCG

dUk-PB1-Mut1r

CGACCTTGGGTCAATCTGTCCACCCTTGTTTG

dUk-PB1-Mut2f

GAAAGAAAAGCAGAGGGTGAACAAGAGAAGC

dUk-PB1-Mut2r

GCTTCTCTTGTTACCCTCTGCTTTTCTTTC

dUk-PB1-Mut3f

GATAACATACATCACAAAAATCAACCTGAATGG

dUk-PB1-Mut3r

CCATTCAGGTTGATTTTTGTGATGTATGTTATC

dUk-PB1-Mut4f

CTTCAATGAGTCAACAAGAAAGAAAATTGAG

dUk-PB1-Mut4r

CTCAATTTTCTTTCTTGTTGACTCATTGAAG

dUk-PB1-Mut5f

CAACTACACTCCTGGATTCCCAAAGGAACC

dUk-PB1-Mut5r

GGTTCCTTTTGGGAATCCAGGAGTGTGTAGTTG

dUk-PB1-Mut6f

ACTTTTCTTGAAAGTTCCAGCGCAAATGCC

dUk-PB1-Mut6r

GGCATTTCGCGCTGGAACTTTCAAGAAAAGT

Pand-12I/V-for

ACTTTTCCTAAAAGTTCCAGCGCAAATGCC

Pand-12I/V-rev

GGCATTTCGCGCTGGAACTTTATAGGAAAAGT

R65-12V/I-for

ACTTTTCTTGAAAATACCAGTGCAAATGC

R65-12V/I-rev

GCATTTTGCACCTGGTATTTTCAAGAAAAGT

Für die Herstellung des H5-Elastase-Plasmids:

R65-E-SC35-2 for

AATGTCCCTGAGAACCCGAAGACTGCAGGACTATTTGGA

R65-E-SC35-2 rev

TCCAAATAGTCCTGCAGTCTTCGGGTCTCAGGGACATT

Alle bisher aufgeführten Mutageneseprimer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und auf eine Stock-Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Für die Herstellung N- und C-terminal *Strep*-getagter PB2-Plasmide:

Hk68-PB2-Strep-143

GAATTCGGATGGCCATCAATagcgcttgagccaccgcagttcgaaaaaTAAACTAATTGGGCAAGGA
GAC

Hk68-Strep-PB2

CAATTATATTCAACATGtggagccaccgcagttcgaaaaagcgctGAAAGAATAAAAGAACTACG

Seal80-PB2-Strep-143

GAATTCGGATGGCCATCAATagcgcttgagccaccgcagttcgaaaaaTAGGCTAATTGGGCAAGGA
GACG

dUk-PB2-Strep-143

CGGATGGCCATCAATagcgcttgagccaccgcagttcgaaaaaTAGGTTGATAGGGCAAGG

R65-PB2-Strep-143

CGGATGGCCATCAATagcgcttgagccaccgcagttcgaaaaaTAGGCTGATAGGGCAAGG

R65-Strep-PB2

GGTCAAATATATTCAATATGtggagccaccgcagttcgaaaaagcgctGAGAGAATAAAGGAATTA
AG

Die in Form von Kleinbuchstaben gekennzeichnete Sequenz der *Strep*-Mutagenese-Primer entspricht der des *Strep*-tag inklusive des Serin-Alanin-Linkers.

Für die Klonierung von HA-getagten PA-Plasmiden:

Hk68-EcoRI-PATf

TTATGAATTCACCATGGAAGATTTTGTACGACAATGC

Hk68-XmaI-PATr

TTATCCCGGGTACCTGTCTTAATGCATGTGTAGGAAG

DkUk63-AarI-PATf

TTATCACCTGCTATGAATTCACCATGGAAGACTTTGTGCGACAATG

DkUk63-AarI-PAtr

TTATCACCTGCTATCCCGGGTACCTGTTTCAGTGCATGTGTGAGGA

RD06-Un-PAtf

TCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCACCATGGAAGGCTTTGTGCGAC

RD06-Un-PAtr

GGGACATCATAAGGGTACATCCCGGGTACCTGCTTCAGTGCATGTGTGAGGAAG

Die Primer für die *Strep*-Mutagenese und PA-Klonierung wurden auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

2.12.5 Primer für die quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

EGFP10-R

CTTGTACAGCTCGTCCATGC

(Hoffmann et al., 2006)

EGFP12-F

TCGAGGGCGACACCCTG

(Hoffmann et al., 2006)

EGFP-1-HEX

HEX-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ1

(Hoffmann et al., 2006)

IVA-M_1-FAM-BHQ

FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1

(Spackman et al., 2002)

IVA-M_1for

AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG

(Spackman et al., 2002)

IVA-M1.1rev

TGCAAAAACATCTTCAAGT(Y)*TCTG

(Spackman et al., 2002)

Die für die quantitative real-time RT-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Der Primer IVA-M1.1rev wurde an Position * von Dr. B. Hoffmann (FLI, Riems) modifiziert (unpubliziert). Y steht hierbei für ein degeneriertes Nukleotid (C/T). Die Primer und Primer-Sonden wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

2.13 Chemikalien

Aceton

Roth, Karlsruhe

Agar-Agar

MP Biomedicals, Solon, USA

Agarose

Invitrogen, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)

Applichem, Darmstadt

Ammoniumsulfat

Merck, Darmstadt

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma, Taufkirchen

MATERIAL

Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bicinchoninsäure	Thermo Scientific, Schwerte
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) 35%	MP Biomedical, Solon, USA
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Casein	Oxoid, Wesel
Coomassie Brilliantblau G-250	Serva, Heidelberg
Dextrose	Sigma, Taufkirchen
1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan (DABCO)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
DNA-Ladepuffer 6 x	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	NEB, Frankfurt (Main)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Formamid	ABI, Foster City, USA
GlutaMax	Gibco, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	ICN, Eschwege
Heparin	Richter AG, Budapest, Ungarn
IMDM	Sigma, Taufkirchen
Iod	Roth, Karlsruhe
Iso-Fluran	CP Pharma, Burgdorf
Iso-Propanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumiodid	Roth, Karlsruhe
Kalium-Natriumtartrat	Merck, Heidelberg
Kupfersulfat	Neolab, Heidelberg
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Lasana, Herford
Medium F12	Sigma, Taufkirchen
MEM Earle	Gibco, Darmstadt
MEM Hanks	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	MP Biomedical, Solon, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe

MATERIAL

Methylcellulose	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Fluka, Neuulm
Natriumthiosulfat	Merck, Heidelberg
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS)	Biochrom, Berlin
Opti-Mem	Gibco, Darmstadt
PBS-Tabletten	Sigma, Taufkirchen
o-Phosphorsäure	Merck, Heidelberg
Protease-Inhibitor	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Sigma, Taufkirchen
Silbernitrat	VEB, DDR (eh.)
SOC Medium	NEB, Frankfurt (Main)
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Super Signal Chemilumineszenz Substrat	ThermoSc., Rockford, USA
N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

2.14 Medien Puffer und Lösungen

2.14.1 Bakteriologische und molekulargenetische Arbeiten

Ampicillin-Stammlösung 1000 x	100 mg/ml in A. dest.
LB-Medium	10 g Casein 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt auf 1 l mit A. dest auffüllen
LB-Agar	1,5% Agar in LB-Medium
TBE 10 x	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

MATERIAL

2.14.2 Zellkultur-Arbeiten

ATV/2 x ATV	8 g NaCl 0,4 g KCl 1 g Dextrose 0,58 g NaHCO ₃ 0,5g/1g Trypsin (Invitrogen) 0,2 g EDTA auf 1 l mit A. dest. auffüllen pH 7,1-7,3
Bacto-Agar	1,8% Bacto-Agar in A. dest
Elastase-Stammlösung (2000x)	10 mg/ml in Wasser gelöst
Erythrozyten-Lösung	1% Hühner-Erythrozyten in PBS
Infektionsmedium	Medium 5D bzw. 28D 0,2% BSA
Iod-Desinfektionslösung	50% Ethanol 3,5% Iod 1,5% Kaliumiodid
Kristallviolett	730 ml A. dest. 270 ml Formaldehyd 37% 1 g Kristallviolett
Medium 5 (Zellbank, FLI, Riems)	5,32 g MEM Hanks 4,76 g MEM Earle 1,52 g NaHCO ₃ 0,12 g Natriumpyruvat (Fluka) 10 ml NEAS 10% FKS auf 1 l mit A. dest. auffüllen pH 7,2; 2,5% CO ₂
Medium 5 D	Medium 5 ohne FKS

MATERIAL

Medium 28 (Zellbank, FLI, Riems)	8,8 g IMDM 5,32 g Medium F12 2,45 g NaHCO ₃ (Roth) 10% FKS auf 1 l mit A. dest. Auffüllen pH 7,4; 2,5% CO ₂
Medium 28D	Medium 28 ohne FKS
Methocel	3,76 g MEM 10 g Methylcellulose autoklavieren und ü. N. bei 4°C in 390 ml H ₂ O lösen Zugabe von 10 ml PBS mit 0,88 g NaHCO ₃ und 4 ml GlutaMax (200 mM) ü. N. bei 4°C rühren
<i>Overlay</i>	50% Plaquetestmedium 50% Bacto-Agar (1,8%)
1 x PBS	1 PBS-Tablette je 200 ml A. dest.
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (100 x)	10 000 U/ml Penicillin 10 mg Streptomycin
Plaquetestmedium	5D, doppelt konzentriert 1,2% BSA 2% Penecillin/Streptomycin
Sucrose-Lösung	20% Sucrose in PBS
Trypsin-Stammlösung (5000 x)	10 mg/ml Trypsin in A. dest.
Tupfermedium	Medium 5D 1% Baytril 1% Lincomycin 0,05% Gentamycin

MATERIAL

2.14.3 Biochemische Arbeiten

APS-Lösung	10% APS in A. dest.
BCA-Arbeitslösung	98% BCA-Stammlösung 2 % CuSO ₄ (4%ige Lösung)
BCA-Stammlösung	25,8 mM Bicinchoninsäure 2% Na ₂ CO ₃ 0,16% Kalium-Natriumtartrat 0,95% NaHCO ₃ pH 11,25
Blotpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 20% Methanol 0,1% SDS
Blocking-Puffer	5% Magermilchpulver in PBS
BSA-Stammlösung	10 mg/ml in A. dest.
Coomassie-Färbelösung	79 % Fixierlösung 20 % Methanol 1 % Coomassie-Stammlösung
Coomassie-Fixierlösung	10% Ammoniumsulfat 2% o-Phosphosäure
Coomassie-Stammlösung	10% Coomassie G250 in 50% Methanol
Dabco	2,5 g Dabco 10 ml PBS lösen 90 ml Glycerin pH 8,6
Entwickler-Lösung (Silberfärbung)	2,5 g Natriumcarbonat 20 µl Formaldehyd 37% auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen

MATERIAL

Fixierlösung (Silberfärbung)	40% EtOH 10% Essigsäure
Kupfersulfat-Lösung	4% Kupfersulfat in A. dest.
PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 1% SDS
PAGE-Probenpuffer 4 x	125 mM Tris/HCl pH 6,8 40% Glycin 8% SDS 0,01% Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
Protease-Inhibitor 10 x	1 Tablette auf 10 ml A. dest.
Sammelgel 10%	10% Acrylamid/Bisacrylamid 25% Sammelgelpuffer 0,3% APS 0,3% TEMED
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Sensitizing-Puffer	4% Natrium-Acetat 4% Natriumthiosulfat (5%) 30% EtOH
Silberfärbelösung	0,25 g Silbernitrat 40 μ l Formaldehyd 37% auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen
Stopplösung	5 g Glycin 500 ml H ₂ O
Streptactin-Elutionspuffer 10x (IBA, Göttingen)	100 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin

MATERIAL

Streptactin-Regenerationspuffer 10x (IBA, Göttingen)	100 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA
Streptactin-Waschpuffer 10x (IBA, Göttingen)	100 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Stripping-Puffer	1% SDS 200 mM Glycin pH 2
TCA-Lösung 20% bzw. 2%	20% bzw. 2% TCA in A. dest.
Trenngel 10%	10% Acrylamid/Bisacrylamid 25% Trenngelpuffer 0,3% APS 0,15% TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Waschpuffer	0,1% bzw. 0,3% Tween20 in PBS
Zelllysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 1% Protease-Inhibitor

2.15 Gebrauchsmaterialien

Adhesive PCR Foil seals	Thermo Scientific, Schwerte
BD Mikrotainer SST™ Tubes	Becton-Dickenson, Heidelberg
Belichtungsfilm	GE Healthcare, München
Blotpapier	Whatman, Dassel
Einmal-Kanülen 21 G x 1“	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einmal-Spritzen Omnifix®-F 1 ml	Braun, Melsungen
Einweg-Küvetten	Brand, Wertheim
Einweg-Skalpell	Braun, Tuttlingen

MATERIAL

Einweg-Laborspatel	VWR, Darmstadt
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Gewebekulturschalen 3 cm ² /6 cm ²	Corning, New York, USA
Injektionskanülen	Terumo, Eschborn
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Kryoröhrchen Außengewinde 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen Innengewinde 5 ml	Greiner, Frickenhausen
Lochplatten 6er, 24er	Corning, New York, USA
Lochplatten 96er, Rundboden	Corning, New York, USA
Nitrocellulose	Whatman, Dassel
Pasteurpipetten	Neolab, Heidelberg
Parafilm	Pechiney, Menasha, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, safelock	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serumröhrchen BD Microtainer SST™ Tubes	BD, Franklin Lakes, USA
SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns	Sigma, Taufkirchen
Stericup-GP 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Millipore, Billerica, USA
Streptactin-Chromatographiesäulen (1ml)	IBA, Göttingen
Ultrazentrifugenröhrchen 17 ml	Beckman, Krefeld
Wattestäbchen	Medical care, Göttingen
Zellkulturflaschen T25, T75, T162	Corning, New York, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.16 Geräte

Arterienklemme	Neolab, Heidelberg
Bakterieninkubator	NBSC, Edison, USA
Blotapparatur Semi Dry	Bio Rad, München
Brutgerät	J. Hemel Brutgeräte, Grumbach
Elektrophorese-Apparaturen	Bio Rad, München
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51	Olympus, Hamburg
Geldokumentationsstation	Herolab, Wiesloch
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Impfösen	Greiner, Frickenhausen
Lichtmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Luminometer	Berthold DS, Pforzheim

MATERIAL

Magnetrührgerät	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge	Heraeus, Osterode
Mikrowelle	Cinex, Ascheberg
MX-3000p real-Time Cyclers	Stratagene, La Jolla, USA
Nanodrop	Eppendorf, Hamburg
Netzgerät	Bio Rad, München
Pipetten 1-10 µl/10-100 µl/100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Rotor SW32 Ti	Beckman, Krefeld
Schnabelpinzette	Neolab, Heidelberg
SDS-Gelelektrophorese-Kammern	Bio Rad, München
Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte
Tisch-Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Ultrazentrifuge LE-80K	Beckman, Krefeld
Vortexer	Scientific Industry, New York, USA
Waage	Kern, Balingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.17 Bioinformatik

Chromas Lite Version 2.01
Staden Package Version 2.00
GraphPad Prism 5.0

3. Methode

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 RNA-Methoden

3.1.1.1 RNA-Isolierung aus Allantoisflüssigkeit oder Zellkulturüberstand

Für die Extraktion viraler RNA aus der Allantoisflüssigkeit von embryonierten Hühnereiern wurde der QIAamp Viral RNA Mini Kit von QIAGEN nach Hersteller-Angaben verwendet. Die Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberständen erfolgte mit dem RNeasy RNA-Extraktions-Kit von QIAGEN nach Hersteller-Angaben.

3.1.1.2 RNA-Isolierung aus Tupferproben

Zur Isolierung viraler RNA aus den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben infizierter Tiere (Abschnitt 3.4.5) wurde der NucleoSpin 96 RNA Kit von Macherey und Nagel den Hersteller-Angaben entsprechend verwendet. Dabei wurden 150 µl in Tupfermedium gelöste Virussuspension eingesetzt. Jeder Probe wurden zudem zur Überprüfung der RNA-Aufarbeitung und der sich daran anschließenden qRT-PCR (Abschnitt 3.1.1.5) 5 µl einer internen Kontroll-RNA zugesetzt (IC2; Abschnitt 2.11).

3.1.1.3 Reverse Transkription

cDNA wurde mit Hilfe des Omniscript-RT-PCR-Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers generiert. Je Reaktion wurden 4 µl RNA und 1 µl Uni12-Primer (20 pmol/µl) eingesetzt.

3.1.1.4 OneStep-RT-PCR

Die OneStep-RT-PCR wurde mit Hilfe des OneStep RT-PCR-Kits von Qiagen durchgeführt. Dabei wurde sich an das Protokoll des Herstellers gehalten. Die OneStep RT-PCR wurde vornehmlich für die Amplifikation der Gensegmente rekombinanter Influenza-Viren im Zuge ihrer Genotypisierung (Abschnitt 3.1.2.16) verwendet. Hierbei kamen die M13-Primer (Abschnitt 2.12.2) und zum Teil auch gen-interne Primer (Abschnitt 2.12.3) zum Einsatz.

3.1.1.5 Quantitative real-time RT-PCR

Zur Detektion viraler RNA in den Tupferproben von infizierten Versuchstieren wurde die von Hoffmann *et al.* (2006) modifizierte quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) nach Spackman *et al.* (2002) zum Nachweis Influenza-A-Virus M1 Gen-spezifischer Sequenzen durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels eines heterologen, spezifischen Primer-Sonden-Mixes die Kontroll-RNA (IC2) nachgewiesen, welche im Zuge der RNA-Aufarbeitung zu jeder Probe hinzu gegeben wurde (Abschnitt 3.1.1.2). Die qRT-PCR wurde mit dem SuperScript™ III One-Step RT-PCR Kit nach Angaben des Herstellers in 96-Lochplatten durchgeführt. Ein qRT-PCR-Ansatz war wie folgt zusammen gesetzt:

5 µl	RNA
12,5 µl	2 x Reaction Mix
1 µl	Enzyme Mix
2 µl	Primer-Sonden-Mix M1
2 µl	Primer-Sonden-Mix IC2
2,5 µl	nuklease-freies H ₂ O

Der Primer-Sonden-Mix M1 wurde in 1 x TE-Puffer (pH 8,0) angesetzt und bestand aus:

10 µM	IVA-M_1for
15 µM	IVA-M1.1rev
1,25 µM	IVA-M_1-FAM-BHQ

Der Primer-Sonden-Mix IC2 wurde in 1 x TE-Puffer (pH 8,0) angesetzt und bestand aus:

2,5 µM	EGFP12-F
2,5 µM	EGFP10-R
1,25 µM	EGFP-1-HEX

Bei jeder qRT-PCR wurden jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Letztere entsprach einer *in-vitro* transkribierten RNA des M1-Gens mit einer Konzentration von 2×10^3 Kopien je Reaktion. Das qRT-PCR-Programm lautete wie folgt:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
50°C	30 min	1 x	Reverse Transkription
94°C	2 min	1 x	Inaktivierung der RT
94°C	30 sec	42 x	Denaturierung
58°C	30 sec		Annealing
68°C	30 sec		Elongation
25°C	unendlich	-	

Die Fluoreszenz-Messung der FAM-markierten M1-Gen-spezifischen Sonde bzw. der HEX-markierten IC2-Kontrollsonde erfolgte am Ende der Annealing-Phasen eines jeden Zyklus. Sollten Proben aus unterschiedlichen qRT-PCRs miteinander verglichen werden,

so wurde der Fluoreszenzschwellenwert („Threshold“) anhand der Ct-Werte der Positivkontrolle angeglichen. War in einer Probe die interne Kontrolle nicht amplifiziert worden, wurde erneut RNA extrahiert und untersucht.

3.1.2 DNA-Methoden

3.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur

Für Mini-Präparationen wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen den Herstellerangaben zufolge verwendet. Die Durchführung von Midi-Präparationen erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Midi Kits von Qiagen. Dabei wurde sich an die Vorgaben des Herstellers gehalten. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in A. dest. resuspendiert.

3.1.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop-Messgerätes photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden 2 µl einer unverdünnten DNA-Probe eingesetzt und gegen A. dest. als Leerwert gemessen. Eine Extinktion oder optische Dichte (OD) von 1 entspricht ~ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Detektion von Proteinverunreinigungen in der Plasmid-Präparation wurde zudem der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gebildet. Der 260/280-Wert sollte für saubere DNA bei 1,8 liegen.

3.1.2.3 Präzipitation von DNA

Bei der Ethanol-Präzipitation wurden zu 1 Volumen DNA 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 2,5 Volumen 100%iger Ethanol gegeben. Die Fällung erfolgte für 1 h bei -70°C oder über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C und 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einem 5minütigen Zentrifugations-Schritt bei 13200 rpm wurde die DNA getrocknet und in A. dest. gelöst.

3.1.2.4 Endonukleolytische Spaltung von DNA-Molekülen

Das Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde im jeweils geeigneten Puffersystem (Angaben des Herstellers) und, wenn nicht anders verzeichnet, für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Für Test-Restriktionen wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 10 µl angefertigt und 200-500 ng DNA eingesetzt. Für andere Restriktionen, auf die

eine oder mehrere DNA-Aufreinigungen folgen sollten, wurden 50 µl - Ansätze hergestellt. Je nach Bedarf variierte die Plasmid-Menge im Bereich von 1-5 µg.

3.1.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in 1%igen Agarose-Gelen mit 0,15 µg/ml Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit Ladebuffer (6 x) versetzt. Die DNA-Banden wurden durch Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.2.6 Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA-Molekülen aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen den Hersteller-Angaben entsprechend verwendet.

3.1.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktions-Ansätzen

Zur Aufreinigung von DNA aus PCR- oder Restriktions-Ansätzen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen den Hersteller-Angaben entsprechend verwendet.

3.1.2.8 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von OneStep-PCR-Produkten (Abschnitt 3.1.1.4) oder Plasmid-DNA wurden die unten aufgeführten Substanzen wie folgt zusammen gemischt:

1 - 2 µl	DNA (200 - 500 ng)
1 µl	Primer (5 µM)
2 µl	Terminator-Ready Mix
1 µl	10 x Reaktionspuffer
4 - 5 µl	ddH ₂ O

Das Temperatur-Profil für die Sequenzierung lautete:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
96°C	1 min	1 x	Denaturierung
96°C	10 sec	25 x	Denaturierung
55°C	5 sec		Annealing
60°C	4 min		Elongation
8°C	unendlich	-	

Die Sequenzier-Ansätze wurden über die Sigma SpinTM Post-Reaction Clean Up Columns von Sigma aufgereinigt (siehe Hersteller-Angaben). 10 µl des aufgereinigten Ansatzes wurden mit 10 µl Formamid vermengt und für die Sequenzierung eingesetzt, die durch das

Sequenzierlabor des FLI durchgeführt wurde. Das Editieren von Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas.

3.1.2.9 Amplifikation von Influenza-A-Gensegmenten

Nach vorhergehender RNA-Isolierung (Abschnitt 3.1.1.1) und cDNA-Synthese (Abschnitt 3.1.1.3) wurde jedes Influenza-A-Gensegment mittels segmentspezifischer Primer (Abschnitt 2.12.1) amplifiziert. Für die Amplifikation des HA-Segmentes wurden die Primer pHW-HAf und pHW-NSr verwendet. Für die Amplifikation von NA-Segmenten, die nicht dem Serotyp 1, 2, 4, 5 oder 8 entsprachen, wurden dem Serotyp entsprechend zugeordnete Primer eingesetzt. Als Polymerase diente die Phusion-Polymerase (NEB). Folgendes Pipettierschema wurde angewendet:

20 µl	5 x HF-Puffer
2 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Phusion DNA-Polymerase
2 µl	cDNA
2,5 µl	Forward-Primer (20 µM)
2,5 µl	Reverse-Primer (20 µM)
70 µl	ddH ₂ O

Abhängig von der jeweiligen Ausbeute konnten mehrere PCR-Ansätze je Gensegment angesetzt werden. Das PCR-Programm lautete wie folgt:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
98°C	30 sec	1 x	Denaturierung
98°C	10 sec	} 35 x	Denaturierung
60°C	30 sec		Annealing
72°C	4 min		Elongation
72°C	10 min	1 x	Elongation
8°C	unendlich	-	

Die PCR-Ansätze (ein oder mehrere Ansätze) wurden nach ihrer Aufreinigung über Gelextraktion (Abschnitt 3.1.2.6) in 30 - 50 µl Wasser aufgenommen. Bei der Verwendung mehrerer Geextraktions-Säulen je Segment wurde das Eluat von einer Säule auf die nächste usw. aufgetragen.

3.1.2.10 Klonierung von Influenza-A-Gensegmenten mittels QuickChange-Reaktion

Die Klonierung jedes über PCR amplifizierten und anschließend aufgereinigten Influenza-A-Gensegmentes (Abschnitt 3.1.2.9) erfolgte in den Vektor pHWSCcdB mittels

METHODE

einer modifizierten QuickChange-Reaktion (Q-PCR) nach Stratagene (Stech *et al.*, 2008).

Der PCR-Ansatz der Q-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl	PCR-Produkt 200 - 300 ng
1 µl	pHWS <i>CcdB</i> (100 ng/µl)
10 µl	5 x HF-Puffer
1 µl	10 mM dNTPs
2 µl	Phusion DNA-Polymerase (2U/µl)
31 µl	ddH ₂ O

Das PCR-Programm lautete:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
98°C	30 sec	1 x	Denaturierung
98°C	10 sec	} 35 x	Denaturierung
48°C	1 min		Annealing
72°C	5:30 min		Elongation
72°C	10 min	1 x	Elongation
8°C	unendlich	-	

Im Anschluss an die Q-PCR wurde ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. Auf diese Weise wurde das Ursprungsplasmid pHWS*CcdB*, das in methylierter Form vorlag, aus dem PCR-Ansatz entfernt. Dazu wurden 2 µl *DpnI* zum PCR-Ansatz gegeben und 3 h bei 37°C inkubiert.

2 - 5 µl eines Q-PCR-Ansatzes wurden daraufhin in kompetente *E. coli* Bakterienzellen, meist XL1-Blue, transformiert (Abschnitt 3.1.5). Für die Klonierung der Gensegmente 1, 2 und 3 (PB2, PB1, PA) wurden Top10 oder SURE2 Zellen verwendet. Die erhaltenen Bakterien-Klone wurden zunächst auf ihre Korrektheit hin kontrolliert. Dazu wurden Mini-Präparationen der Plasmid-DNA von mehreren Klonen je Klonierung angefertigt (Abschnitt 3.1.2.1). Die Plasmid-DNA wurde jeweils mit 0,1 µl des Restriktionsenzym *NheI* verdaut (Abschnitt 3.1.2.4) und auf einem Agarosegel analysiert. Im Gel aufgrund der Fragmentgröße korrekt erscheinende Klone wurden durch Sequenzierung mit den Primern pHW-F und pHW-R überprüft (Abschnitt 3.1.2.8). Je Gensegment wurden mehrere in der Sequenzierung positive Klone im 8-Plasmid-Rescue (Abschnitt 3.2.4) auf ihre Funktionalität getestet. Von einzelnen funktionellen Klonen wurde eine Midi-Präparation hergestellt (Abschnitt 3.1.2.1). Die in pHWS*CcdB* klonierten Fragmente wurden daraufhin mit geninternen Primern (Abschnitt 2.12.3) vollständig sequenziert.

3.1.2.11 QuickChange-Mutagenese

Das gezielte Einfügen von Mutationen in ein Plasmid erfolgte mit Hilfe einer modifizierten QuickChange-Reaktion (Abschnitt 3.1.2.10) unter Verwendung eines spezifischen Mutagenese-Primerpaars (Abschnitt 2.12.4). Hierfür musste die Sequenz der beiden zueinander komplementären, antiparallelen Mutagenese-Primer die gewünschte Mutation und jeweils ~ 15 Nukleotide Strang-aufwärts und Strang-abwärts der zu mutierenden Region enthalten. Im Verlauf der QuickChange-Mutagenese lagerten sich die homologen Primerabschnitte an das Wildtyp-Plasmid an und lieferten den Startpunkt für die Elongation.

Der Mutagenese-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	Plasmid 100 ng/µl
1 µl	10 mM dNTPs
10 µl	5 x HF-Puffer
1 µl	Phusion DNA-Polymerase
2 µl	Forward-Primer (62,5 ng/µl)
2 µl	Reverse-Primer (62,5 ng/µl)
33 µl	ddH ₂ O

Das PCR-Programm lautete:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
98°C	30 sec	1 x	Denaturierung
98°C	10 sec	} 20 x	Denaturierung
48°C/60°C	30 sec		Annealing
72°C	5:30 min		Elongation
72°C	10 min	1 x	Elongation
8°C	unendlich	-	

An die Mutagenese-PCR schloss sich ein DpnI-Verdau mit 2 µl DpnI je Mutagenese-Ansatz für 3 h bei 37°C an. 2 µl des Ansatzes wurden anschließend in kompetente Bakterien transformiert (Abschnitt 3.1.5).

3.1.2.12 Einfügen von Punktmutationen in das PB1-Plasmid

Das Einfügen von Punktmutationen in das PB1-Plasmid wurde mit Hilfe der QuickChange-Mutagenese (Abschnitt 3.1.2.11) durchgeführt. Im Folgenden ist aufgelistet, welche Mutagenese-Primerpaare (Abschnitt 2.12.4) für die einzelnen PB1-Plasmide verwendet wurden (Tabelle 3.1).

METHODE

Tabelle 3.1: PB1-Mutante und die verwendeten Mutagenese-Primerpaare

PB1-Mutation	Forward-Mutagenese-Primer	Reverse-Mutagenese-Primer
dUk-PB1-I12V	dUk-PB1-Mut6f	dUk-PB1-Mut6r
dUk-PB1-K121R	dUk-PB1-Mut1f	dUk-PB1-Mut1r
dUk-PB1-L212V	dUk-PB1-Mut2f	dUk-PB1-Mut2r
dUk-PB1-R327K	dUk-PB1-Mut3f	dUk-PB1-Mut3r
dUk-PB1-K386R	dUk-PB1-Mut4f	dUk-PB1-Mut4r
dUk-PB1-V667I	dUk-PB1-Mut5f	dUk-PB1-Mut5r
Hk68-PB1-V12I	Hk68-PB1-Mut6f	Hk68-PB1-Mut6r
H1N1-PB1-I12V	Pand-12I/V-for	Pand-12I/V-rev
R65-PB1-V12I	R65-12V/I-for	R65-12V/I-rev

3.1.2.13 Herstellung der *Strep*-getaggtten PB2-Plasmide

Für die Herstellung der *Strep*-getaggtten PB2-Plasmide wurde mit einem speziellen Forward-Mutagenese-Primer (Abschnitt 2.12.4) und dem pHW-R-Primer ein PCR-Fragment generiert, das die in das PB2-Wildtyp-Plasmid zu inserierende Sequenz aufweisen sollte. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	Plasmid 100 ng/µl
1 µl	10 mM dNTPs
10 µl	5 x HF-Puffer
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
1,5 µl	Forward-Primer (20 µM)
1,5 µl	Reverse-Primer (20 µM)
34,5 µl	ddH ₂ O

Das PCR-Programm lautete:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
98°C	30 sec	1 x	Denaturierung
98°C	10 sec	} 25 x	Denaturierung
60°C	30 sec		Annealing
72°C	30 sec/kb		Elongation
72°C	10 min		1 x
8°C	unendlich	-	

Die auf diese Weise entstandenen PCR-Fragmente dienen im Zuge einer anschließend durchgeführten Q-PCR (Abschnitt 3.1.2.10) als Megaprimer. Dabei wurde das entsprechende PB2-Wildtyp-Plasmid als Ausgangsplasmid eingesetzt. Danach wurde ein DpnI-Verdau für 3 h bei 37°C durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde daraufhin in kompetente Bakterien transformiert (Abschnitt 3.1.5).

3.1.2.14 Klonierung von HA-getaggttem PA

Die Klonierung der PA-Segmente der Viren Hk68 und dUk in den Vektor pCAGGS-PA(WSN)-HA (Abschnitt 2.11) erfolgte über Restriktionsschnittstellen. Für das Hk68-PA wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XmaI*, für das dUk-PA die Enzyme *AarI* und *XmaI* verwendet. 5 µg pCAGGS-PA(WSN)-HA wurde mit *EcoRI* und *XmaI* geschnitten (Abschnitt 3.1.2.4) und durch Gelextraktion (Abschnitt 3.1.2.6) aufgereinigt.

Zur Herstellung der in den Zielvektor zu inserierenden PA-Fragmente wurde die in Abschnitt 3.1.2.13 beschriebene PCR durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 ng des pHW-PA-Konstruktes und entsprechende Mutageneseprimer (Abschnitt 2.12.4) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über Gelextraktion aufgereinigt (Abschnitt 3.1.2.6) und anschließend mit den oben genannten Restriktionsenzymen gespalten (Abschnitt 3.1.2.4). Die Ligation erfolgte mit jeweils 100 ng linearisiertem Vektor, 100 ng des gespaltenen PCR-Produktes und 1 µl T4-Ligase über Nacht bei 4°C. Die Ligase wurde für 10 min bei 65°C inaktiviert. Je 5 µl des Ligationsansatzes wurden daraufhin für die Transformation in *E. coli* SURE2-Zellen eingesetzt (Abschnitt 3.1.5).

Das PA des Virus A/Regensburg/D6/2009 (H1N1) wurde mittels QuickChange-Reaktion in den Vektor pCAGGS-PA(WSN)-HA kloniert. Dazu wurde zunächst eine PCR wie oben beschrieben durchgeführt. 5 µl des über Gelextraktion aufgereinigten PCR-Fragmentes wurden für die Q-PCR mit pCAGGS-PA(WSN)-HA als Ausgangsplasmid eingesetzt (Abschnitt 3.1.2.10). Anschließend wurden 2 µl *DpnI* zum Ansatz gegeben und dieser für 3h bei 37°C inkubiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* SURE2-Zellen (Abschnitt 3.1.5).

3.1.2.15 Einfügen einer Elastase-Spaltstelle in das Haemagglutinin des R65-Virus

Die polybasische HA-Spaltstelle des hoch-pathogenen Virus A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) (R65) sollte deletiert und durch eine Spaltstelle für die Protease Elastase ersetzt werden. Dazu wurde das R65-H5-Plasmid mit den Mutagenese-Primern R65-E-SC35-2for und R65-E-SC35-2rev (Abschnitt 2.12.4) in die QuickChange-Mutagenese-PCR eingesetzt (Abschnitt 3.1.2.11). Im Anschluss an einen Verdau mit 2 µl *DpnI* für 3 h bei 37°C wurde das mutierte H5-Plasmid in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (Abschnitt 3.1.5) und vermehrt.

3.1.2.16 Genotypisierung von Viren

Für die Genotypisierung von Influenza-A-Viren wurde ausgehend von der viralen RNA jedes Gen-Segment durch OneStep RT-PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.1.4). Da mit dem OneStep RT-PCR-Kit von QIAGEN Sequenzabschnitte größer als 2 kb nur sehr schwer zu amplifizieren waren, wurden die P-Gene in zwei Fragmenten durch Kombination der M13-Primer mit gen-internen Primern vermehrt (Abschnitte 2.12.2 und 2.12.3). Die PCR-Produkte wurden je nach dem Vorhandensein von Nebenprodukten durch einfache Säulen-Reinigung oder Gelextraktion aufgereinigt (Abschnitte 3.1.2.6 und 3.1.2.7). Die Sequenzierung der Influenza-Segmente erfolgte mit gen-spezifischen Primern, so dass man überlappende Sequenzbereiche erhielt (Abschnitt 3.1.2.8). Das Assemblieren der Sequenzen wurde mit dem Programm Staden Package durchgeführt.

3.1.3 Kultivierung von Bakterien

Die hier verwendeten *E. coli* Stämme XL1-Blue, SURE2 und Top10 wurden entweder für ca. 16 h in LB-Medium mit Ampicillin (1 µg/ml) bei 37°C im Bakterien-Schüttler oder auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (1 µg/ml) im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Konservierung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Klonen wurden 0,8 ml einer Flüssigkultur mit 500 µl sterilem Glycerin vermischt und bei -70°C eingefroren.

3.1.5 Transformation von Bakterien

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in die *E. coli*-Stämme XL1 Blue, SURE2 oder Top10 wurde sich an die Angaben des Herstellers gehalten. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2 Zellkultur und virologische Methoden

3.2.1 Passage und Kultivierung von Zellen

Der alte Kulturüberstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Dann wurden 2 ml ATV oder 2 x ATV zu den Zellen gegeben und diese bei 37°C inkubiert bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Daraufhin wurden die Zellen je nach Zelllinie und vorheriger Konfluenz des Zellrasens 1:6 bis 1:15 in frischem

Kulturmedium ausgesät. Mit Ausnahme der DF1-Zellen, die in Medium 28 kultiviert wurden, erhielten alle Zellen das Medium 5. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

3.2.2 Infektion von Zellen

Die Zellen wurden vor der Infektion einmal mit PBS gewaschen, um möglichst alle Serum-Reste zu entfernen. Daraufhin wurde die gewünschte Menge Virus in geringem Volumen PBS zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Zell-Überstandes wurde frisches Infektionsmedium mit Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) zu den Zellen gegeben.

3.2.3 Transiente Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion von Zellen wurde mit dem Reagenz Lipofectamine2000 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Transfektion auf 6 cm² Kulturschalen wurden jeweils 20 µl Lipofectamine2000 in 250 µl Optimem und 8 µg Plasmid-DNA in 250 µl Optimem eingesetzt. Für die Transfektion von Zellen in 12-Lochplatten wurden jeweils 4 µl Lipofectamine2000 in 100 µl Optimem und 380 ng Plasmid-DNA in 100 µl Optimem verwendet. Der Lipofectamine2000-Ansatz wurde nach einer Vorinkubation von 5 min mit dem DNA-Ansatz vermischt. Das DNA-Lipofectamine2000-Gemisch wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurde der Transfektionsmix von den Zellen abgenommen und durch Infektionsmedium mit oder ohne Protease ersetzt.

3.2.4 Herstellung rekombinanter Viren mittels reverser Genetik

Zur Erzeugung revers-genetischer Viren wurden alle acht in pHWSCcdB klonierten Segmente (Abschnitte 3.1.2.9 und 3.1.2.10) eines Virus in HEK293T-Zellen transfiziert (Abschnitt 3.2.3). Unter einem homologen Rescue ist hierbei ein Rescue zu verstehen, bei dem die cDNA aller acht Plasmide von den Virusgenen desselben Virus stammen. Bei einem heterologen Rescue stammen die acht Plasmide hingegen von mindestens zwei verschiedenen Viren.

Beim „7 + 1“-Rescue wurde die Funktionalität eines Plasmidklons zusammen mit den übrigen 7 Segment-Klonen des Laborstammes A/WSN/1/33 (H1N1) ausgetestet.

HEK293T-Zellen wurden entweder in Suspension oder adhären in Mischkultur mit MDCKII-Zellen transfiziert. Dazu wurde von jedem Gensegment 1 µg Plasmid-DNA in der Transfektion eingesetzt, so dass insgesamt 8 µg DNA je Ansatz transfiziert wurden (Abschnitt 3.2.3). Bei jedem Rescue wurden sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Der Erfolg des Rescues, d. h. ob ausgehend von den 8 Plasmidklonen Virus produziert werden konnte, wurde am Ende des Experimentes mit Hilfe eines HA-Tests überprüft (Abschnitt 3.2.6.1).

3.2.4.1 Suspensions-Rescue

Auf einer 75 cm² Kulturflasche konfluent ausgesäte HEK293T-Zellen wurden trypsinisiert (Abschnitt 3.2.1) und für 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 9 ml Infektionsmedium resuspendiert. Je 3 ml Zellsuspension wurden auf einer 6 cm² Zellkulturschale ausgesät und der Transfektionsmix hinzu gegeben. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit Infektionsmedium ohne Protease. 48 h nach Transfektion wurden 500 µl des Zellkultur-Überstandes der HEK293T-Zellen auf eine 3 cm² Zellkulturschale mit konfluenten MDCKII-Zellen über-infiziert (Abschnitt 3.2.2). Dem Infektionsmedium der MDCKII-Zellen wurde in Abhängigkeit vom Virus Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) zugesetzt. Im positiven Fall war bereits 2 bis 3 Tage nach Überinfektion ein Virusnachweis anhand eines zytopathischen Effekts (CPE) und HA-Tests (Abschnitt 3.2.6.1) möglich.

3.2.4.2 Mischkultur-Rescue

HEK293T-Zellen und MDCKII-Zellen wurden zusammen im Verhältnis 4:1 auf 6 cm² Schälchen ausgesät und am Folgetag wie oben transfiziert. Beim Mediumwechsel nach 6 h wurde dem Transfektionsmedium Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) zugesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Überinfektion auf MDCKII-Zellen wie unter 3.2.4.1 beschrieben.

3.2.5 Rescue der R65-E-Mutante

Der Rescue der R65-E-Mutante erfolgte mit dem H5-Elastase-Plasmid (Abschnitt 3.1.2.15) und den restlichen sieben R65-Wildtyp-Plasmiden in Mischkultur unter Zugabe von Elastase in das Infektionsmedium (Abschnitt 3.2.4.2).

3.2.6 Bestimmung des Virustiters

3.2.6.1 Haemagglutinations-Test (HA)

In die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurde eine Zweifach-Verdünnungs-Reihe einer Virussuspension pipettiert. Dazu wurden 50 µl PBS mit 50 µl unverdünnter Virussuspension vermischt. 50 µl dieser zweifach verdünnten Virussuspension wurden mit weiteren 50 µl PBS vermischt, so dass eine vierfach verdünnte Lösung entstand usw. Zu 50 µl jeder Virusverdünnung wurden 50 µl einer 1%igen Hühner-Erythrozytenlösung gegeben. Die 96-Lochplatte wurde 30-40 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ausgewertet. Kam es zur Verklumpung bzw. Agglutination der Erythrozyten so galt dies als positiver Virusnachweis. Setzten sich die Erythrozyten am Boden der Kavität ab bzw. bildeten ein Knöpfchen, so galt der Virusnachweis als negativ. Zur Bestimmung des HA-Titers wurde die letzte Verdünnungsstufe als positiv angesehen, in der das Knöpfchen bei Schräghalten der 96-Lochplatte nicht verlief.

3.2.6.2 Plaquetest

Der Plaquetiter wird in der Einheit [pfu/ml] angegeben und bezeichnet die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (pfu) in 1 ml einer Virussuspension. Dabei wird davon ausgegangen, dass ein Plaque von einem infektiösen Partikel erzeugt wird.

Für den Plaquetest wurden MDCK-Zellen in 6-Lochplatten ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion konfluent waren. Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 400 µl Virussuspension in mehreren Verdünnungsstufen, die sich jeweils in einer Zehnerpotenz unterschieden, auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit dem *Overlay* überschichtet. Diesem wurde in Abhängigkeit von dem zu titrierenden Virus Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) zugesetzt.

Die Plaquetestplatten wurden für 3 Tage im Brutschrank inkubiert, die Plaques mit Kristallviolett-Lösung über Nacht gefärbt und nach Entfernen des *Overlays* ausgezählt. Die Berechnung des Plaquetiters erfolgte mit Hilfe der Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Virusverdünnung} \times \text{Infektionsvolumen}} = \text{Titer in pfu/ml}$$

3.2.6.3 Zellkultur infektiöse Dosis 50 (TCID₅₀)

Die Durchführung des Tests erfolgte in 96-Lochplatten mit flachem Boden. In jede Vertiefung wurden 100 µl einer so in Infektionsmedium verdünnten MDCKII-Zellsuspension gegeben, dass die Zellen nach 72 h konfluent waren. Nach dem Absetzen der Zellen wurden in jede Vertiefung 100 µl einer Virussuspension hinzugefügt. Dabei wurden für jede zu untersuchende Probe verschiedene Verdünnungen in Infektionsmedium von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ in vierfacher Wiederholung ausgetestet. Dem Infektionsmedium wurde außerdem bei Bedarf Trypsin (2 µg/ml) zugesetzt. Als Negativkontrolle fungierten Zellen, zu denen 100 µl Infektionsmedium gegeben wurden. Die Platten wurden für 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Auswertung der Titration geschah durch Ablesen des zytopathischen Effekts in jeder Kavität. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte nach der Formel von Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977).

$$\log_{10}TCID_{50} = x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r}{n}$$

- x₀ log₁₀ des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Reagenten positiv sind
- d log₁₀ des Verdünnungsfaktors (bei Zehnerverdünnung d = 1)
- n Zahl der Reagenten, die für jede Verdünnung eingesetzt wurden (nach Abzug nicht ablesbarer Reagenten)
- r Zahl der positiven Reagenten pro Gruppe

3.2.7 Berechnung der Multiplizität der Infektion (MOI)

Die MOI gibt die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten bezogen auf eine Zelle an und besitzt infolgedessen die Einheit [pfu/Zelle]. Anhand des durch Plaquetest bestimmten Virustiters wurde berechnet, welches Volumen der Virussuspension eingesetzt werden musste, um eine bestimmte Anzahl Zellen mit einer definierten MOI infizieren zu können.

3.2.8 Wachstumskinetik

Zellen wurden konfluent in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät, vor der Infektion einmal mit PBS gewaschen und mit einer MOI von 0,001 mit dem jeweiligen Virus infiziert. Je Virus wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C im

Brutschrank mit dem Virus inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 12,5 ml Infektionsmedium mit Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) zu den Zellen gegeben und sofort eine Probe von 0,5 ml entnommen, die dem Zeitpunkt $T = 0$ (T_0) entsprach. Weitere Proben wurden 8, 24, 48 und 72 h nach T_0 entnommen. Die Virustiter der Zellkulturüberstände wurden durch Plaquetest auf MDCKII-Zellen bestimmt (Abschnitt 3.2.6.2). In der Wachstumskurve wurden die ermittelten Virustiter im Logarithmus zur Basis zehn ($\log_{10}[\text{pfu/ml}]$) gegen die Zeit nach der Infektion (post infection, p. i.) aufgetragen.

3.2.9 Virus-Anzucht

3.2.9.1 Anzucht auf Zellkultur

Die Anzucht von Viren humaner bzw. Säuger-Herkunft und der R65-E-Mutante (Abschnitt 3.2.5) erfolgte in Zellkultur auf MDCKII-Zellen. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium mit Trypsin (2 µg/ml) oder Elastase (5 µg/ml) versetzt. Pauschal wurden 25-50 µl Virussuspension, zumeist Rescue-Überstand (Abschnitt 3.2.4), zu den Zellen gegeben. Sobald ein zytopathischer Effekt erkennbar war, wurde das Vorhandensein von Virus durch einen HA-Test bestätigt (Abschnitt 3.2.6.1). Die Virussuspension wurde für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -70°C eingelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte anhand eines Aliquots nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2).

3.2.9.2 Anzucht in embryonierten Hühnereiern

Viren aviärer Herkunft wurden, wenn nicht anders verzeichnet, in 10 Tage alten embryonierten SPF White Leghorn Hühnereiern vermehrt. Dazu wurde das stumpfe Ende jedes Eis mit einer Jodlösung desinfiziert und die Schale so durchbohrt, dass ein kleines Loch entstand. Je Ei wurden 200 µl einer geeigneten Virusverdünnung mit Hilfe einer Spritze injiziert. Anschließend wurde das Loch der Eischale mit Kerzenwachs versiegelt und die Eier für 3-5 Tage bei $37,5^\circ\text{C}$ und 50% Luftfeuchtigkeit unter Wenden bebrütet. Die Eier wurden täglich durchleuchtet. Bei Absterben des Embryos, spätestens jedoch 6 Tage nach der Infektion, wurden die Eier mindestens 24 h im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Virusernte erfolgte durch Öffnen des Eis und Absaugen der Allantoisflüssigkeit. Diese wurde zum Entfernen von Schwebstoffen zentrifugiert, aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt. Die Titerbestimmung wurde anhand eines Aliquots nach einem Einfrier-

Auftau-Zyklus durch Plaquetest durchgeführt (Abschnitt 3.2.6.2). Je Virusverdünnung wurden mehrere Eier infiziert. Geeignete Verdünnungsstufen lagen zumeist zwischen 10^{-4} und 10^{-6} . Die Verdünnungen, die nach Eianzucht den höchsten HA-Titer lieferten, wurden gepoolt und bei -70°C eingelagert.

3.2.10 Plaquereinigung

Da man davon ausgeht, dass die Bildung eines Plaques von einem Viruspartikel ausgeht, wurde von einer zu reinigenden Virussuspension ein Plaquetest wie unter Abschnitt 3.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Anstatt den Plaquetest mit Kristallviolett-Lösung zu färben, wurden in der Virus-Verdünnung, in der Plaques einzeln voneinander unterschieden werden konnten, einzelne Plaques mit einer Pipettenspitze ausgestochen. Die gestochenen Plaques wurden in PBS mit 1% BSA über Nacht bei 4°C gelöst und anschließend in Zellkultur vermehrt (Abschnitt 3.2.9.1), um eine ausreichende Menge Virus für eine RNA-Isolierung (Abschnitt 3.1.1.1) und Genotypisierung (Abschnitt 3.1.2.16) zu erhalten.

3.2.11 Aufreinigung von Virionen durch Ultrazentrifugation

Die Aufreinigung von Virionen erfolgte durch Ultrazentrifugation mit dem Rotor SW32 Ti für 3 h bei 28500 rpm und 4°C . Dazu wurden ca. 15 ml einer Virussuspension in ein 17 ml Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben. Die Virussuspension wurde anschließend mit 2 ml 25%iger Sucrose unterschichtet. Zum Austarieren der Röhrchen wurde PBS hinzu gefügt. Nach dem Zentrifugieren waren die Virionen am Boden der Röhrchen als weißes Pellet zu erkennen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Virionen wurden in 30 - 50 μl PBS über Nacht bei 4°C gelöst.

3.2.12 Reversionsexperiment

Zur Überprüfung der Reversionswahrscheinlichkeit der R65-E-Mutante (Abschnitt 3.4.1) *in vitro* wurden in Anlehnung an Stech *et al.* (2005) jeweils zehn T162 Zellkulturflaschen konfluente MDCKII-Zellen mit einer Virusmenge von je 10^8 , 10^7 oder 10^6 pfu unter Zugabe von Trypsin ins Infektionsmedium infiziert (Abschnitt 3.2.2). Nach 24 h wurde der gesamte Überstand jedes Infektions-Ansatzes auf eine neue T162 Flasche mit konfluenten MDCKII-Zellen übertragen. 72 h später wurde die Hälfte des Zellkultur-Überstandes 1:1 mit frischem Infektionsmedium inkl. Trypsin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und auf je eine neue T162

mit konfluenten MDCKII-Zellen gegeben. Die dritte Viruspassage erfolgte analog zur zweiten 72 h später.

Bei jeder Passage wurden die Zellen auf CPE überprüft. Von jedem Zellkultur-Überstand wurde ein Plaquetest mit Trypsin im *Overlay* durchgeführt (Abschnitt 3.2.6.2), um zu testen, ob sich eine Trypsin-abhängige Reversionsmutante gebildet hatte. Bei positivem Ergebnis wurde von jeder Trypsin-abhängigen Revertante eine Plaquereinigung (Abschnitt 3.2.10) vorgenommen, RNA isoliert (Abschnitt 3.1.1.1) und die HA-Spaltstelle sequenziert (Abschnitt 3.1.2.8). Für die Sequenzierung der Spaltstellen-Region des R65-HA wurde der Primer H5-471 verwendet (Abschnitt 2.12.3).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Infizierte oder nicht-infizierte Zellen auf 3 cm² Zellkulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 250 µl 1 x PAGE-Probenpuffer lysiert. Die Zelllysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Ultraschall homogenisiert (10-15 sec, Output 10). Die Zelllysate wurden für 5 min bei 95°C erhitzt. Daraufhin wurden jeweils 10 µl des Lysates auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Abschnitt 3.3.6).

3.3.2 Herstellung von Zellextrakten

Für die Aufreinigung von viralen Ribonukleoproteinkomplexen (Abschnitt 3.3.3) wurden Zellextrakte von infizierten Zellen hergestellt. Pro Ansatz wurden je nach Verfügbarkeit 3 bis 4 T162-Kulturflaschen 100% konfluente Zellen mit einer MOI von 5 infiziert (Abschnitt 3.2.2) und 6 h nach Infektion lysiert. Dazu wurden nach dem Waschen der Zellen mit PBS zu je einer T162 - Kulturflasche 2 ml Zelllysis-Puffer gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelllysate wurden in mehrere 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände gleicher Infektionsansätze wurden gepoolt.

3.3.3 Aufreinigung viraler RNP-Komplexe durch Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung *Strep*-getaggtter vRNP-Komplexe und möglicherweise assoziierter Wirtsproteine wurden die Streptactin-Chromatographiesäulen und das Puffersystem (Wasch-, Elutions- und Regenerationspuffer) von IBA den Hersteller-Angaben zufolge verwendet. Der Zellextrakt mit dem enthaltenen Zielprotein (Abschnitt 3.3.2) wurde auf

die Chromatographie-Säule aufgetragen und nach dem Durchfluss mit 5 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte wie vom Hersteller vorgeschlagen mit 6 x 0,5 ml Elutionspuffer. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die erste und letzte Fraktion wurden verworfen, da hier der Proteingehalt am niedrigsten ausfiel.

Der Proteingehalt der aufgefangenen Fraktionen wurde auf einem Silbergel überprüft (Abschnitt 3.3.8.1). Nach dem Vereinigen Protein-haltiger Fraktionen wurde eine TCA-Fällung (Abschnitt 3.3.4) zur Anreicherung der Proben durchgeführt. Ein kleines Aliquot, meist 1/10 Volumen des Fällungsproduktes, wurde auf einem 10%igen Coomassie-Gel analysiert (Abschnitt 3.3.8.2). Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein präparatives 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen (Abschnitt 3.3.6), dieses mit Coomassie gefärbt (Abschnitt 3.3.8.2) und für die massenspektrometrische Analyse in das Labor für Biochemie und Proteomik des FLI gegeben (Abschnitt 3.3.9). Zwischenzeitlich wurden die Elutions-Fraktionen bei -70°C aufbewahrt.

3.3.4 Trichloressigsäure-Fällung

Zur Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurde 1 Volumen 20%iger TCA-Lösung zur Probe gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13200 rpm und 4°C . Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 Volumen 2%iger TCA-Lösung gewaschen. Nach einer weiteren Inkubationszeit auf Eis für 5 min und einem 5minütigen Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 1 Volumen eiskaltem Aceton gewaschen. Die Probe wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Daraufhin wurde die Probe in 50-75 μl 1xSDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein Proteingel (Abschnitt 3.3.6) wurde die Probe für 5 min bei 95°C erhitzt.

3.3.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels BCA-Test nach Smith et al. (1987) durchgeführt. Zum Erstellen der Messlösung wurden je 1 ml BCA-Stammlösung und 20 μl 4%ige Kupfersulfatlösung miteinander vermischt. Jeweils 2 μl einer unverdünnten Proteinlösung wurden zu 0,5 ml Messlösung gegeben und für 1 h bei 60°C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte in Einmalküvetten bei 562 nm. Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe wurde in Duplikaten anhand einer BSA-Standardkurve durchgeführt. Dazu

wurden verschiedene Mengen-Standards von 0 bis 10 µg BSA eingesetzt. Die Berechnung der Probenkonzentration wurde im Dreisatz unter Berücksichtigung des Messvolumens vorgenommen.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine in Zelllysaten (Abschnitt 3.3.1), Virionen-Präparationen (Abschnitt 3.2.11) oder Protein-Aufreinigungen (Abschnitt 3.3.3) wurden elektrophoretisch durch vertikale Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (β -Mercaptoethanol) in einem SDS-Polyacrylamid-Minigel ihrer Größe entsprechend getrennt. Als Größenstandard wurden je Gel 10 µl eines Molekulargewichtmarkers (Abschnitt 2.10) aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einer entsprechenden Menge 4xPAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Das Protein-Gel wurde in Abhängigkeit der darzustellenden Proteine für 45 - 75 min bei 200 Volt angeschlossen.

Zu präparativen Zwecken wurden die Proteinproben auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-XL-Gel aufgetrennt. Dieses wurde für 3 h bei 250 Volt angeschlossen.

3.3.7 Western-Blot

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine (Abschnitt 3.3.6) wurden mit Hilfe einer Semi-Dry-Apparatur oder eines Tankblots auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Sowohl die Membran als auch die Blotpapiere wurden zuvor in Blotpuffer getränkt. Der Elektrotransfer erfolgte für 1h bei 100 Volt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockingpuffer geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (Abschnitt 2.9) in Blockingpuffer wurde für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C durchgeführt. Die Membran wurde daraufhin je zweimal kurz mit PBS/0,3% Tween20 und PBS/0,1% Tween20 gewaschen. Anschließend wurde der HRP-gekoppelte Zweitantikörper in PBS/0,1% Tween verdünnt auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Peroxidase-Substrat (Super-Signal) den Hersteller-Angaben zufolge zum Blot gegeben und dieser auf einem Belichtungsfilm entwickelt.

Zum Strippen der Membranen wurden diese nach dem Entwickeln mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen, zweimal je 10 min in Stripping-Puffer inkubiert und mehrfach gewaschen. Anschließend wurde die Membran erneut geblockt und mit einem Primär- und Sekundärantikörper wie oben beschrieben behandelt.

3.3.8 Unspezifisches Anfärben von Proteinen

3.3.8.1 Silberfärbung

Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde nach der Elektrophorese (Abschnitt 3.3.6) in der Fixierlösung für 30 min fixiert. Danach folgten eine 20 minütige Behandlung mit dem Sensitizing-Puffer und drei Waschschriffe mit A. dest. für jeweils 5 min. Anschließend wurde die Silberfärbelösung für 20 min auf das Gel gegeben. Die nicht an Proteine gebundenen Silber-Ionen wurden durch zweimaliges Waschen mit A. dest. für jeweils 1 min abgespült. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde das Gel für bis zu 10 min in der Entwickler-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung abgestoppt. Das Gel wurde bis zum Einscannen in A. dest. bei 4°C aufbewahrt.

3.3.8.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbelösung wurde frisch angesetzt und das SDS-Polyacrylamid-Gel (Abschnitt 3.3.6) darin über Nacht unter Schütteln inkubiert. Zum Entfernen des Hintergrunds wurde das Gel zunächst kurz mit 50% Methanol gewaschen und anschließend für 5 min mit 20% Methanol behandelt. Das Gel wurde mindestens für 24 h bei 4°C in A. dest. aufbewahrt bevor es für die massenspektrometrische Analyse in das Labor für Biochemie und Proteomik des FLI gegeben wurde (Abschnitt 3.3.9).

3.3.9 Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinen im Coomassie-Gel (Abschnitt 3.3.8.2) erfolgte anhand ihrer Masse mit Hilfe der Matrix-assoziierten Laserdesorptions/Ionisations (MALDI)-tof (time of flight)-Analyse. Der Trypsin-Verdau und die Identifizierung der aus dem Coomassie-Gel ausgeschnittenen Proteinbanden erfolgten wie in Skiba *et al.* (2008) beschrieben.

3.3.10 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis der Expression des *Strep*-getaggtten PB2 (Abschnitt 3.1.2.13) wurden in 24-Lochplatten ausgesäte MDCKII-Zellen mit den rekombinanten Viren mit einer MOI von 0,1 für 24 h infiziert (Abschnitt 3.2.2). Als Kontrolle wurden nicht-infizierte und mit dem entsprechenden ungetaggtten Virus infizierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Aceton/Methanol (1:1) für 20 min bei 4°C fixiert. Nach zwei weiteren PBS-Waschschriffen wurden die Zellen für 1 h

in PBS/1% BSA geblockt und dann für 1 h mit dem in frischer Blockinglösung verdünnten α -*Strep*-Antikörper (Kaninchen) sowie NP-Antikörper (Maus) inkubiert (Abschnitt 2.9). Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und für 60 min mit einem Alexa Fluor[®] 488 (α -Maus) und Alexa Fluor[®] 594 (α -Kaninchen) gekoppelten Sekundär-Antikörper, je 1:1000 in PBS/1% BSA verdünnt, inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurde Dabco im Verhältnis 1:1 mit PBS auf die Zellen gegeben und diese im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.3.11 Polymerase-Assay

Die Polymerase-Aktivität eines Influenza-Virus wurde mit Hilfe eines *in vitro* Reporter-Tests ermittelt (Wunderlich et al., 2009). Als Reportergene wurden die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase eingesetzt. Für die Durchführung des Tests wurden HEK293T-Zellen in 12-Lochplatten mit je 50 ng jedes P-Gen-Plasmids und 200 ng des NP-Plasmids transient transfiziert (Abschnitt 3.2.3). Zusätzlich wurden 25 ng des *Firefly*-Luciferase-Plasmids (pPoll_LucRT) und 5 ng des *Renilla*-Luciferase-Plasmids (pRL) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen den Hersteller-Angaben zufolge lysiert und die Aktivität der beiden Luciferase-Gene mit dem Dual-Glo (R) Luciferase-Kit (siehe Angaben des Herstellers) gemessen. Die Expression des Luciferase-Gens war proportional zur viralen Polymerase-Aktivität. Die *Renilla*-Polymerase wurde hingegen konstitutiv von den Zellen exprimiert und diente als interne Normalisierungs-Kontrolle.

Als Negativkontrolle wurden in jedem Versuch nicht-transfizierte Zellen mitgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit einem *Firefly*-Luciferase-Plasmid unter der Kontrolle des immediate early hCMV Promoters transfiziert. Es wurden je Test-Ansatz mindestens drei unabhängige Versuche in Triplikaten durchgeführt. Die Werte wurden einer statistischen Auswertung mit Hilfe des GraphPad Prism5.0-Programms unterzogen. Beim Vergleich von zwei unabhängigen Ansätzen wurde der T-Test, beim Vergleich von mindestens drei Ansätzen der One-Way-Anova-Test verwendet.

3.3.12 PA-Bindungsstudie mittels ELISA

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität von PA-Proteinen verschiedener Herkunft zu PB1-Molekülen mit einem Valin bzw. Isoleucin an Aminosäure-Position 12, wurde das jeweilige PA in pCAGGS zusammen mit einem HA-tag kloniert (Abschnitt 3.1.2.14). Das rekombinante PA wurde in HEK-293T-Zellen exprimiert, mit einem α -HA-tag-Antikörper

immunopräzipitiert und die Affinitätsmessung zu biotinylierten PB1-Peptiden (PB1 1-25cons, PB1 1-15 12V, PB1 1-15 12I) mit Hilfe eines Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) nach Wunderlich *et al.* (2009) durchgeführt. Je zu testendem PA und Peptid wurden drei Tests durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, bei denen entweder keine biotinylierten PB1-Peptide an die Streptavidin-Matrix der Mikrotiterplatte gebunden wurden (*uncoated*) oder α -HA-immunopräzipitierte Proben von Zellextrakten mit pCAGGS-HA transfizierten Zellen (*scrambled*).

3.4 Durchführung und Auswertung der Tierversuche im Huhn

3.4.1 Infektion der Versuchstiere

Die Infektion der Versuchstiere erfolgte mit jeweils 10^6 pfu Virus in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Die Virusverdünnung wurde in sterilem PBS angesetzt. Die Kontroll-Tiere wurden entsprechend mit 100 μ l PBS „mock“-infiziert. Die für die Infektion eingesetzte Virusverdünnung wurde außerdem zur Titer-Überprüfung durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) rück-titriert.

3.4.1.1 Okulonasale Infektion

100 μ l der Virusverdünnung (Abschnitt 3.4.1) oder PBS wurde den Versuchstieren gleichmäßig in beide Augen und Nasenöffnungen getropft.

3.4.1.2 *In ovo* Infektion

White Leghorn Hühnereier wurden an Tag 18 der Embryonalentwicklung wie in Toro *et al.* (2007) beschrieben *in ovo* infiziert. Hierbei wurden die Eier am stumpfen Ende mit Jod desinfiziert und ein kleines Loch in die Eischale gebohrt. Anschließend wurden 100 μ l der Virussuspension mit einer 2,5 cm langen, 0,8 mm dicken Kanüle (21 Gauge) in die Amnionhöhle des Embryos injiziert. Das Loch der Eischale wurde mit Kerzenwachs versiegelt und die Eier bis zum Schlupf an Tag 21 bei 37°C und 80% Luftfeuchte bebrütet.

3.4.2 Charakterisierung von R65-E *in vivo*

3.4.2.1 Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach okulonasaler Applikation

Die Attenuierung der R65-E-Mutante sowie deren Schutzwirkung gegen eine HPAIV Infektion wurde in SPF Hühnern untersucht. Dazu wurden 40 White Leghorn

Eintagsküken okulonasal mit 10^6 pfu der R65-E-Mutante infiziert (Abschnitt 3.4.1.1). Die Hälfte der Tiere wurde im Alter von drei Wochen geboostert (2 x R65-E-Gruppe). Dazu wurden den Tieren weitere 10^6 pfu R65-E okulonasal appliziert. Als Kontrolle wurden 20 Eintagsküken mit PBS mock-infiziert und 3 weitere Eintagsküken mit dem revers-genetischen R65-Virus (rgR65) infiziert. Im Alter von sechs Wochen wurden alle Tiere einer Belastungsinfektion ausgesetzt (Challenge). Jeweils 10 Tiere pro Gruppe (Kontrolle, 1xR65-E, 2xR65-E) wurden hierbei mit 10^6 pfu des homologen rgR65-Virus bzw. des heterosubtypischen R65-H9_{R66mutR65} (Abschnitt 2.4) okulonasal infiziert.

Die Tiere wurden täglich klinisch beurteilt (Abschnitt 3.4.3). An den Tagen 2, 4, 6 und 8 nach der ersten R65-E-Infektion (post infection, p. i.) und nach dem Challenge (post challenge, p. c.) wurden von allen Tieren oropharyngeale und kloakale Tupferproben genommen (Abschnitt 3.4.4). Der Gehalt von replikationsfähigem Virus in den Tupferproben wurde durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) oder durch Bestimmung des TCID₅₀-Wertes (Abschnitt 3.2.6.3) ermittelt. Der Nachweis viraler RNA in den Tupferproben nach Challenge erfolgte zudem mittels qRT-PCR (Abschnitt 3.1.1.5).

An den Tagen 2, 5 und 7 p. i. wurden drei zusätzliche mit der R65-E-Mutante infizierte Tiere und drei zusätzliche Kontroll-Tiere durch Isofluran-Inhalation betäubt und durch Blutentzug getötet. Die entnommenen Organe und das Blut wurden histologisch (Abschnitt 3.4.6) und immunologisch untersucht (Abschnitt 3.4.7.3).

Des Weiteren wurden alle Tiere an den Tagen 21 p. i., 42 p. i. und 14 p. c. geblutet, Serum gewonnen (Abschnitt 3.4.5) und die Anwesenheit AIV-spezifischer Antikörper mittels HAH (Abschnitt 3.4.7.1) oder indirekter Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.4.7.2) überprüft. Zudem wurde jeweils drei Tieren pro Gruppe an den Tagen 2, 5, 7 und 14 p. c. Blut entnommen und die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im FACS analysiert (Abschnitt 3.4.7.3).

Am Versuchsende an Tag 14 p. c. wurden alle Tiere durch Isofluran-Inhalation betäubt und durch Blutentzug getötet.

3.4.2.2 Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach *in ovo* Applikation

24 Eier wurden *in ovo* mit 10^6 pfu R65-E infiziert (Abschnitt 3.4.1.2). Der Hälfte der Eier wurde zudem das Enzym Elastase (2,5 µg je Ei) zugesetzt. Die Tiere wurden direkt nach dem Schlupf und an den drei darauffolgenden Tagen oral und kloakal getupfert (Abschnitt 3.4.4). Die Auswertung der Tupfer erfolgte mittels Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) und qRT-

PCR (Abschnitt 3.1.1.5). An den Tagen 21 und 42 nach Schlupf wurde den Tieren Blut entnommen (Abschnitt 3.4.5) und die Seren auf das Vorhandensein von AIV-spezifischen Antikörpern mittels HAH-Test (Abschnitt 3.4.7.1) und durch indirekte Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.4.7.2) untersucht. Sechs Wochen nach Schlupf wurden die Tiere mit dem homologen revers-genetischen R65-Virus (rgR65) infiziert. Nach Belastungsinfektion wurden an den Tagen 2 - 9 p. c. oropharyngeale und kloakale Tupferproben genommen. Die Tupfer wurden auf die Anwesenheit viraler RNA durch qRT-PCR (Abschnitt 3.1.1.5) untersucht und der Gehalt infektiösen Virus durch Bestimmung des TCID50-Wertes (Abschnitt 3.2.6.3) ermittelt. Am Versuchsende an Tag 14 p. c. wurden alle Tiere durch Isofluran-Inhalation betäubt und durch Blutentzug getötet. Aus dem Blut wurde Serum gewonnen (Abschnitt 3.4.5) und der AIV-spezifische Antikörper-Titer im HAH-Test (Abschnitt 3.4.7.1) bestimmt.

3.4.3 Klinische Beurteilung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach Infektion mit der R65-E-Mutante bzw. dem Challenge-Virus täglich auf Krankheitsanzeichen untersucht.

Tabelle 3.2: Skala für die klinische Beurteilung der Versuchstiere und Symptomatik

Punkte	Beschreibung	Symptome
0	gesund	keine klinischen Symptome
0,5	leicht krank	leichte, sporadische, respiratorische Symptome
1	krank	eines der folgend aufgeführten Symptome: - Depression - respiratorische Symptome - Diarrhoe - Zyanosen der unbefiederten Haut o. Kopfanhänge - Ödeme - zentralnervöse Störungen
2	schwer krank	mehr als eines der oben aufgeführten Symptome
3	tot	Tier tot aufgefunden bzw. am Tag zuvor moribund getötet

In Abhängigkeit der auftretenden Symptome wurde jedes Tier auf einer Skala von 0 bis 3 (siehe Tabelle 3.2) klinisch bewertet. Auf Grundlage dieser Beurteilung wurden die täglichen klinischen Indices berechnet. Sie ergeben sich aus dem Mittelwert aller für die Tiere einer Gruppe pro Tag vergebenen Punkte.

3.4.4 Gewinnung von Tupferproben

Zur Untersuchung der Virusausscheidung nach Infektion der Versuchstiere wurden oropharyngeale und kloakale Abstriche genommen. Die Tupfer wurden in 1 ml Tupfermedium in 2 ml Reaktionsgefäßen kurz gevortext und anschließend für 30 min bei 200 rpm und RT geschüttelt. Die Tupfer wurden daraufhin bis zu ihrer Bearbeitung bei -70°C gelagert.

3.4.5 Gewinnung von Blut- und Serumproben

Für die Blutgewinnung wurde den Versuchstieren in Abhängigkeit von Alter und Verwendungszweck 1-5 ml Blut an der Flügelvene (Vena basilica) entnommen. Zur Unterbindung der Blutgerinnung wurden 50 µl Heparin (25000 I.E./ml) je 1 ml Blut in ein geeignetes Auffanggefäß vorgelegt. Das Heparin-versetzte Blut wurde im Zuge der Untersuchung immunologischer Parameter weiter aufgearbeitet (Abschnitt 3.4.7.3).

Für die Gewinnung von Serum wurde das Blut bei der Entnahme in Microtainer Serumseparatortröhrchen aufgefangen und für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Die Röhrchen wurden anschließend 5 min bei 10000 g zentrifugiert, das Serum abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

3.4.6 Pathomorphologische Untersuchungen

3.4.6.1 Sektion

Nach der Belastungsinfektion verstorbene oder moribund getötete Tiere sowie am Versuchsende euthanasierte Tiere wurden sezirt und auf makroskopisch sichtbare Läsionen untersucht.

3.4.6.2 Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden den Versuchstieren im Zuge der Sektion folgende Organe entnommen: Luftröhre, Lunge, Milz, Bursa, Herz, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Zäkaltonsille, Niere und Gehirn. Zur Beurteilung der histomorphologischen

Veränderung am Paraffinschnitt wurde eine Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung angefertigt. Der Nachweis des Influenzavirus Nukleoproteins erfolgte immun-histochemisch mittels ABC-Methode. Die pathomorphologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Angele Breithaupt (Labor für Pathologie und Bakteriologie, FLI) durchgeführt. Das genaue Vorgehen ist in Breithaupt *et al.* (2010) beschrieben.

3.4.7 Immunologische Untersuchungen

3.4.7.1 Antikörpernachweis durch Haemagglutinations-Hemmtest (HAH)

Die Detektion von Antikörpern im Serum von infizierten Tieren wurde mittels Haemagglutinations-Hemmtest (HAH) durchgeführt. Vor der Durchführung des HAH-Tests wurde zunächst der HA-Titer der verwendeten Antigen-Lösung bestimmt. Dazu wurde ein HA-Test wie unter Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden allerdings statt 50 µl PBS, Virus und Erythrozyten jeweils die Hälfte der Substanzen verwendet. Anschließend wurde anhand des HA-Titers eine Antigenverdünnung hergestellt, die 4 haemagglutinierende Einheiten (HAE) enthielt. Nach einer Bestätigung des Antigengehaltes in einem erneuten HA-Test wurden in jede Vertiefung einer 96-Rundbodenplatte jeweils 25 µl PBS vorgelegt. Anschließend wurden 25 µl der zu testenden Seren hinzu gegeben und in Zweifach-Verdünnungsstufen über die Platte titriert. Je 96-Lochplatte wurde eine Reihe als Erythrozytenkontrolle und eine Reihe für die Antigenkontrolle frei gelassen. Daraufhin wurden in jede Kavität 25 µl der Antigenverdünnung gegeben, vermischt und für 45 min bei RT inkubiert. Zur Erythrozytenkontrolle wurden kein Virus sondern weitere 25 µl PBS gegeben. In der Reihe für die Antigenkontrolle wurde eine Zweifach-Verdünnungsreihe des Antigens pipettiert und das Volumen mit weiteren 25 µl PBS auf 75 µl angepasst. Nach 45 min wurden in jede Kavität 25 µl einer 1%igen Erythrozytenlösung gegeben, vermischt und für 30-45 min bei RT inkubiert. Das Ablesen des Ergebnisses erfolgte durch Schräghalten der Platte. Positive Seren konnten auf Basis des Laufverhaltens der Erythrozytenkontrolle abgelesen werden. Die höchste Verdünnung, bei der die Agglutination der Erythrozyten inhibiert wurde, entsprach dem Antikörper-Titer. Die Validität des Tests wurde zudem durch das Mitführen eines positiven und negativen Kontrollserums überprüft.

Als Antigen für den Nachweis H5-spezifischer Antikörper wurde das R65m-Virus und für die Bestimmung H9-spezifischer Antikörper wurde das Virus A/Chicken/Emirates/R66/02 (H9N2) (Abschnitt 2.4) eingesetzt. Als Positivkontrolle im HAH-Test diente entweder ein

α -H5N2 Hühnerserum oder ein α -H9N2 Kaninchenserum, als Negativkontrolle wurde ein α -ILTV Hühnerserum verwendet (Abschnitt 2.9).

3.4.7.2 Antikörpernachweis durch indirekte Immunfluoreszenz

Im HAH negativ oder nicht eindeutig getestete Seren wurden zusätzlich im indirekten Immunfluoreszenz-Test (IF) auf das Vorhandensein von AIV-spezifischen Antikörpern untersucht. Dazu wurden konfluente QM9-Zellen in 48-Lochplatten mit dem monobasischen R65m-Virus mit einer MOI von 0,01 infiziert. Nach 1 h wurde das Inokulum abgenommen und durch 500 μ l 0,25 x Methocel in 28D-Infektionsmedium mit Trypsin (2 μ g/ml) ersetzt. Die Zellen wurden für 20 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für 20 min bei 4°C fixiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und mit den 1:10 in PBS verdünnten Seren für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper mit Hilfe eines 1:1000 verdünnten FITC-gekoppelten α -Huhn Sekundär-Antikörpers. Diesem wurde zur Gegenfärbung der Zellkerne zusätzlich 0,1%ige Evans-Blue-Lösung in einer Verdünnung von 1:5000 beigefügt. Die Inkubation wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop. Die infizierten Zellen erschienen im Fall eines positiven Serums in Form von fluoreszierenden Plaques, da das zähflüssige Methocel die Virusausbreitung auf Zell-zu-Zell-Infektion begrenzt hat.

3.4.7.3 FACS-Analyse

Zur Bestimmung des prozentualen Anteiles von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Lymphozyten (Bu1A) und MHCII⁺/Bu1A- Zellen an der Lymphozytenpopulation (CD45^{high}) im Blut und in den Organen infizierter Tiere wurden von den Organen Milz, Bursa, Lunge und Gehirn Einzelzellsuspensionen hergestellt. Periphere Blutleukozyten wurden nach Dichtezentrifugation mit LSM 1077 (PAA) gewonnen. Jeweils 1x10⁶ Leukozyten wurden mit den in Tabelle 3.3 aufgeführten Antikörpern auf der Zelloberfläche markiert.

Die Messung und Auswertung der prozentualen Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation (CD45^{high}) erfolgte mittels Durchflusszytometrie FACS (BD Biosciences) und Cellquest software.

METHODE

Tabelle 3.3: Für die Markierung verwendete Antikörper.

Antigen	Klon	Firma
mouse anti chicken CD4	2-35	Serotec, Düsseldorf
mouse anti chicken CD8	11-39	Serotec, Düsseldorf
mouse anti chicken Bu1A	L22	Serotec, Düsseldorf
mouse anti chicken MHCII	21-1A6	Serotec, Düsseldorf
mouse anti chicken CD45	UM16-6	Serotec, Düsseldorf

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung von Influenza-A-Viren

4.1.1 Klonierung des Hk68-Virus

Zur Klonierung der acht Gensegmente des Virus A/Hong Kong/1/68 (H3N2) (,Hk68^c) wurde wie unter Abschnitt 3.1.2.10 beschrieben vorgegangen. Die im „7 + 1“-Rescue (Abschnitt 3.2.4) mit den 7 Plasmiden des Laborstammes A/WSN/33 (H1N1) (WSN) einzeln positiv getesteten Hk68-Plasmidklone wurden vollständig sequenziert und mit den Sequenzen des für die Klonierung eingesetzten Ausgangsvirus verglichen. Dabei konnten keine Mutationen festgestellt werden (Tabelle 4.1, Spalte 3). Ausgehend von allen acht Hk68-Plasmiden konnte daraufhin in einem homologen Rescue (Abschnitt 3.2.4) vermehrungsfähiges Virus generiert werden. Dieses wurde genotypisiert (Abschnitt 3.1.2.16) und wies ebenfalls keine Sequenzveränderungen auf.

Tabelle 4.1: Klonierung der Gensegmente des Hk68-Virus und Sequenzvergleich

Segment	Rescue 7 (WSN) +1	Sequenzvergleich Virusstock -> Plasmidklon
PB2 (2341 Nt)	+	100%
PB1 (2341 Nt)	+	100%
PA (2233 Nt)	+	100%
HA (1765 Nt)	+	100%
NP (1565 Nt)	+	100%
NA (1467 Nt)	+	100%
M (1027 Nt)	+	100%
NS (890 Nt)	+	100%

4.1.2 Klonierung des Seal80-Virus

Die Klonierung der Gensegmente des Virus A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) (,Seal80^c) wurde analog zu der Hk68-Klonierung durchgeführt. Lediglich für die Klonierung des NA-Segmentes wurde ein anderes Primerpaar verwendet (Abschnitte 2.12.1 und 3.1.2.9).

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Sequenz-Auswertung sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Beim Vergleich der Sequenzen der einzelnen Plasmidklone mit dem Ausgangsvirus wurden im PB2 zwei Punktmutationen und im PA eine Punktmutation detektiert, die sich somit auch in dem revers-genetischen Seal80-Virus wiederfanden. Diese führten jedoch zu keinem Aminosäure-Austausch („silent“) und wurden deshalb vernachlässigt.

Tabelle 4.2: Klonierung der Gensegmente des Seal80-Virus und Sequenzvergleich

Segment	Rescue 7 (WSN) +1	Sequenzvergleich Virusstock -> Plasmidklon	
		Homologie	Mutation
PB2 (2341 Nt)	+	99%	silent Asn ₅₄₀ silent Asp ₅₆₇
PB1 (2341 Nt)	+	100%	-
PA (2233 Nt)	+	99%	silent Glu ₁₈₁
HA (1731 Nt)	+	100%	-
NP (1565 Nt)	+	100%	-
NA (1461 Nt)	+	100%	-
M (1027 Nt)	+	100%	-
NS (890 Nt)	+	100%	-

4.1.3 Klonierung des R65-Virus

Die Klonierung des Virus A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) („R65“) erfolgte in Kooperation mit Dr. S. Gohrbandt und Dr. S. Weber vom FLI analog zum Hk68-Virus. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Funktionalität der R65-Plasmidklone und den Vergleich ihrer Sequenzen mit dem Wildtyp-Virus.

Die Funktionalität des R65 HA-Wildtypplasmids mit polybasischer Spaltstelle wurde unter BSL3-Bedingungen von Dr. S. Gohrbandt im homologen Rescue positiv getestet. Die übrigen Plasmide konnten unter BSL2-Bedingungen im „7 + 1“-Rescue überprüft werden. Es wurden keine Sequenzveränderungen zwischen dem revers-genetisch hergestellten Virus, den Plasmidklonen und dem Ausgangsvirus festgestellt.

Weiterhin wurde von Dr. S. Gohrbandt gezeigt, dass sich das revers-genetische Virus („rgR65“) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wie das Wildtyp-Isolat verhält. Aus praktischen Gründen wurden auf dem R65-System aufbauende *in vitro* Versuche jedoch mit einer monobasischen HA-Spaltstellenmutante durchgeführt, dem R65(mono)-S-ETR-Virus (Gohrbandt *et al.*, 2010). Sie wird in der vorliegenden Arbeit als R65m (mono) bezeichnet. Die polybasische HA-Spaltstelle wurde deletiert, so dass es möglich war, mit dem daraus resultierenden Virus unter BSL2-Bedingungen zu arbeiten. Eine wichtige Eigenschaft der R65m-Mutante ist, dass sie sich *in vitro* in Gegenwart von Trypsin wie das polybasische, revers-genetische Virus und somit auch wie das Wildtyp-Isolat verhält (Gohrbandt *et al.*, 2010).

Tabelle 4.3: Klonierung der Gensegmente des R65-Virus und Sequenzvergleich

Segment	Rescue 7 (WSN) +1	Sequenzvergleich Virusstock -> Plasmidklon
PB2* (2341 Nt)	+	100%
PB1* (2341 Nt)	+	100%
PA (2233 Nt)	+	100%
HA (1779 Nt)	n. d.	100%
NP* (1565 Nt)	+	100%
NA (1398 Nt)	+	100%
M* (1027 Nt)	+	100%
NS** (875 Nt)	+	100%

* von Dr. S. Gohrbandt kloniert, ** von Dr. S. Weber kloniert, n. d. = nicht selbst durchgeführt

4.2 Generierung getaggter Viren

Das Einfügen eines Affinitätstags in ein Protein wird in der Regel an dessen N-Terminus oder C-Terminus vorgenommen. Zusätzlich wird zwischen dem Protein und dem ‚Tag‘ häufig ein Peptidlinker inseriert. Im Fall des *Strep*-tag wurde von der Firma IBA ein Serin-Alanin-Linker vorgeschlagen. Das *Strep*-tag selbst ist ein acht Aminosäure großes, ~1 kDa schweres Peptid mit der Aminosäure-Sequenz: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys.

4.2.1 Einfügen eines *Strep*-tag am PB2-N-Terminus

Das Einfügen des *Strep*-tag am N-Terminus des PB2-Proteins ist in Abschnitt 3.1.2.13 detailliert beschrieben und in Abbildung 4.1 näher veranschaulicht. Das *Strep*-tag inklusive des Serin-Alanin-Linkers sollte dabei direkt hinter dem Start-Codon inseriert werden. Die in der Abbildung dargestellten Pfeile stellen die für die Klonierung verwendeten Primer dar und zeigen den Ort ihrer Bindung an das PB2-Wildtyp-Plasmid. Die grau gekennzeichneten Bereiche stellen die konservierten, nicht-kodierenden Enden des PB2-Segmentes dar: 27 Nukleotide (Nt) am 3'-Ende und 34 Nukleotide am 5'-Ende des Negativstrang-RNA-Moleküls. Der rot gekennzeichnete Bereich entspricht der Sequenz für das *Strep*-tag inklusive des davorgelegenen Start-Codons und des nachgeschalteten Linkers. Die gestrichelten Linien sowie die schwarze Linie gehören zum Vektor. Der pHW-R-Primer (Abschnitt 2.12.3) wurde als reverser Primer für das Einfügen des *Strep*-tag am N- und auch am C-Terminus des PB2 verwendet. Er konnte unabhängig vom Virusisolat für jedes PB2-Plasmid eingesetzt werden, da er im Vektorbereich bindet.

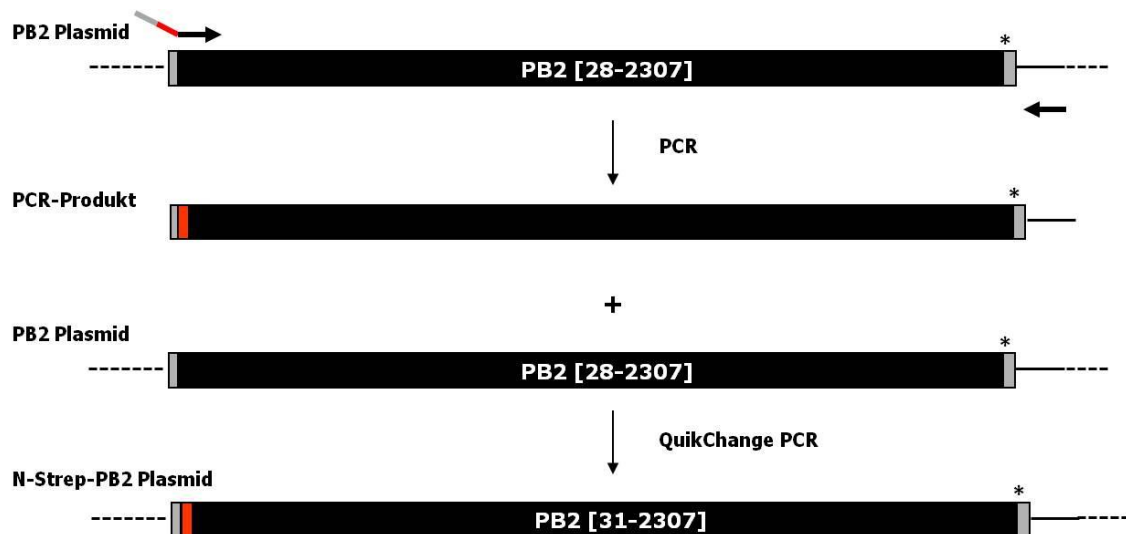


Abbildung 4.1: Klonierung von N-Strep-PB2. Mit Hilfe der eingezeichneten Primer (Pfeile) wurde ein Amplifikat generiert, das im Zuge der darauf folgenden QuickChange-Reaktion als Megaprimer fungierte. Der Forward-Primer enthielt u. a. die zu inserierende *Strep*-Sequenz (rot).

Auf die hier dargestellte Weise wurden N-terminal *Strep*-getaggte PB2-Plasmide der beiden Viren R65m und Hk68 hergestellt. Die rekombinanten Viren, R65m-N-Strep-PB2 und Hk68-N-Strep-PB2, wurden im homologen 8-Plasmid-Rescue generiert (Abschnitt 3.2.4), zum Erhalt einer größeren Virusmenge auf MDCKII-Zellen bzw. im Ei vermehrt (Abschnitt 3.2.9) und charakterisiert (Abschnitt 4.3). Das Vorhandensein des *Strep*-tag im

PB2-Segment der rekombinanten Viren wurde zudem durch Sequenzierung (Abschnitt 3.1.2.8) bestätigt.

4.2.2 Einfügen eines *Strep*-tag am PB2-C-Terminus

Beim Einfügen einer Sequenz am 5'-Ende auf RNA-Ebene (entspricht dem 3'-Ende auf DNA-Ebene und dem C-Terminus auf Protein-Ebene) des PB2-Segmentes musste das Vorhandensein von Signalsequenzen für die Verpackung von RNA-Segmenten beim Assembling-Prozess berücksichtigt werden. In einer Arbeit von Afonso *et al.* (2005) wurde festgestellt, dass die terminalen 143 Nukleotide im PB2 (106 Nt im kodierenden Bereich, das Stop-Codon und 34 Nt konserviertes 5'Ende) für die Verpackung des Segmentes relevant sind. Deshalb wurde zwischen der *Strep*-tag-Sequenz und dem konservierten Ende eine Duplikation der terminalen 109 kodierenden Nukleotide des PB2-Segmentes eingefügt. Zusätzlich wurde ein Stop-Codon hinter die *Strep*-Sequenz gesetzt, so dass die Duplikation nicht im Protein enthalten sein würde. Da am 3'-Ende des PB2-RNA-Segmentes keine Verpackungssignale identifiziert wurden, konnte die N-*Strep*-Mutante ohne Einfügen weiterer Sequenzen generiert werden.

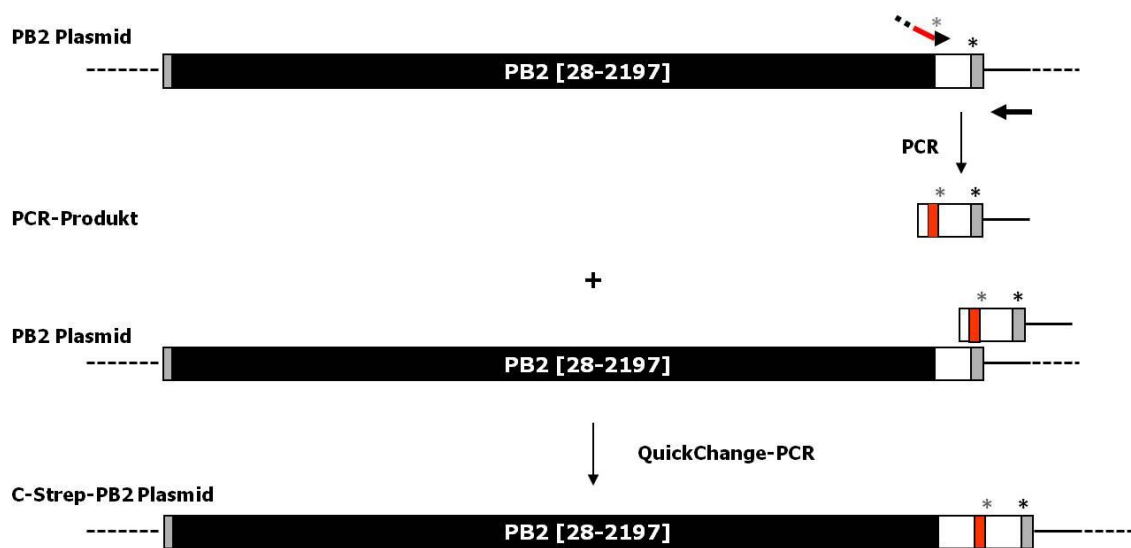


Abbildung 4.2: Klonierung von C-*Strep*-PB2. Mit Hilfe der eingezeichneten Primer (Pfeile) wurde ein Amplifikat generiert, das im Zuge der darauf folgenden QuickChange-Reaktion als Megaprimer fungierte. Der Forward-Primer enthielt u. a. die zu inserierende *Strep*-Sequenz (rot).

Abbildung 4.2 gibt den Ablauf der Klonierung des C-*Strep*-PB2 schematisch wieder. Die grauen Abschnitte entsprechen den konservierten Segmentenden. Der schwarze Bereich

entspricht der kodierenden Sequenz des PB2 bis auf die letzten 109 Nukleotide. Der weiße Bereich stellt die zu duplizierende Sequenz von 109 bp dar, der rote Bereich die *Strep*-Sequenz mit dem Linker davor und dem Stop-Codon dahinter. Die Sternchen kennzeichnen das Vorhandensein eines Stop-Codons und die durchgezogene bzw. gestrichelte Linie den Vektor-Bereich. Die Pfeile stellen die Primer dar und zeigen den Ort der Bindung im PB2-Molekül.

Der für die erste PCR eingesetzte Virus-spezifische Forward-Primer wurde derart konzipiert, dass er am 5'-Ende die letzten 15-20 Nukleotide der zu duplizierenden Sequenz enthielt. Darauf folgten die Linkersequenz, die Sequenz des *Strep*-tag und ein Stop-Codon. Am 3'-Ende wiederum befanden sich die ersten 18-23 Nukleotide der zu duplizierenden Sequenz. Das so generierte Amplifikat (siehe Abbildung 4.2) lagerte sich über homologe Bereiche an den Enden an das PB2-Wildtyp-Plasmid an und wurde im Verlauf der sich anschließenden QuickChange-Reaktion in die Zielsequenz inseriert. Das genaue Vorgehen bei der Klonierung ist unter Abschnitt 3.1.2.13 detailliert beschrieben.

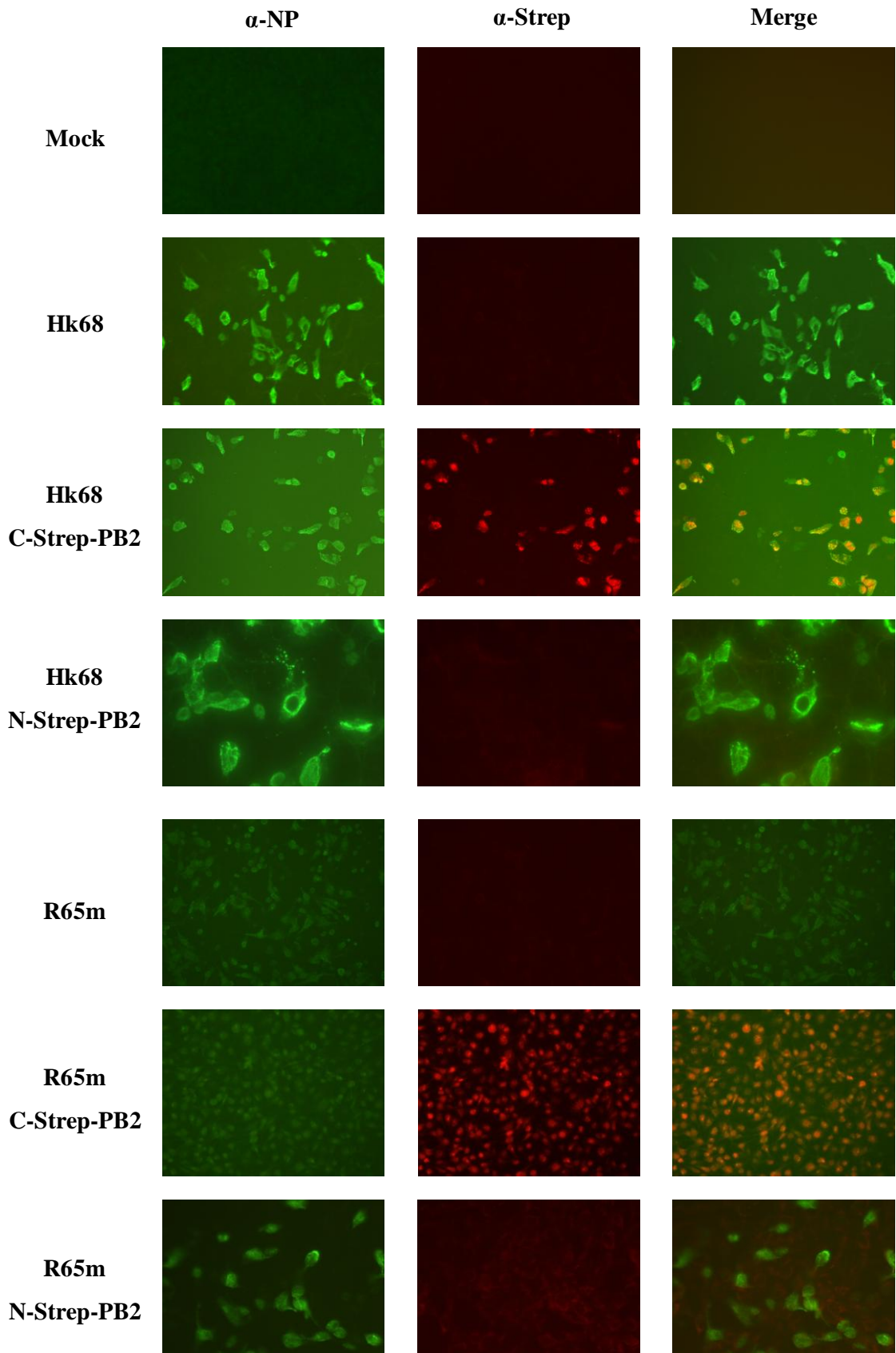
Es wurden C-terminal *Strep*-getaggte PB2-Plasmide der Viren R65m, Hk68, A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) (dUk) und Seal80 erzeugt. Die rekombinanten Viren R65m-C-*Strep*-PB2, Hk68-C-*Strep*-PB2, dUk-C-*Strep*-PB2 und Seal80-C-*Strep*-PB2 wurden im jeweils homologen 8-Plasmid-Rescue hergestellt (Abschnitt 3.2.4). Die rekombinanten Viren wurden zum Erhalt einer größeren Virusmenge auf MDCKII-Zellen bzw. im Ei vermehrt (Abschnitt 3.2.9) und charakterisiert (Abschnitt 4.3). Das Vorhandensein des *Strep*-tag sowie der Duplikation in dem PB2-Segment der rekombinanten Viren wurde durch Sequenzierung (Abschnitt 3.1.2.8) bestätigt.

4.3 In-vitro Charakterisierung der *Strep*-getagkten Viren

4.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Expression des *Strep*-getagkten PB2 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) (Abschnitt 3.3.10) nachgewiesen. Um sicherzustellen, dass der verwendete α -*Strep*II-Antikörper nicht unspezifisch an andere virale oder zelluläre Proteine bindet, wurden Zellen mit dem jeweiligen ungetagkten revers-genetischen (rg) Virus bzw. nicht (mock) infiziert. Repräsentative Abbildungen der durchgeführten IF-Versuche von mit getagkten bzw. ungetagkten Viren infizierten MDCKII-Zellen sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Zur Markierung der infizierten Zellen wurden diese zusätzlich zum α -*Strep*II-Antikörper (rote Fluoreszenz) mit einem α -NP-Antikörper (HB65) behandelt (grüne Fluoreszenz).

ERGEBNISSE



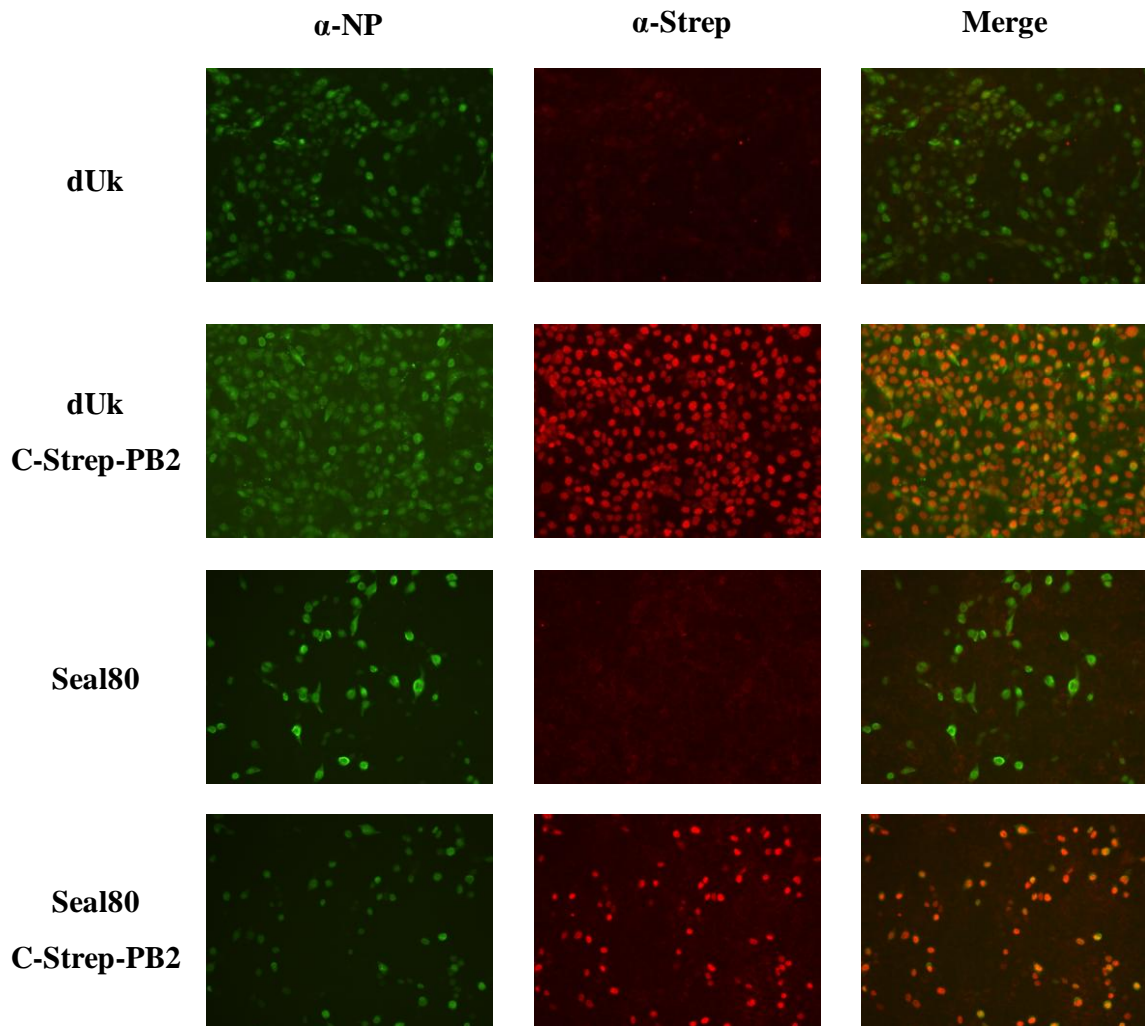


Abbildung 4.3: Immunfluoreszenz von Influenza-A infizierten MDCKII-Zellen. Diese wurden mit einer MOI von 0,1 für 24 h mit den verschiedenen *Strep*-getaggtten Viren und dem jeweiligen ungetaggtten revers-genetischen Virus infiziert. Der Nachweis des *Strep*-tags erfolgte mit dem α -StrepII-Antikörper (Kaninchen) und dem α -Kaninchen Alexa Fluor[®] 594-Antikörper (rot). Das NP wurde mit dem HB65-Antikörper (Maus) und dem α -Maus Alexa Fluor[®] 488 (grün) nachgewiesen (Abschnitt 2.9).

In den mit den C-terminal getaggtten Viren infizierten Zellen konnten sowohl grün fluoreszierende als auch rot fluoreszierende Signale detektiert werden. Beim Übereinanderlegen der beiden Bilder (Merge) war eine 100%ige Überlappung erkennbar. Jede mit der C-Strep-Mutante infizierte Zelle exprimiert demnach das *Strep*-getaggtte PB2-Protein.

Im Vergleich dazu zeigten die mit den ungetaggtten Viren infizierten Zellen lediglich positive Signale mit dem α -NP-Antikörper, aber nicht mit dem α -Strep-Antikörper. Die

nicht-infizierten Zellen wiesen abgesehen von einem schwachen Hintergrund keine Fluoreszenz-Signale auf.

Überraschenderweise konnte bei den Zellen, die mit der Hk68-N-Strep-PB2-Mutante oder der R65m-N-Strep-PB2-Mutante infiziert wurden, kein *Strep*-Signal detektiert werden, obwohl das Vorhandensein der *Strep*-tag-Sequenz im PB2-Segment bei der Genotypisierung des Rescue-Überstandes und auch der Nachkommen-Viren nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von den Viren dUk und Seal80 keine N-Strep-Mutanten hergestellt.

Weiterhin stimmte die Lokalisierung der Fluoreszenz-Signale mit dem Ort der Expression der NP- und PB2-Proteine während einer Influenza-Infektion überein. Dabei befindet sich der Großteil des Nucleoproteins 6 h p. i. im Zytoplasma (Rameix-Welti *et al.*, 2009) – gebunden an neu-synthetisierte, aus dem Kern exportierte vRNP-Komplexe. Der Hauptanteil des PB2 ist hingegen im Zellkern lokalisiert, wo es im Komplex mit PA und PB1 die Transkription und Replikation der viralen RNA katalysiert.

4.3.2 Wachstumskinetiken

Um sicherzustellen, dass die C-terminal getaggten Viren aufgrund der Insertion des *Strep*-tag im PB2 keine oder nur geringfügige Wachstumsnachteile den entsprechenden ungetaggten Viren gegenüber aufweisen, wurden Wachstumskinetiken (Abschnitt 3.2.8) auf A549- und DF1-Zellen durchgeführt. Die Abbildungen 4.4 und 4.5 geben die Wachstumskinetiken der vier untersuchten Viren und ihrer C-Strep-Mutanten wieder.

Die Replikation von R65m und R65m-C-Strep-PB2 war auf beiden Zelllinien nahezu identisch. Beide Viren erreichten auf den DF1-Zellen nach 24 h und auf den A549-Zellen nach 48 h ein Maximum von 10^7 bzw. von annähernd 10^7 pfu/ml. Die C-terminale Insertion des *Strep*-tag in das PB2 hatte in diesem Fall keinen negativen Einfluss auf die Virusvermehrung.

Das Wachstumsverhalten des aviären Stammes dUk und dessen C-Strep-Mutante wich hingegen ab einem Zeitpunkt von 24 h voneinander ab. Der revers-genetische Wildtyp replizierte auf beiden Zelllinien etwas besser als die Mutante und erreichte einen Endtiter von jeweils 5×10^6 pfu/ml. Dieser lag verglichen mit der Mutante in etwa um eine log-Stufe höher. Der maximale Titer des dUk-Virus auf den DF1-Zellen glich dem Endtiter auf den A549-Zellen. Das Vogel-Virus wuchs auf den Vogelzellen allerdings bedeutend schneller als auf den Säugerzellen. Dasselbe traf für die C-Strep-Mutante zu.

ERGEBNISSE

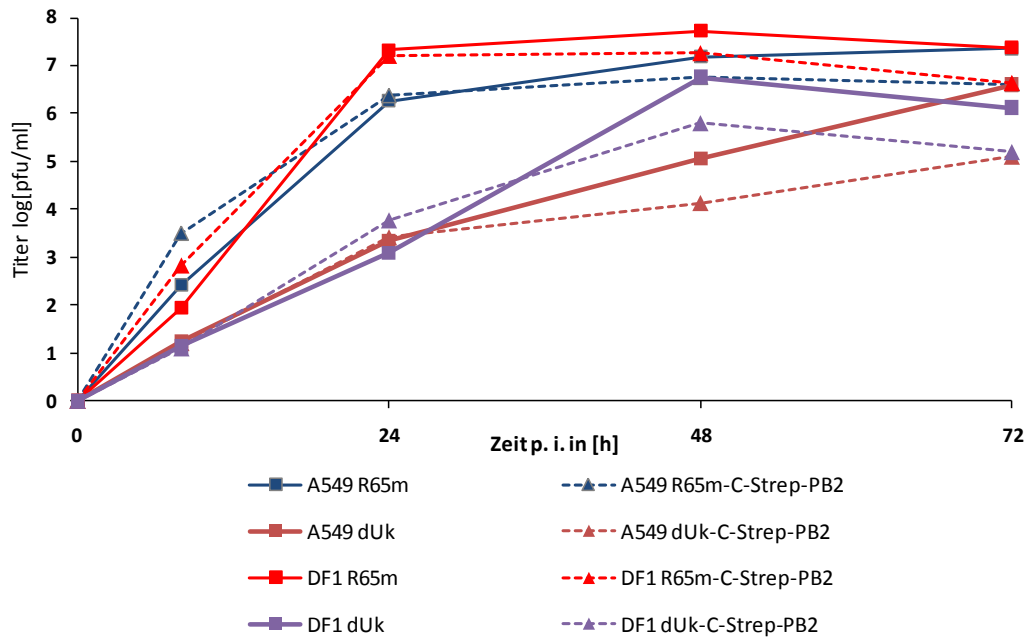


Abbildung 4.4: Wachstumskurven der rekombinanten Viren R65m und dUk sowie ihrer C-Strep-PB2-Mutanten auf A549-Zellen und DF1-Zellen. In dem Diagramm ist der dekadische Logarithmus der Virustiter gegen die Zeit aufgetragen.

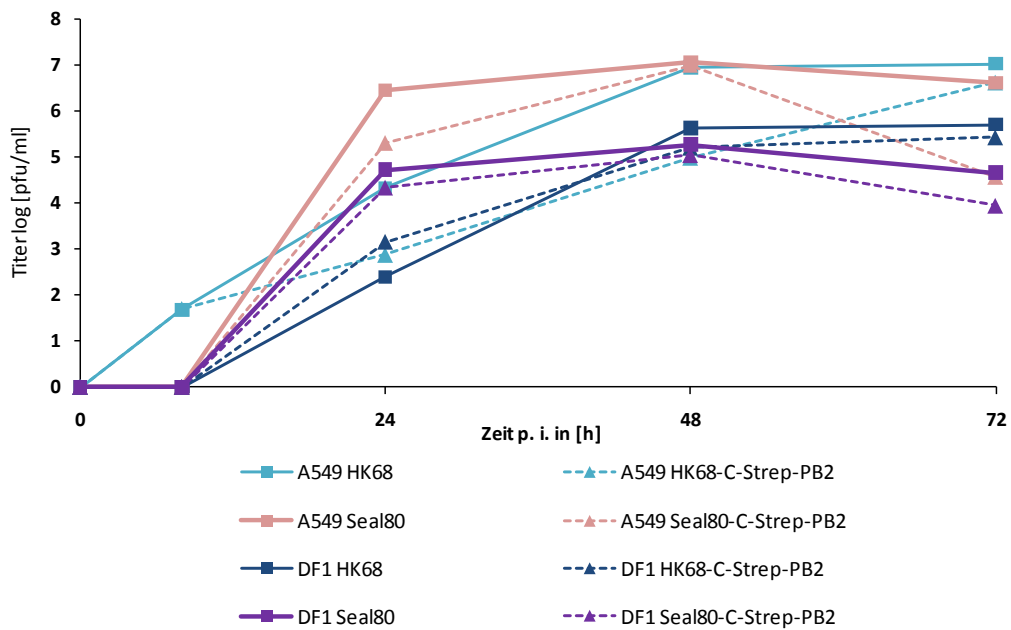


Abbildung 4.5: Wachstumskurven der revers-genetischen Viren Hk68 und Seal80 sowie ihrer C-Strep-PB2-Mutanten auf A549-Zellen und DF1-Zellen. In dem Diagramm ist der dekadische Logarithmus der Proben-titer gegen die Zeit aufgetragen.

Die beiden Säuger-Viren Hk68 und Seal80 replizierten auf den Säugerzellen um 1 bis 2 log-Stufen besser als auf den Vogelzellen (Abbildung 4.5). Dabei wurden zwischen dem Seal80-Virus und seiner C-Strep-Mutante nur geringfügige Abweichungen ermittelt. Auf den A549-Zellen schien die Mutante leicht verzögert zu wachsen, erreichte aber wie der revers-genetische Wildtyp nach 48 h den höchsten Titer. Auf den DF1-Zellen lagen die Wachstumskurven beider Viren dagegen nahezu übereinander. Dies galt auch für das Hk68-Virus und die Hk68-C-Strep-PB2-Mutante. Auf den A549-Zellen zeigten sich jedoch zwischen beiden Viren deutlich größere Unterschiede. Die Mutante wuchs ab einem Zeitpunkt von 8 h wesentlich langsamer als das ungetaggte Virus. Zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Infektion (p. i.) wichen die Titer um 2 bis 3 log-Stufen voneinander ab. Nach 72 h erreichte die Mutante jedoch letztendlich denselben Endtiter wie der revers-genetische Wildtyp.

Insgesamt führte das Einfügen eines *Strep*-tag in den C-Terminus des PB2-Proteins in Abhängigkeit von Virus und Wirtszelle zu einer Wachstumsverzögerung oder auch zu einer Erniedrigung des Virustiters (dUk-C-Strep-PB2). Die Wachstumsverzögerungen traten jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt als 8 h p. i. auf und dürften, da in den Aufreinigungs-Experimenten (Abschnitt 4.4) eine Inkubationszeit von 6 h verwendet wurde, keine erhebliche Rolle spielen.

4.3.3 Western-Blot

Die Expression des *Strep*-getaggtten PB2-Proteins wurde zusätzlich im Western-Blot (Abschnitt 3.3.7) untersucht. Dabei sollten auch die für die Proteinaufreinigung verwendeten Parameter wie eine MOI von 5 und eine Infektionsdauer von 6 h ausgetestet werden. A549- und DF1-Zellen wurden entsprechend auf 3 cm² Zellkulturschalen mit den ungetaggtten (-) und getaggtten (+) Viren infiziert (Abschnitt 3.2.2). 6 h später wurden von den infizierten Zellen Zelllysate hergestellt (Abschnitt 3.3.1). Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (mock).

Jeder in Abbildung 4.6 gezeigte Bildausschnitt beruht auf einem einzigen Western-Blot. Dieser wurde geteilt und separat das virale NP mit einem α -NP-Antikörper aus Kaninchen (1:5000) und das *Strep*-getaggte PB2 mit dem α -StrepII-Antikörper (1:2500; Abschnitt 2.9) nachgewiesen. Der mit dem α -StrepII-Antikörper behandelte Blot wurde anschließend gestrippt und mit einem spezifischen α -PB2-Antikörper (α -PB2#20C; 1:50; Abschnitt 2.9) behandelt.

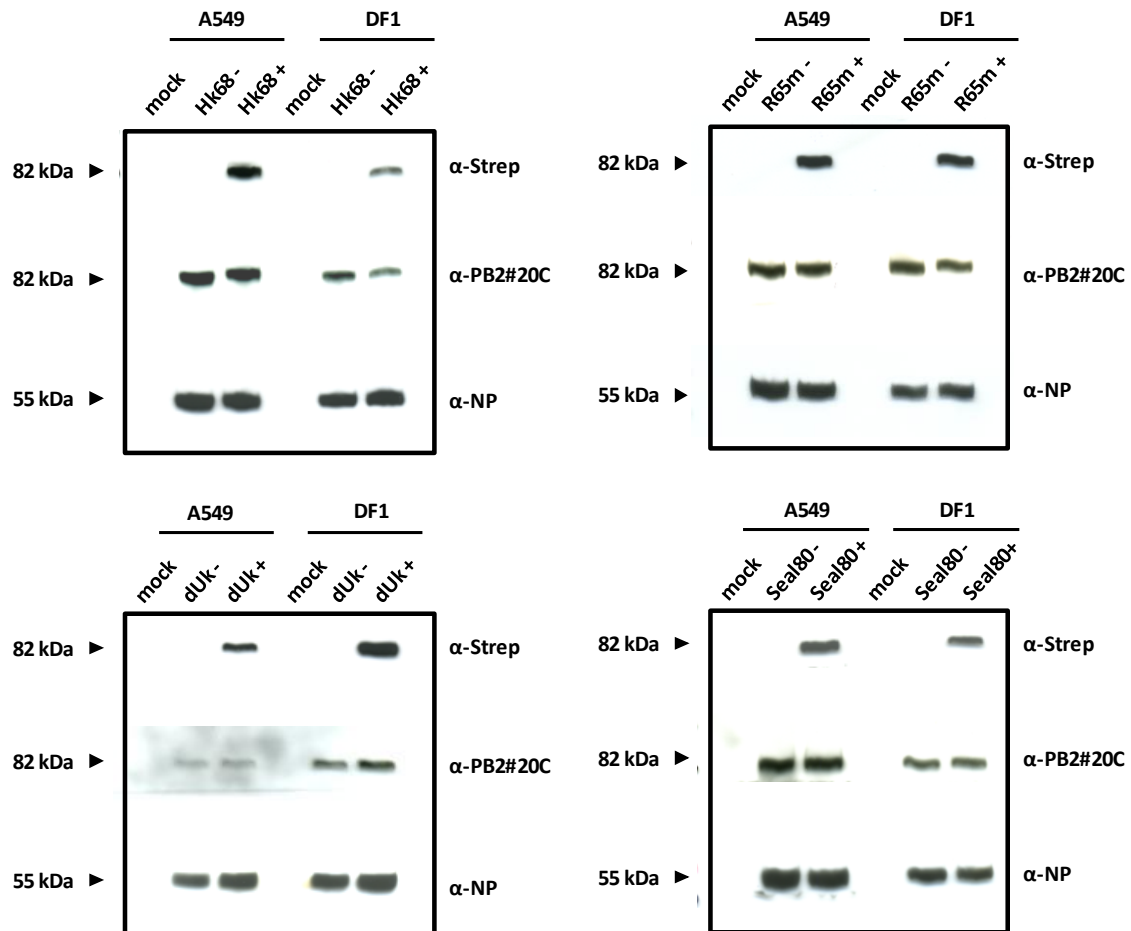


Abbildung 4.6: Darstellung von *Strep*-getaggtm und ungetaggtm PB2 im Western-Blot. A549- und DF1-Zellen wurden mit den C-terminal *Strep*-getaggtm Viren (+) und den entsprechenden ungetaggtm Viren (-) mit einer MOI von 5 infiziert und 6 h inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (mock). Je Ansatz wurden 4% Zelllysat auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der *Strep*-tag-Nachweis erfolgte mit dem α -StrepII-Antikörper (Kaninchen), der PB2-Nachweis mit dem α -PB2#20C-Antikörper (Maus), der NP-Nachweis mit dem α -NP-Antikörper (Kaninchen; Abschnitt 2.9).

6 h nach Infektion wurden von beiden Zelltypen deutlich detektierbare Mengen virales Protein gebildet und somit eine wichtige Voraussetzung für die Aufreinigung viraler RNP-Komplexe erfüllt.

Das PB2-Protein der getaggtm Viren konnte jeweils durch den PB2-spezifischen Antikörper sowie den α -StrepII-Antikörper detektiert werden. Bei den ungetaggtm Viren konnte dagegen nur mit Hilfe des α -PB2-Antikörpers ein positives Signal auf Höhe des PB2-Molekulargewichts von 82 kDa erzielt werden. Der NP-Nachweis zeigte außerdem, dass in etwa gleiche Protein-Mengen auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden.

Vergleicht man die PB2-Banden getaggtter und ungetaggtter Viren miteinander, so erkennt man einen leichten Shift des *Strep*-getaggtten PB2 nach „oben“. Der Shift sollte dem Molekulargewicht des *Strep*-tag entsprechend 1,06 kDa betragen (Terpe *et al.*, 2007).

4.4 Aufreinigung von viralen Ribonukleoprotein-Komplexen

Die Extraktion von viralen Ribonukleoprotein-Komplexen (vRNP) aus infizierten Zellen wurde exemplarisch anhand der R65m-C-*Strep*-PB2-Mutante ausgetestet. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer MOI von 5 (Abschnitt 3.2.2). So wurde sichergestellt, dass möglichst jede Zelle infiziert und eine maximale Ausbeute an vRNP-Komplexen erzielt werden konnte. 6 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert (Abschnitt 3.3.2) und die viralen RNP-Komplexe durch Affinitätschromatographie über kommerzielle Streptactin-Chromatographiesäulen aufgereinigt (Abschnitt 3.3.3).

Die von der Streptactin-Säule eluierten Fraktionen wurden auf einem Silbergel analysiert (Abschnitt 3.3.8.1). Die proteinreichsten Fraktionen wurden vereinigt, mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt (Abschnitt 3.3.4) und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abschnitt 3.3.6). Das Gel wurde anschließend mit kolloidalem Coomassie G-250 gefärbt (Abschnitt 3.3.8.2) und zur massenspektrometrischen Untersuchung durch MALDI-tof (Abschnitt 3.3.9) in das Labor für Biochemie und Proteomics des FLI gegeben.

Abbildung 4.7 zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel mit den Proben einer Proteinaufreinigung aus 6×10^6 R65m-C-*Strep*-PB2 (R65m+) infizierten DF1-Zellen. Es wurden 50% der TCA-gefällten Elutions-Fraktionen und 10 μ l des ungefärbten Protein-Markers (Abschnitt 2.9) auf das 10%ige Gel aufgetragen. Die im MALDI-tof-Verfahren detektierten Proteine wurden entsprechend in der Abbildung gekennzeichnet. Als Kontrolle wurden mit dem ungetaggtten R65m-Virus (R65m-) infizierte Zellen verwendet. Diese wurden analog zum getaggtten Virus behandelt. Zudem wurden bei diesem Experiment Proben der Zellextrakte vor der Aufreinigung (ZE; 0,15%), des Säulen-Durchflusses (DF; 0,15%) und der eluierten Fraktionen nach der TCA-Fällung (20%) entnommen und das Vorhandensein des *Strep*-getaggtten PB2 sowie des NP im Western Blot überprüft.

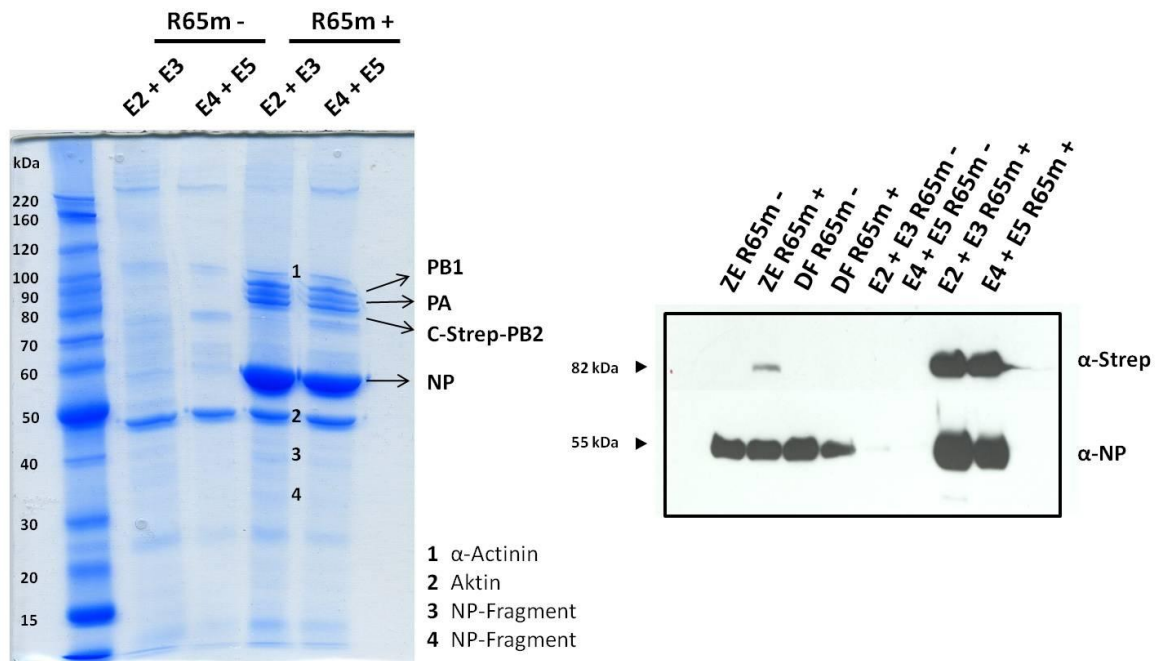


Abbildung 4.7: Aufreinigung von vRNP-Komplexen aus mit ungetaggttem (-) und getaggttem (+) R65m infizierten DF1-Zellen. Die nach der Aufreinigung vereinigten und mittels TCA-Fällung aufkonzentrierten Elutions-Fractionen wurden auf einem Coomassie-Gel (links) analysiert. Die gekennzeichneten Banden wurden durch MALDI-tof identifiziert. Ein Teil der Proben wurde zusammen mit Aliquots des Zellextraktes (ZE) vor der Säulenreinigung und des Säulendurchflusses (DF) im Western-Blot (rechts) untersucht. Die Detektion des Strep-getaggtten PB2-Proteins erfolgte mit dem α -StrepII-Antikörper (Kaninchen), die Detektion des NP mit dem α -NP-Antikörper (Kaninchen; Abschnitt 2.9).

Die Aufreinigung viraler Ribonukleoprotein-Komplexe aus infizierten DF1-Zellen konnte anhand des *Strep*-getaggtten PB2 erfolgreich durchgeführt werden.

Neben dem PB2 wurden die drei weiteren vRNP-Protein-Bestandteile identifiziert: die Polymerase-Proteine PB1 und PA sowie das Nukleoprotein (NP). Keines dieser Proteine wurde bei der Kontroll-Reinigung detektiert. Zusätzlich konnten Aktin und α -Actinin sowie verschieden große NP-Fragmente in den getaggtten Fraktionen nachgewiesen werden. Die beiden ersten Proteine kamen allerdings auch in der ungetaggtten Probe vor, was eine unspezifische Bindung an die Streptactin-Matrix nahe legt. Überdies wiesen die ungetaggtten Elutions-Fractionen in der hier gezeigten Aufreinigung einen hohen Hintergrund auf. Hierbei könnte ein Zusammenhang mit den milden Bedingungen der Aufreinigung bestehen, wie der physiologische pH des Waschpuffers (Abschnitt 2.14.3).

Der Hauptanteil der in der getaggtten Probe vorkommenden Proteine wurde durch das Nukleoprotein bestritten. Da je Molekül NP 24 Nt RNA gebunden werden, liegt das durchschnittliche Verhältnis von NP zu den einzelnen Polymeraseproteinen im viralen Ribonukleoprotein-Komplex bei 70:1. Das Verhältnis der Polymeraseproteine untereinander ist äquivalent. Dies spiegelte sich weitestgehend in den Aufreinigungen wieder, es wurden jedoch keine quantitativen Messungen durchgeführt.

Der abgebildete Western-Blot (Abbildung 4.7 rechts), anhand dessen das *Strep*-getaggte PB2 verfolgt werden konnte, bestätigte den Erfolg der vRNP-Reinigung. So wurde im Zellextrakt der mit dem R65m-C-Strep-PB2 infizierten DF1-Zellen das getaggte PB2 mit einem α -Strep-Antikörper nachgewiesen, der Säulendurchfluss war jedoch negativ. Nach der Elution und der Fällung der vereinigten Elutions-Fractionen wurde zudem eine starke Anreicherung des C-Strep-PB2 und auch des Nukleoproteins erzielt. Wiesen die Zellextrakte der ungetaggtten und getaggtten Probe vor der Säulenchromatographie noch ähnliche Mengen NP auf, so kam es nach der Aufreinigung zu einer deutlichen Abnahme der NP-Konzentration in der getaggtten Probe. Das NP wurde demnach im Komplex mit dem C-Strep-PB2 aufgereinigt. Eine unspezifische Bindung beider Proteine an die Streptactin-Säule konnte aufgrund der Elutions-Fractionen der ungetaggtten Probe, die im hoch-sensitiven Western-Blot weder ein positives Signal für das *Strep*-getaggte PB2, noch für NP zeigte, ausgeschlossen werden.

Im Verlauf der Aufreinigungs-Experimente wurden des Weiteren verschiedene Parameter wie z. B. der Ersatz von Triton-X-100 durch Igepal bzw. NP-40 als Detergenz im Lysispuffer oder das Hinzufügen von Igepal in den Waschpuffer ausgetestet.

Abbildung 4.8 zeigt die Aufreinigung von vRNP-Komplexen aus 8×10^6 mit dem R65m-Virus (R65m -) oder der R65m-C-Strep-PB2-Mutante (R65m +) infizierten A549-Zellen. Es wurde das analytische Silbergel dargestellt (Abbildung 4.8, links), anhand dessen der Proteingehalt der Elutions-Fractionen beurteilt wurde. In dem daneben abgebildeten analytischen Coomassie-Gel (Abbildung 4.8, rechts) wurden die durch MALDI-tof im präparativen Coomassie-Gel (Abschnitt 3.3.6) identifizierten Proteinbanden markiert. Dabei konnten die drei viralen Polymeraseproteine sowie das NP detektiert werden.

Beim Vergleich der präparativen Coomassie-Gele fiel auf, dass der Hintergrund in der von A549-Zellen stammenden ungetaggtten Probe niedriger war als bei den DF1-Zellen. Dies hing möglicherweise mit der Zugabe von 0,5% Igepal in den Waschpuffer bei der vRNP-

Extraktion aus A549-Zellen zusammen, welche wiederum eine Reduktion unspezifischer Bindungen an die Säulenmatrix zur Folge gehabt haben könnte. Da abgesehen von den Virusproteinen keine zellulären Proteine aufgereinigt wurden, könnte dies auf Kosten potentieller vRNP-Interaktionspartner gegangen sein.

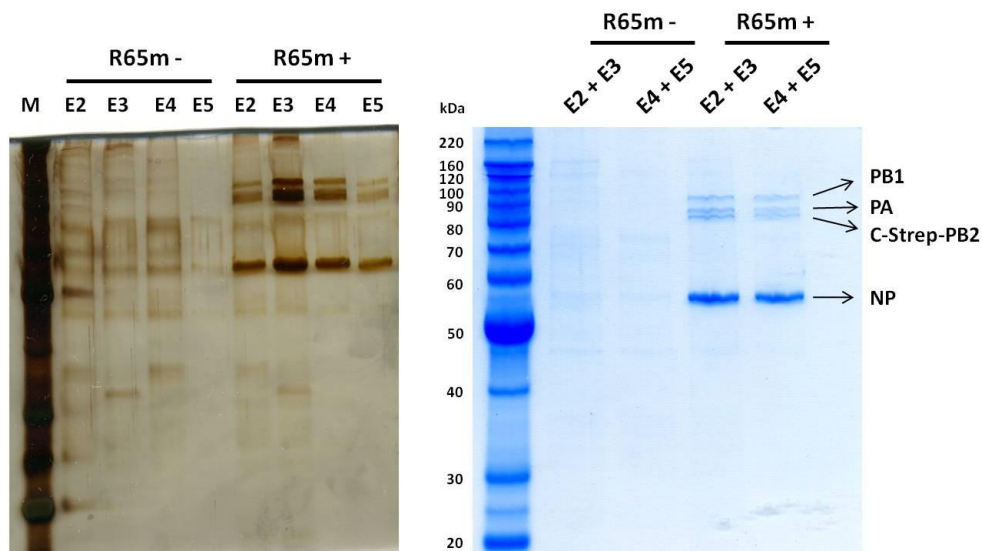


Abbildung 4.8: Aufreinigung von vRNP-Komplexen aus mit ungetaggttem (-) und getaggttem (+) R65m infizierten A549-Zellen. Die eluierten Fraktionen E2-E5 der beiden Säulenreinigungen wurden auf einem Silbergel (links) untersucht und nach der TCA-Fällung auf einem Coomassie-Gel (rechts) analysiert. Die im MALDI-tof identifizierten Proteine sind gekennzeichnet.

4.5 Einfluss von Punktmutationen im PB1 auf die Polymerase-Aktivität

Das pandemische Virus von 1968 A/HongKong/1/68 (H3N2) entstand durch ein Reassortment zwischen einem humanen H2N2-Stamm und einem aviären H3-Stamm. Dabei wurden das HA und das PB1 des humanen Virus gegen die entsprechenden Segmente des Vogelvirus ausgetauscht. Als aviäres Donorvirus könnte das A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) gedient haben (Fang *et al.*, 1981). Beim Vergleich der in öffentlichen Datenbanken erhältlichen Sequenzen, wurde festgestellt, dass die Nukleotid-Sequenzen der PB1-Segmente von Hk68 und dUk zu 94% übereinstimmen, d. h. 2209 von 2341 Nt sind identisch. Sechs der Punktmutationen führen dabei zu einem Aminosäure-Austausch (Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz von 99,2%). Um zu untersuchen, ob eine dieser Mutationen einen replikationsfördernden bzw. adaptiven Einfluss in Säugerzellen besitzt, wurde anhand von PB1-Punktmutanten und einem Polymerase-Reportertest die Polymerase-Aktivität *in vitro* rekonstituierter RNP-Komplexe bestimmt.

4.5.1 Herstellung der PB1-Mutanten

Tabelle 4.4 gibt die Lokalisierung der sechs Aminosäure-Austausche und die Bezeichnung der generierten PB1-Mutanten wieder. Die Mutagenese erfolgte dabei ausgehend von dem dUk-PB1-Plasmid oder dem Hk68-PB1-Plasmid wie im Abschnitt 3.1.2.10 beschrieben. Das Einfügen der Mutationen wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 4.4: Aminosäure-Unterschiede zwischen den PB1-Proteinen des pandemischen Hk68-Virus und seines aviären Donors. Zudem sind die generierten Plasmid-Mutanten aufgeführt.

Position	dUk	Hk68	dUk-PB1	Hk68-PB1
12	Isoleucin (I)	Valin (V)	dUk-PB1-I12V	Hk68-PB1-V12I
121	Lysin (K)	Arginin (R)	dUk-PB1-K121R	-
212	Leucin (L)	Valin (V)	dUk-PB1-L212V	-
327	Arginin	Lysin	dUk-PB1-R327K	-
386	Lysin	Arginin	dUk-PB1-K386R	-
667	Valin	Isoleucin	dUk-PB1-V667I	-

4.5.2 Polymerase-Reporter-Assay

Die Bestimmung der Polymerase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines dualen Luciferase-Tests (Abschnitt 3.3.11). Dabei wurden in jeder Probe die Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase gemessen. Letztere wurde konstitutiv von den transfizierten HEK293T-Zellen exprimiert und diente somit als Normalisierungskontrolle. Der Quotient aus der variablen *Firefly*-Aktivität und der Aktivität der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase diente als Grundlage für die Berechnung der Polymerase-Aktivität der einzelnen Proben. Der für die Polymerase des Hk68-Virus ermittelte Quotient wurde 100% gleichgesetzt. Anhand dessen konnte die prozentuale Bestimmung der Luciferase-Aktivität aller anderen Proben erfolgen. Da die Expression der *Firefly*-Luciferase direkt von der Funktionalität und Effizienz der kotransfizierten viralen Polymeraseproteine und des NP abhängig ist (Abschnitt 3.3.11), kann sie als ein Maß für die Polymerase-Aktivität angesehen werden.

Im dualen Luciferase-Test wurden die Luciferase-Aktivitäten solcher Hk68-Polymerase-Komplexe bestimmt, bei denen das PB1 entweder mutiert oder durch das PB1 des aviären dUk-Virus bzw. den daraus abgeleiteten PB1-Punktmutanten (Tabelle 4.4) ersetzt wurde. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Jede Messung wurde in Triplikaten in 3-4 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Bei jedem Versuch wurde die Hk68-Polymerase als Bezugsfaktor mitgeführt. Außerdem wurde die Aktivität des

homologen Polymerasekomplexes von dUk im Verhältnis zu der des Hk68-Virus ermittelt. Wie man Abbildung 4.9 entnehmen kann, war sie 50-fach niedriger als die Aktivität der Hk68-Polymerase.

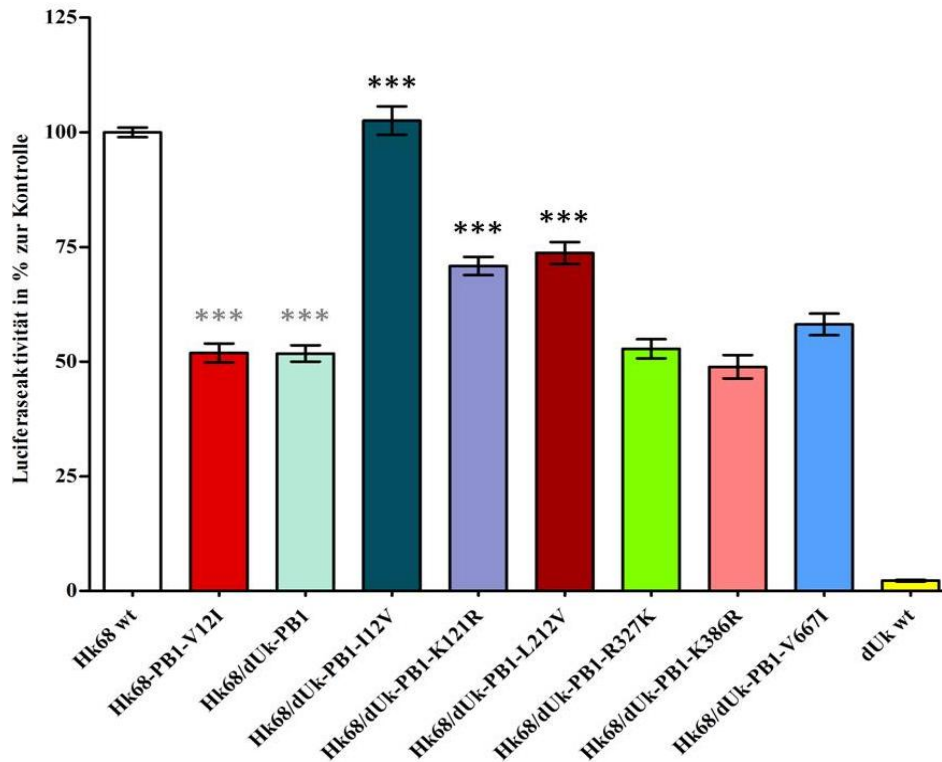


Abbildung 4.9: Bestimmung der Polymerase-Aktivität homologer und heterologer Hk68-Polymerase-Komplexe mit bzw. ohne Insertion verschiedener Punktmutationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Messungen in Prozent der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen den aus den jeweiligen Messwerten berechneten Standardabweichungen. Die Sternchen geben die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Hk68-Kontrolle (***) bzw. zur Hk68/dUk-PB1-Probe (***) an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *One-Way-Anova*-Test: $P < 0,001 = ***$.

Der Austausch des Hk68-PB1 gegen das dUk-PB1 führte zu einer Erniedrigung der Polymerase-Aktivität um ca. 50%, die mit $P < 0,001$ im *One-Way-Anova*-Test als hochsignifikant eingestuft wurde. Die Mutation von Isoleucin zu Valin an Position 12 des dUk-PB1 genügte allerdings bereits, um die mit dem Hk68-PB1 erzielte Polymerase-Aktivität wiederherzustellen. Gleichzeitig hatte die Rückmutation von Valin zu Isoleucin im PB1 des Hk68-Virus eine 50%ige Erniedrigung der Hk68-Polymerase-Aktivität zur Folge. Eine leichte, aber dennoch hoch-signifikante Erhöhung der Polymerase-Aktivität um 25 bzw. 30 Prozentpunkte im Vergleich zum Hk68/dUk-PB1-Ansatz konnte durch das Einfügen der Aminosäure-Austausche PB1-K121R und PB1-L212V im dUk-PB1 erzielt

werden. Die drei Mutationen PB1-R327K, PB1-K386R sowie PB1-V667I hatten keinen Einfluss auf die Polymerase-Aktivität des heterologen Hk68/dUk-PB1-Komplexes.

Insgesamt könnte die Substitution von Isoleucin durch Valin an Aminosäure-Position 12 (PB1-I12V) im aviären PB1 eine entscheidende Rolle bei der Adaptation des pandemischen Hk68-Virus an den humanen Wirt gespielt haben. Um nachzuprüfen, ob sich der beobachtete Effekt der PB1-I12V- bzw. PB1-V12I-Mutation nur auf das dUk- und Hk68-Virus beschränkt, wurde die Aktivität rekombinanter Polymerase-Komplexe von zwei weiteren Viren näher untersucht. Zum einen stand das revers-genetische System des pandemischen Virus A/Regensburg/D6/2009 (H1N1) (Dr. O. Stech, FLI, Riems) zur Verfügung. Es besitzt als einziges der vier pandemischen Viren Isoleucin anstatt Valin an PB1-Position 12. Zum anderen wurde eine PB1-Mutante des R65-Virus generiert, das natürlicherweise ein Valin an PB1-Position 12 aufweist. Abbildung 4.10 stellt das Ergebnis der Luciferase-Tests dar.

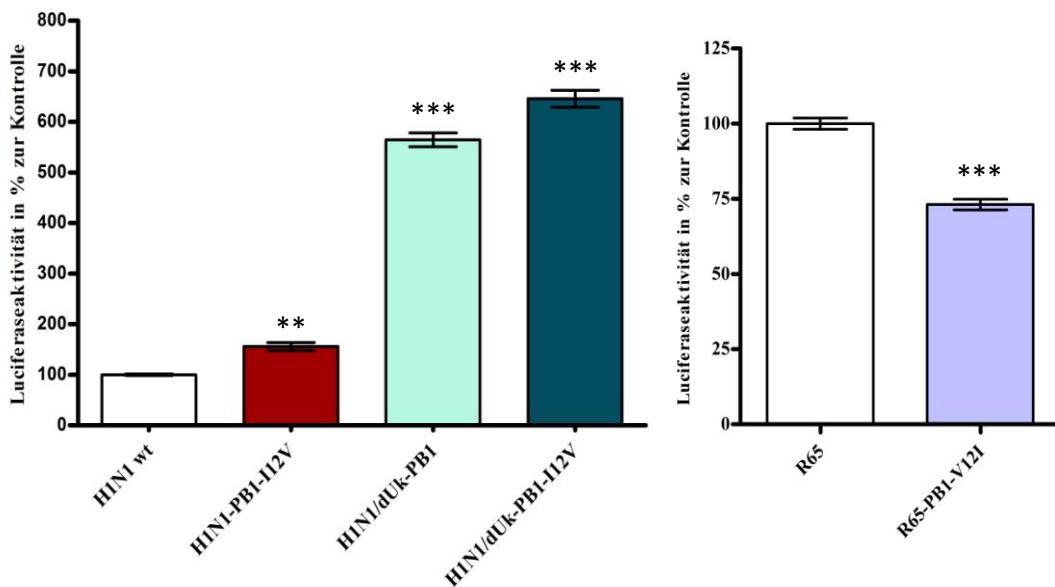


Abbildung 4.10: Bestimmung der Aktivität homologer und heterologer H1N1-Polymerase-Komplexe mit Valin oder Isoleucin an PB1-Position 12 (links). Bestimmung der Aktivität des homologen R65-Polymerase-Komplexes sowie der PB1-V12I-Mutation (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der Luciferase-Messungen in Prozent der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen den aus den Messwerten berechneten Standardabweichungen. Die Sternchen geben die Signifikanz der Werte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle an. Die statistische Auswertung erfolgte für H1N1 anhand des *One-Way-Anova*-Tests und für R65 anhand des t-Tests: $P < 0,01 = **$, $P < 0,001 = ***$.

Der Austausch von Isoleucin gegen Valin im PB1 des pandemischen H1N1-Virus führte zu einer mit $P < 0,01$ signifikanten Steigerung der Polymerase-Aktivität um ~50%. Dies ist vergleichbar mit den vorherigen Ergebnissen zu dUk und Hk68. Der Austausch des H1N1-PB1 gegen das PB1 des dUk-Virus hatte erstaunlicherweise eine Erhöhung der Polymerase-Aktivität auf 564% zur Folge, die durch das zusätzliche Einfügen der Mutation PB1-I12V in das dUk-PB1 um weitere 80 Prozentpunkte verbessert werden konnte. Die Substitution von Valin durch Isoleucin im PB1 des R65-Virus erniedrigte die Polymerase-Aktivität signifikant um 25%. Dieser Effekt war zwar nur halb so groß wie aufgrund der zuvor ermittelten Daten erwartet, es ist jedoch eine deutlich erkennbare Tendenz zu verzeichnen.

4.5.3 Herstellung der PB1-Virusmutanten und Wachstumskurven

Um nachzuvollziehen, ob der im Luciferase-Test beobachtete Effekt der PB1-I12V- bzw. PB1-V12I-Mutation im Gesamt-Virus-Hintergrund reproduzierbar ist, wurden mittels reverser Genetik (Abschnitt 3.2.4) PB1-Virusmutanten sowie Virusreassortanten generiert und deren Wachstumsverhalten auf A549-Zellen analysiert (Abbildung 4.11).

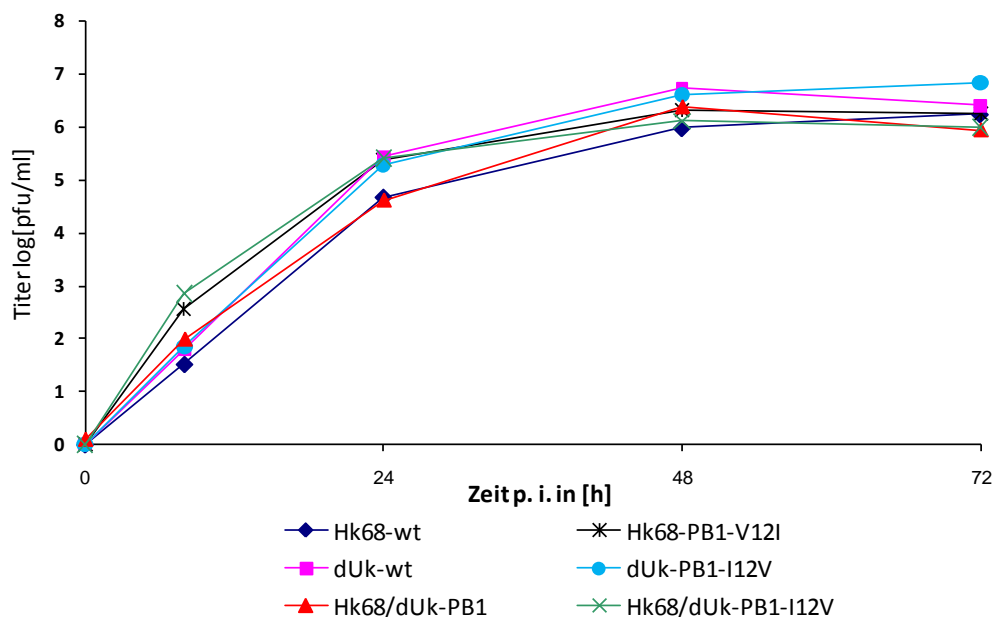


Abbildung 4.11: Wachstumskurven der beiden homologen Viren Hk68 und dUk sowie von ihnen abgeleiteter PB1-Mutanten und PB1-Reassortanten auf A549-Zellen. In dem Diagramm ist der dekadische Logarithmus der Proben-titer gegen die Zeit aufgetragen.

Das dUk-Virus replizierte auf den A549-Zellen geringfügig besser als das Hk68-Virus. Der maximale Virustiter beider Viren unterschied sich in weniger als einer halben log-Stufe und wurde beim dUk-Virus nach 48 h und beim Hk68 nach 72 h erreicht. Der Austausch des humanen PB1 im Hk68-Virus gegen das PB1 des dUk-Virus (Hk68/dUk-PB1) hatte keinen Einfluss auf die Virusreplikation. Das Einfügen der PB1-I12V-Mutation in das dUk-PB1 führte bei der Hk68/dUk-PB1-I12V-Reassortante in einem frühen Infektionsstadium zu einer leichten Verbesserung des Viruswachstums. So konnte 8 h p. i. ein Virustiter bestimmt werden, der um 1,5 log-Stufen höher lag als beim Hk68- und Hk68/dUk-PB1-Virus. 48 h p. i. hatten sich die Virustiter jedoch wieder angeglichen.

Im dUk-Virus hatte die Insertion der PB1-I12V-Mutation keinerlei Auswirkung auf die Virusreplikation.

Das Einfügen der PB1-V12I-Mutation in das Hk68-PB1 (Hk68-PB1-V12I) hatte wider Erwarten eine leichte Verbesserung des Viruswachstums auf A549-Zellen zur Folge. Diese beschränkte sich ebenfalls nur auf die Zeitpunkte 8 h und 24 h p. i., wobei die Virustiter nicht mehr als eine log-Stufe voneinander abwichen.

4.5.4 Untersuchung der PA-Bindungsaffinität

Es sollte getestet werden, ob der Einfluss der PB1-I12V- bzw. PB1-V12I-Mutation auf die Polymeraseaktivität in Zusammenhang mit einer veränderten Affinität zum PA-Protein steht. Anhand biotinylierter N-terminaler PB1-Peptide und aus HEK293T-Zellen aufgereinigter PA-HA-tag-Proteine wurde eine Affinitätsmessung durchgeführt. Dazu wurden die PA-Segmente der drei Viren Hk68, dUk und des pandemischen H1N1-Virus in einen Expressionsvektor kloniert und C-terminal mit einem HA-tag fusioniert (Abschnitt 3.1.2.14). Die Expressionslevel der HA-getagten PA-Proteine in HEK293T-Zellen wurden mittels Western-Blot und einem α -HA-Antikörper untersucht.

Die Affinitätsmessung zwischen den PB1-Peptiden und gereinigten PA-HA-tag-Proteinen wurde mit Hilfe eines ELISA (Abschnitt 3.3.12) durchgeführt. Die bei einer OD von 405 nm gemessene Hintergrundabsorption der *scrambled*-Kontrolle (Abschnitt 3.3.12) wurde bei jedem Experiment von den Messwerten der anderen Proben abgezogen. Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis der Affinitätsbestimmung. Dabei wurden die Mittelwerte der einzelnen Ansätze aus je drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

ERGEBNISSE

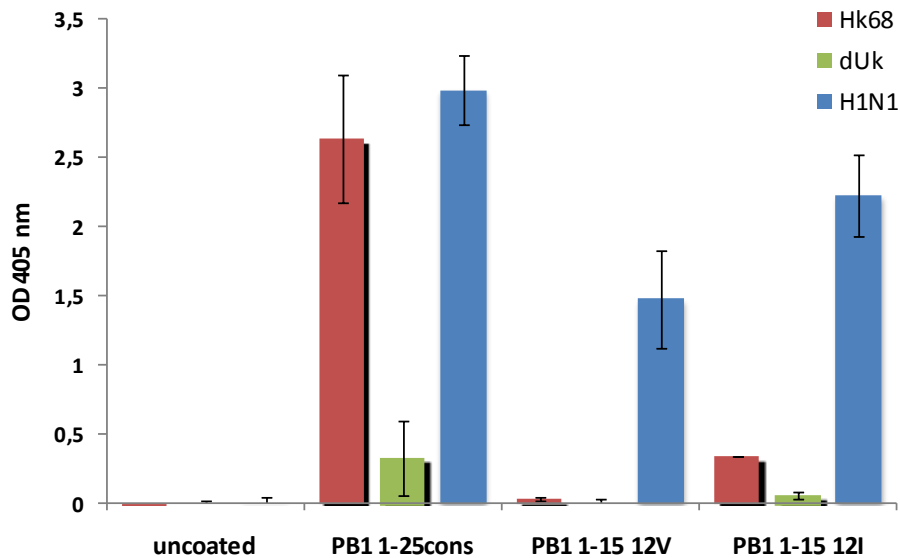


Abbildung 4.12: Affinitätsbestimmung verschiedener PB1-Peptide (PB1 1-25cons, PB1 1-15 12V, PB1 1-15 12I) zum PA der Viren Hk68, dUk und des pandemischen H1N1. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm. Die Mittelwerte der jeweiligen Ansätze setzen sich aus den einzelnen Messwerten abzüglich des unspezifischen Hintergrunds von drei verschiedenen Experimenten zusammen. Die Standardabweichungen, die aus den jeweiligen Messwerten berechnet wurde, sind anhand der Fehlerbalken dargestellt.

Die PA-Proteine des Hk68-Virus und des pandemischen H1N1-Virus zeigten eine ähnlich hohe Affinität zum PB1 1-25cons Peptid. Sie zeigten zudem eine tendenziell höhere Affinität zum Peptid PB1 1-15 mit Isoleucin an Position 12 anstelle von Valin. Dabei wies das PA des Hk68 eine sehr viele niedrigere Bindungsaffinität zu den PB1 1-15 Peptiden auf als das H1N1 Virus.

Im Gegensatz dazu schien das PA des dUk-Virus an keines der getesteten PB1-Peptide in detektierbaren Mengen zu binden. Dem Western-Blot zufolge (Daten nicht gezeigt) war die Expression des dUk-PA in humanen HEK293T-Zellen allerdings sehr gering, so dass wahrscheinlich nicht genügend PA-Protein für die Bindungsstudie eingesetzt wurde.

Die Daten der PA-Bindungsstudie sind zwar nicht in Einklang mit den Ergebnissen der Polymerase-Tests, legen aber einen Einfluss der Aminosäureposition 12 im PB1-Protein auf die PA-Interaktion und damit auf die Polymerase-Aktivität nahe.

4.6 Herstellung einer Elastase-abhängigen Spaltstellenmutante eines HPAIV H5N1

Die bevorzugte Erkennungssequenz für die Protease Elastase lautet entweder Alanin-Glycin oder Valin-Glycin (Castillo *et al.*, 1979; Mecham *et al.*, 1997). Dabei erfolgt die proteolytische Spaltung vor dem Glycin.

Zur Herstellung einer Elastase-abhängigen Mutante des HPAIV A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) (R65^c) wurde die polybasische Spaltstelle im HA des R65-Virus mittels QuickChange-Mutagenese durch eine Spaltstelle für Elastase ersetzt (Abschnitt 3.1.2.15). Die Spaltstellen-Umgebung des R65-HA wurde so verändert, dass sie der HA-Spaltstellen-Umgebung einer bereits existierenden Elastase-Mutante vom Subtyp H7N7, dem SC35M_H-E-Virus (Gabriel *et al.*, 2008a), entsprach. Das so generierte H5-Elastase-Plasmid erwies sich im homologen Rescue unter Zugabe von Elastase ins Medium (Abschnitt 3.2.5) als funktionell. Das Virus wurde als R65-E bezeichnet. Abbildung 4.13 zeigt die HA-Spaltstellen-Regionen des R65-Wildtyps, der monobasischen R65-Variante R65m, der R65-Elastase-Mutante (R65-E) und des SC35M_H-E-Virus.

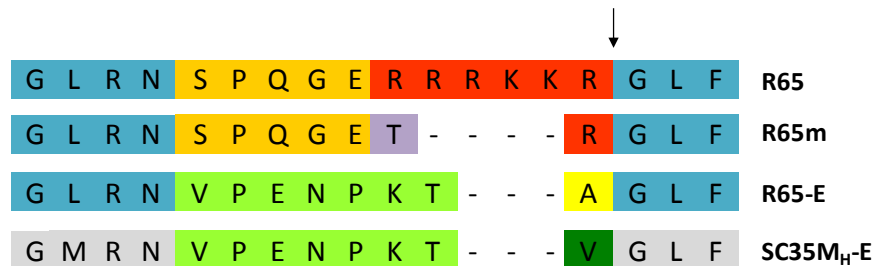


Abbildung 4.13: Aminosäure-Alignment der Spaltstellen-Umgebung im HA relevanter Viren. Die HA₀-Spaltung findet, gekennzeichnet durch den schwarzen Pfeil, zwischen dem Arginin (R) bzw. Alanin (A) oder Valin (V) und dem Glycin (G) statt.

Die R65-E-Mutante wurde einmal Plaque-gereinigt (Abschnitt 3.2.10) und genotypisiert (Abschnitt 3.1.2.16). Anschließend wurde das Replikationsverhalten von R65-E *in vitro* charakterisiert (Abschnitt 4.7). Hierfür wurden MDCK-H-Zellen verwendet, die im Gegensatz zu den MDCKII-Zellen keine detektierbare Proteaseaktivität mit monobasischer Spezifität aufweisen (Noma *et al.*, 1998). Zudem wurde die R65-E-Mutante aufgrund der unter Abschnitt 4.1.3 aufgeführten Argumente *in vitro* mit dem R65m-Virus anstelle des R65-Wildtyps verglichen.

4.7 Charakterisierung der R65-E-Mutante *in vitro*

4.7.1 Charakterisierung der Spaltstellenmutante durch Plaquetest

Um nachzuweisen, dass die R65-E-Mutante nur in Gegenwart von Elastase repliziert, wurden Plaquetests (Abschnitt 3.2.6.2) auf MDCK-H-Zellen ohne Zusatz einer Protease bzw. unter Zugabe von Trypsin oder Elastase in das Plaquetest-Medium durchgeführt. Abbildung 4.14 zeigt repräsentative Ausschnitte der einzelnen Plaquetests.

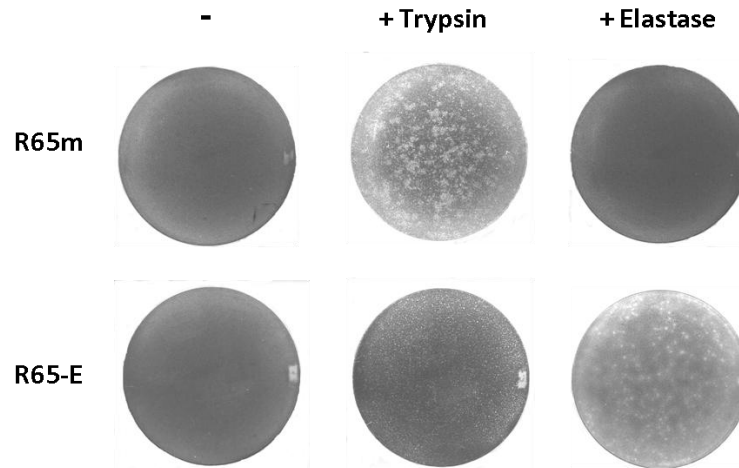


Abbildung 4.14: Plaquetests der Viren R65m und R65-E ohne Zusatz einer Protease (-), mit Trypsin oder mit Elastase auf MDCK-H-Zellen.

Anhand der Plaquetests konnte gezeigt werden, dass das R65m-Virus Plaques auf MDCK-H-Zellen nur in Gegenwart von Trypsin bildet, wohingegen die R65-E-Mutante Plaques nur in Gegenwart von Elastase erzeugt.

Die MDCK-H-Zellen erschienen zudem sensitiv gegenüber Trypsin. Sofern keine Viruspartikel vorhanden waren, deren Haemagglutinin-Moleküle von Trypsin proteolytisch gespalten werden konnten, griff das Trypsin die Zellen an. Dies wurde in dem Plaquetest des R65-E-Virus mit Trypsin deutlich.

4.7.2 *In vitro* Replikationsverhalten der Spaltstellenmutante

Es wurden Wachstumskinetiken (Abschnitt 3.2.8) der beiden Viren R65m und R65-E auf MDCK-H-Zellen ohne Zugabe einer Protease sowie unter Zugabe von Trypsin oder Elastase in das Infektionsmedium durchgeführt.

Die in Abbildung 4.15 dargestellten Wachstumskurven zeigen, dass sich das R65m-Virus nur in Gegenwart von Trypsin und das R65-E-Virus nur in Gegenwart von Elastase auf den

MDCK-H-Zellen vermehren konnte. Ohne Zusatz der jeweils geeigneten Protease in das Infektionsmedium fand lediglich ein Replikationszyklus statt, so dass der Virustiter nach 8 h stagnierte. Hierbei wurde von den infizierten Zellen nicht-aktiviertes Virus, d. h. Viruspartikel mit ungespaltenen Haemagglutinin-Molekülen, freigesetzt. Dieses wurde bei der Titration der Zeitwerte unter Zugabe der entsprechenden Protease detektiert.

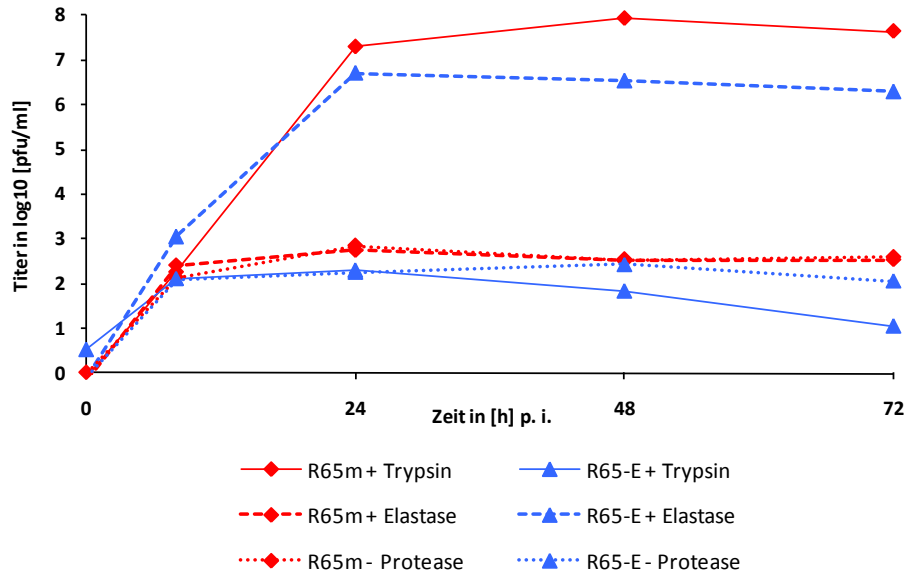


Abbildung 4.15: Wachstumskurven der Viren R65m und R65-E auf MDCK-H-Zellen in Gegenwart von Trypsin oder Elastase bzw. ohne Protease. In dem Diagramm ist der dekadische Logarithmus der Proben-titer gegen die Zeit aufgetragen.

In Gegenwart von Elastase war das Wachstum der R65-E-Mutante auf MDCK-H-Zellen im Vergleich zum Trypsin-abhängigen R65m-Virus nur geringfügig eingeschränkt. Die Maximaltiter beider Viren unterschieden sich mit 10^7 versus 10^8 pfu/ml in einer log-Stufe, die Replikationsgeschwindigkeit war nahezu gleich.

4.7.3 Nachweis der Spaltbarkeit des Haemagglutinin-Proteins im Western-Blot

Das Haemagglutinin-Vorläuferprotein HA₀ der Influenza-A-Viren wird durch Proteasen wie Trypsin oder Furin in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten (Abschnitt 1.3.4).

Die Spaltung des Haemagglutinins des R65m-Virus und der R65-E-Mutante wurden im Western-Blot untersucht (Abbildung 4.16). Dazu wurden 1×10^7 MDCK-H-Zellen mit R65m oder R65-E in Gegenwart von Trypsin oder Elastase bzw. ohne Protease mit einer MOI von 0,1 für 48 h infiziert. Die Virionen im Zellkultur-Überstand wurden durch

Ultrazentrifugation aufgereinigt (Abschnitt 3.2.11). Mit einem H5-spezifischen Antikörper wurde das HA-Spaltungsmuster der Virionen im Western-Blot (Abschnitt 3.3.7) sichtbar gemacht. Zum Mengenabgleich wurde zusätzlich das Nukleoprotein mit einem NP-spezifischen Antikörper detektiert.

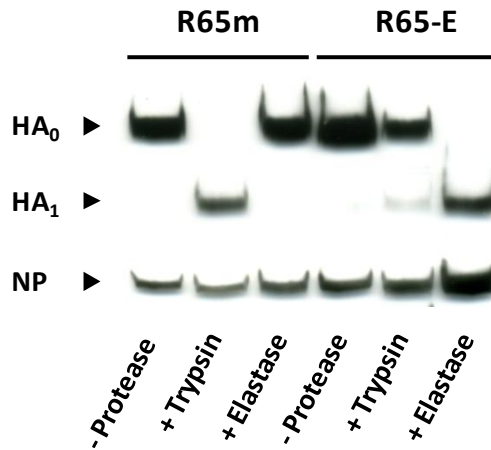


Abbildung 4.16: Western-Blot von aufgereinigten Virionen der Viren R65m oder R65-E. MDCK-H-Zellen wurden in Gegenwart von Trypsin oder Elastase bzw. ohne Protease generiert. Der HA-Nachweis erfolgte mit dem α -Vaccinia-H5-Antikörper, der NP-Nachweis mit dem α -NP-Antikörper aus Kaninchen (Abschnitt 2.9).

Ohne Zusatz einer Protease wurde weder das Haemagglutinin des R65m-Virus noch das der R65-E-Mutante gespalten. Die Zugabe von Elastase führte zu einer Spaltung des HA der R65-E-Mutante. Das HA des R65m-Virus wurde hingegen ausschließlich durch Trypsin proteolytisch aktiviert. Trypsin spaltete zudem in geringem Maße das HA der R65-E-Mutante, da hier eine schwache Bande auf Höhe der HA₁-Untereinheit erkennbar ist. In direkter Spaltstellenumgebung des R65-E HA befinden sich weitere basische Aminosäure-Reste, die als potentielle Spaltmotive für Trypsin fungieren können und vermutlich für die beobachtete HA-Spaltung der R65-E-Mutante verantwortlich waren. Eine Spaltung durch Trypsin an diesen potentiellen Motiven führt jedoch nicht zu einer proteolytischen Aktivierung des R65-E HA. Diese Annahme wird durch die Unfähigkeit der R65-E Rekombinante, in Anwesenheit von Trypsin auf MDCK-H-Zellen zu replizieren, unterstützt.

4.7.4 Bestimmung der Reversionswahrscheinlichkeit der Elastase-abhängigen Spaltstelle der R65-E-Mutante zu einer Trypsin-abhängigen Spaltstelle

Es sollte untersucht werden, mit welcher Frequenz die Elastase-abhängige HA-Spaltstelle der R65-E-Mutante *in vitro* in Gegenwart von Trypsin bei gleichzeitiger Abwesenheit von Elastase zu einer Trypsin-abhängigen Spaltstelle revertiert. Dazu wurde das Reversions-Experiment wie unter Abschnitt 3.2.12 beschrieben durchgeführt.

Zwei Tage nach der ersten Virus-Passage konnte bereits in einer Zellkulturflasche, die mit dem Überstand einer 10^8 pfu-Infektion infiziert wurde, CPE identifiziert werden. Nach der 3. Virus-Passage wurde eine zweite Revertante im Überstand einer weiteren 10^8 -Infektion detektiert. Der eindeutige Virusnachweis erfolgte durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) in Gegenwart von Trypsin. Die Revertanten wurden aus dem jeweiligen Virusgemisch der Zellkulturüberstände durch Plaque-Reinigung unter Zugabe von Trypsin aufgereinigt (Abschnitt 3.2.10) und die HA-Spaltstellen der beiden Viren sequenziert (Abschnitt 3.2.12). Die nach der ersten Virus-Passage erhaltene Revertante wurde als R65-E_R8.5-P1 bezeichnet und die nach der dritten Viruspassage erhaltene Revertante als R65-E_R8.6-P3. Die Spaltstellen-Umgebung der beiden Revertanten ist im Vergleich zu der des R65-Wildtyps, des R65m-Virus und der R65-E-Mutante in Abbildung 4.17 dargestellt. Ausgehend von den mit 10^6 oder 10^7 pfu infizierten Zellen wurden nach drei Passagen keine R65-E-Revertanten gebildet. Es wurde bei keinem der Ansätze und Passagen ein CPE oder Trypsin-abhängiges Virus mittels Plaquetest nachgewiesen.

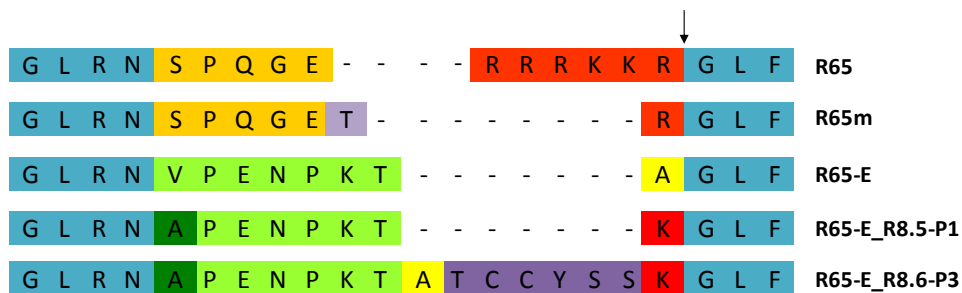


Abbildung 4.17: Alignment der Spaltstellen-Umgebung des R65-Wildtyps, der R65m und R65-E-Mutante sowie der beiden R65-E-Revertanten. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Ort der HA-Spaltung.

Die Revertante R65-E_R8.5-P1 wies als Resultat einer Substitutions-Mutation statt eines Alanins ein Lysin an der Spaltstelle auf. Dieses ermöglichte es dem Virus in Gegenwart von Trypsin zu replizieren. Zusätzlich kam es zu einer weiteren Mutation von Valin zu

Alanin sieben Aminosäure-Reste vor dem Lysin. Dieselbe Mutation fand sich ebenfalls in der Revertante R65-E_R8.6-P3. In das HA dieses Virus wurden zudem sieben Aminosäuren inklusive eines Lysin-Restes direkt vor dem N-terminalen Teil der HA2-Region (GLF) inseriert (Abbildung 4.17). Dies führte ebenfalls zu einer Spaltbarkeit der HA-Revertante durch Trypsin.

Zusammenfassend fand in zwei der zehn mit 10^8 pfu infizierten Ansätze eine Reversion an der HA-Spaltstelle der R65-E-Mutante statt. Die *in vitro* Reversionsfrequenz lag damit bis zur 3. Viruspassage bei 1 von 5×10^8 Viruspartikeln.

4.8 Charakterisierung der R65-E-Mutante *in vivo*

4.8.1 Attenuierung der R65-E-Mutante *in vivo*

Zur Untersuchung, ob die R65-E-Mutante im Vergleich zum parentalen hoch-pathogenen R65-Virus *in vivo* attenuiert ist, wurden White Leghorn Eintagsküken mit 10^6 pfu R65-E, rgR65 oder 100 μ l PBS (mock) okulonasal infiziert (Abschnitt 3.4.2.1).

Das für die Infektion mit der R65-E-Mutante verwendete Inokulum wurde durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) in Gegenwart von Elastase rücktitriert. Dabei konnte der eingestellte Titer von 10^7 pfu/ml bzw. 10^6 pfu in 100 μ l Infektionsvolumen bestätigt werden.

4.8.1.1 Klinik und Virusausscheidung

Nach der Infektion entwickelte keines der R65-E-infizierten Tiere Symptome. Im Gegensatz dazu verstarben die mit dem rgR65 infizierten Tiere innerhalb von 48 h, wobei nach 24 h noch keine Krankheitserscheinungen beobachtet wurden. Da die Tiere bereits vor der Probennahme an Tag 2 p. i. tot waren, liegen für sie keine Ausscheidungsdaten vor. Die Bestimmung der EID₅₀ ist üblicherweise die Methode der Wahl für die Detektion von infektiösem Virus in Tupferproben. Dies war für die Auswertung der Tupfer der R65-E-infizierten Tiere allerdings nicht praktikabel, da im Hühnerei keine Elastase exprimiert wird (Orlich *et al.*, 1995). Die oropharyngealen und kloakalen Tupfer der R65-E-infizierten Tiere und der Kontrollen wurden deshalb mittels Plaquetest ausgewertet (Abschnitt 3.2.6.2). Dazu wurden 400 μ l der in 1 ml Tupfermedium ausgeschwenkten Tupfer unverdünnt sowie eine 1:10 und 1:100 Verdünnung als Inokulum eingesetzt. Die Plaquetests wurden unter Zusatz von Elastase durchgeführt.

In den an den Tagen 2, 4, 6 und 8 p. i. entnommenen oropharyngealen und kloakalen Tupferproben der R65-E-infizierten Tiere und der Kontrolltiere wurde kein replikationsfähiges Virus mittels Plaquetest nachgewiesen.

4.8.1.2 Pathomorphologische Untersuchung

Die Sektion von jeweils drei Hühnern pro Gruppe (Kontrollgruppe, R65-E) erfolgte an den Tagen 2, 5 und 7 p. i. Bei den Kontrolltieren und den R65-E-infizierten Tieren wurden keine pathomorphologischen Veränderungen festgestellt. Hühner, die mit rgR65 infiziert wurden und innerhalb von 48 h verstarben, wiesen dagegen zähen Schleim in Kehlkopf und Trachea auf. Zwei Tiere zeigten multifokal fleckenförmige Blutungen (Ekchymosen) im Leberparenchym und es traten vereinzelt Schleimhautblutungen an der Kloake und den Konjunktiven auf.

In den Gewebeschnitten von Trachea, Lunge, Milz, Bursa, Herz, Gehirn, Duodenum und Pankreas der Kontrollen und der R65-E-Gruppe waren zudem keine histomorphologischen Veränderungen erkennbar. Der immunhistochemische Nachweis des Influenza-Nukleoproteins in den Organschnitten war ebenfalls negativ (Abbildung 4.18). Im Gegensatz hierzu wiesen die rgR65-infizierten Hühner 2 Tage p. i. in Bursa, Milz und Zäkaltonsille ausgedehnte Lymphozytennekrosen auf. In der Lunge lag neben einem alveolären Ödem eine heterophile, teils fibrinös-heterophile Pneumonie vor. Degenerationserscheinungen (Kernwandhyperchromasie, vakuoläre Degeneration) und zum Teil Nekrosen kamen im Alveolarepithel der Lunge, im Tubulusepithel der Niere und in den Zellen des exokrinen Pankreas vor. Im Gehirn war das Neurophil vakuolisiert (Ödem) und zahlreiche Neuronen zeigten Degenerationserscheinungen. Im Herz waren multifokale Blutungsherde zu finden. Der immunhistochemische Nachweis des Influenzavirus Antigens erfolgte in Endothelzellen (alle Organe), in Pneumozyten (Lunge), im Tracheaepithel, in den Zellen des exokrinen und endokrinen Pankreas, in Neuronen und Gliazellen (Gehirn), in den Tubulusepithelzellen der Niere, in mononukleären Entzündungszellen (u. a. Milz, Bursa), in Fibrozyten (Milz, Bursa, Zäkaltonsille, Duodenum) und in glatten Muskelzellen (Darm) (Abbildung 4.18).

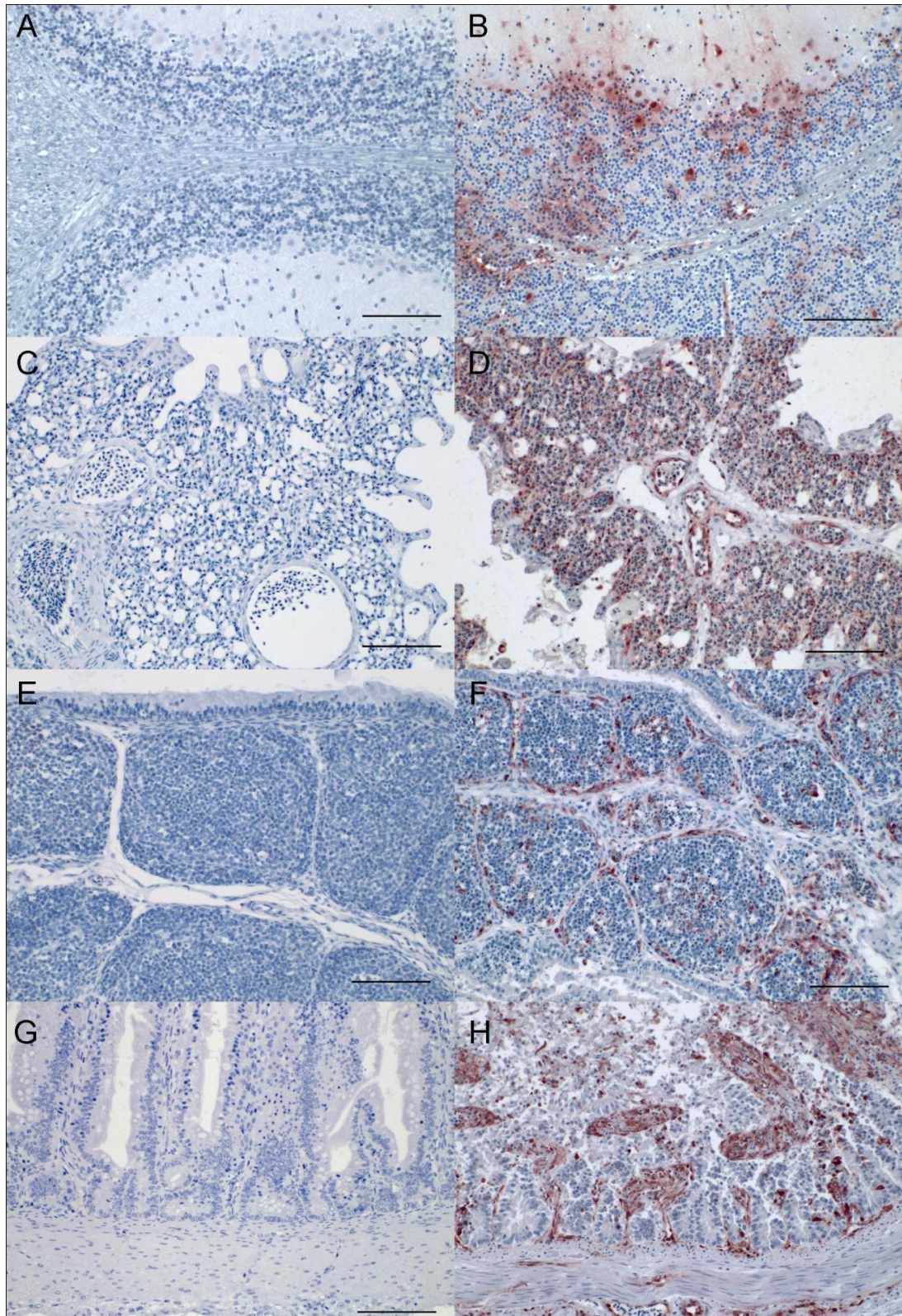


Abbildung 4.18: Immunhistochemischer Nachweis des Influenza Nukleoproteins in Kleinhirn (A, B), Lunge (C, D), Bursa (E, F) und Duodenum (G, H). R65-E (A, C, E, G) und rgR65 (B, D, F, H) infizierter Hühner 2 Tage p. i. Antigensignal als rotbraune Färbung in Zytoplasma und Zellkern, Hämatoxylin-Gegenfärbung (blau), bar = 100 µm.

4.8.2 Untersuchung der Immunantwort nach okulonasaler Infektion mit R65-E

4.8.2.1 Untersuchung der zellulären Immunantwort

Den an den Tagen 2, 5 und 7 p. i. für pathomorphologische Studien euthanasierten drei Kontroll-Tieren und drei R65-E-infizierten Tieren (Abschnitt 3.4.2.1) wurde zusätzlich Blut und Organmaterial von Lunge, Milz, Bursa und Gehirn für immunologische Untersuchungen entnommen (Abschnitt 3.4.7.3). Die Organe der an Tag 2 p. i. euthanasierten Tiere waren jedoch mit Ausnahme der Milz zu klein, um eine für die FACS-Analyse ausreichende Lymphozytenzahl isolieren zu können.

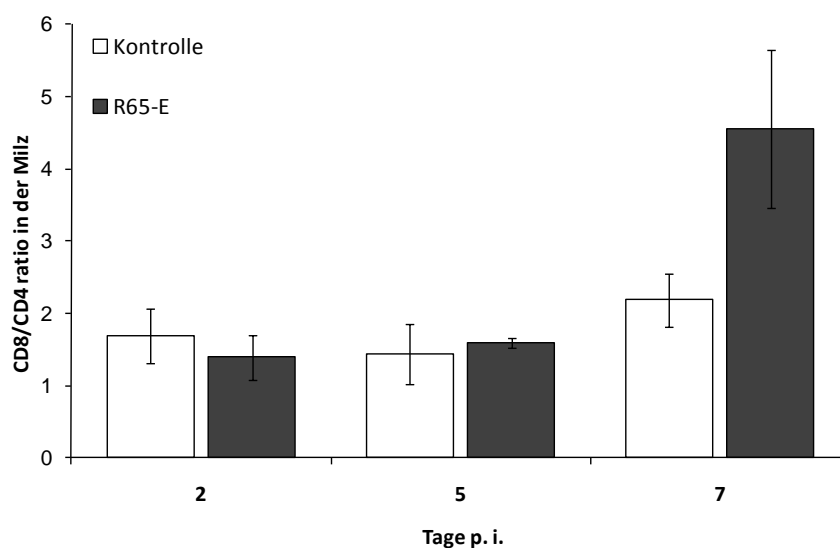


Abbildung 4.19: Verhältnis der CD8⁺ zu CD4⁺ T-Lymphozyten in der Lymphozytenpopulation (CD45^{high}) der Milz von nicht-infizierten (Kontrolle) und R65-E infizierten Tieren an den Tagen 2, 5 und 7 p. i. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Die Verteilung der einzelnen Immunzellen auf die untersuchten Organe war sehr unterschiedlich (siehe Anhang 1). So setzten sich die Lymphozyten im Blut der hier untersuchten Hühner zu 60-80% aus CD4-positiven Zellen (CD4⁺), welche den T-Helferzellen entsprechen, und zu 20-30% aus CD8-positiven Zellen (CD8⁺), welche den zytotoxischen T-Zellen (CTL) entsprechen, zusammen. Die restlichen Immunzellen stellten Bu1A-positive B-Zellen (Bu1A⁺) und MHCII-positive, Bu1A-negative Zellen (MHCII⁺/Bu1A⁻), d. h. andere Antigen präsentierende Zellen, dar. In der Lunge war diese Verteilung ähnlich. Im Vergleich dazu bestand die Lymphozytenpopulation der Bursa überwiegend aus B-Lymphozyten und die des Gehirns zu 60 bis 90% aus MHCII⁺/Bu1A⁻-Zellen. In keinem der bisher beschriebenen Organe konnten Unterschiede in der

Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren festgestellt werden. Lediglich in der Milz wurde in den R65-E-infizierten Tieren 7 Tage p. i. eine leichte Zunahme von CD8⁺ CTL bei gleichzeitiger Abnahme der CD4⁺ T-Zellen um 10-20% beobachtet. Damit hat sich das CD8/CD4-Verhältnis in der Milz zu Gunsten der CD8⁺ CTL verschoben (Abbildung 4.19).

4.8.2.2 Untersuchung der humoralen Immunantwort nach R65-E-Infektion

Im Alter von 3 und 6 Wochen wurden alle Versuchstiere geblutet (Abschnitt 3.4.5) und die Seren auf das Vorhandensein von H5-spezifischen Antikörpern mittels Haemagglutinations-Hemmtest (HAH-Test; Abschnitt 3.4.7.1) oder indirekte Immunfluoreszenz auf R65m-infizierten Zellkulturen (Abschnitt 3.4.7.2) untersucht.

Die zu untersuchenden Seren der Tiere der drei Gruppen Kontrolle, 1xR65-E und 2xR65-E waren sowohl im HAH-Test als auch in der indirekten IF negativ. Lediglich das Serum eines Tieres aus der 2xR65-E-Gruppe, Tier 2-5, wies 3 Wochen nach dem Boost einen HAH-Titer von 1:4 auf. Üblicherweise wird erst ein HAH-Titer, der bei 1:8 oder einer höheren Verdünnung liegt, als eindeutig positiv beurteilt. Da jedoch zudem die IF des Serums positiv ausfiel, kann das Ergebnis des HAH-Tests als zuverlässig angesehen werden. Damit war das Tier 2-5 aus der Boost-Gruppe das einzige Tier, bei dem H5-spezifische Antikörper vor der Belastungsinfektion detektiert werden konnten.

4.8.3 Untersuchung der protektiven Wirkung der R65-E-Mutante *in vivo*

Im Alter von 6 Wochen wurden alle Tiere einer Belastungsinfektion ausgesetzt (Abschnitt 3.4.2.1) und die täglichen klinischen Indices anhand der in Tabelle 3.2 aufgeführten Kriterien bestimmt (Abschnitt 3.4.3). Nach dem Challenge verstorbene oder moribund getötete Tiere wurden seziiert und die makroskopisch sichtbaren Läsionen dokumentiert.

4.8.3.1 Klinik nach Challenge mit dem homologen Virus rgR65

Abbildung 4.20 gibt den täglichen klinischen Index der drei Gruppen nach der Belastungsinfektion mit einer letalen Dosis des homologen rgR65-Virus über einen Zeitraum von zwei Wochen wieder.

Die Belastungsinfektion der Tiere mit dem hoch-pathogenen rgR65 verlief für alle Tiere bis auf das Tier 2-5 fatal. Die Kontrolltiere und die Tiere, die nur einmal mit dem R65-E-Virus infiziert wurden, starben zwei Tage nach Challenge oder wurden moribund getötet.

Dabei waren an Tag 1 nach Challenge (p. c.) keine bzw. nur leichte Symptome erkennbar. Die meisten Tiere der 2xR65-E-Gruppe starben leicht verzögert zwischen 48 h und 72 h p. c. bzw. wurden moribund getötet. Eines der Tiere, Tier 2-7, war über 3 Tage krank bis schwer-krank und starb 4 Tage nach dem Challenge. Allein das Tier 2-5 zeigte über den gesamten Infektionszeitraum keinerlei Symptome einer AIV Infektion.

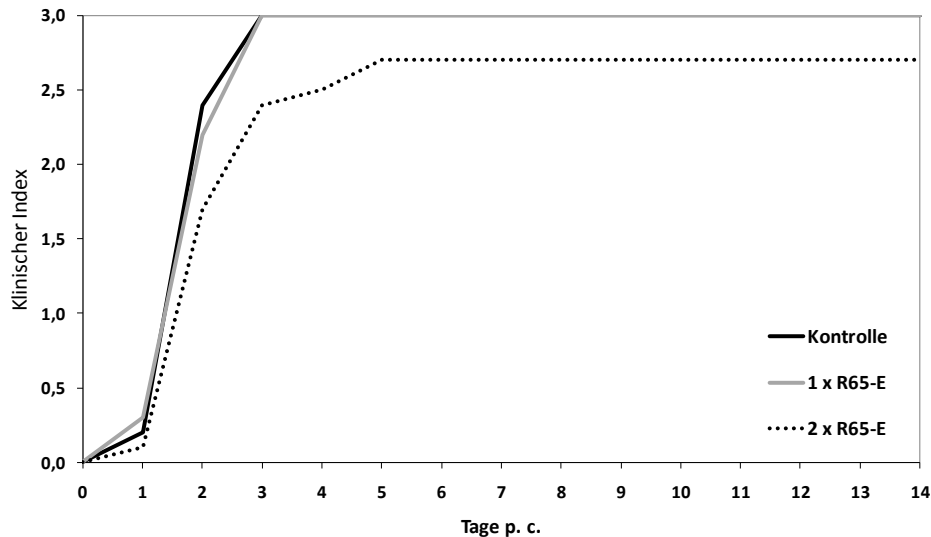


Abbildung 4.20: Über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmte tägliche klinische Indices aller Gruppen nach dem Challenge mit dem homologen Virus rgR65. Skalierung: 0 = gesund, 1 = krank, 2 = schwer krank, 3 = tot

Der mittlere klinische Index spiegelt die durchschnittliche Erkrankung der Versuchstiere einer Gruppe über einen Zeitraum von zehn Tagen wider und setzt sich aus dem Mittelwert aller, an jedem von 10 Tagen für jedes Tier einer Gruppe vergebenen Punkte zusammen. Er ergab für die Kontroll-Gruppe einen Wert von 2,66, für die 1xR65-E-Gruppe einen Wert von 2,65 und betrug für die 2xR65-E-Gruppe 2,29.

Bei der Sektion konnten bei den Versuchstieren aller drei Gruppen vereinzelte, für eine AIV-Infektion typische Läsionen identifiziert werden. Tier 2-5 zeigte in der Sektion bis auf vereinzelte hämorrhagische Herde an der Bauchspeicheldrüse und einen leicht geröteten Zwölffingerdarm keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen. Die Sektionsbefunde sind tabellarisch in Anhang 2 zusammen gefasst.

4.8.3.2 Klinik nach Challenge mit dem heterosubtypischen Virus R65-H9_{R66mutR65}

Die Reassortante R65-H9_{R66mutR65} wurde von Dr. S. Gohrbandt hergestellt. Sie besitzt das H9-Gen des Virus A/Chicken/Emirates/R66/02 (H9N2) mit der polybasischen Spaltstelle des R65-HA und die übrigen Segmente des R65-Virus. Das R65-H9_{R66mutR65}-Virus wurde ausgewählt, um das Ausmaß der nicht auf dem HA basierenden, R65-E-induzierten Immunität (wie zelluläre Immunität, nicht-neutralisierende Antikörper gegen NA oder NP) zu beurteilen.

Die täglichen klinischen Indices der drei mit R65-H9_{R66mutR65} infizierten Gruppen sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Die Bestimmung der täglichen klinischen Indices und des mittleren klinischen Index erfolgte wie unter Abschnitt 4.8.3.1 beschrieben.

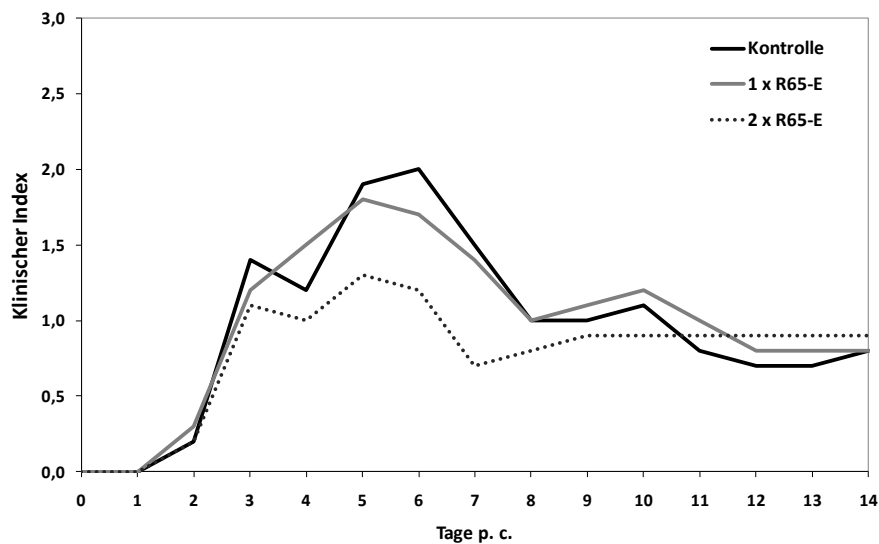


Abbildung 4.21: Über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmte tägliche klinische Indices nach dem Challenge mit dem heterosubtypischen Virus R65-H9_{R66mutR65}. Skalierung: 0 = gesund, 1 = krank, 2 = schwer krank, 3 = tot

Die Krankheitsverläufe der Kontrollen und der Tiere der 1xR65-E-Gruppe waren weitestgehend identisch. Ab Tag 3 bzw. 4 p. c. waren die Tiere beider Gruppen krank bis schwer krank. Von Tag 6 zu Tag 8 p. c. verbesserte sich der Gesundheitsstatus der Tiere bis auf wenige Ausnahmen von schwer krank zu krank. Jeweils zwei Tiere waren jedoch so geschwächt, dass sie an Tag 8 moribund getötet werden mussten. Ab Tag 10 entwickelten ein Kontrolltier sowie zwei Tiere der 1xR65-E-Gruppe zentralnervöse Störungen. Die übrigen Tiere erholten sich bis Tag 14 p. c. vollständig. Die über zehn Tage

berechneten mittleren klinischen Indices betragen für die Kontrolle 1,13 und für die 1xR65-E-Gruppe 1,12.

Bei den Tieren der 2xR65-E-Gruppe war der Schweregrad der Erkrankung sehr unterschiedlich. Zwei von zehn Tieren waren gesund, sie entwickelten keine Symptome. Drei Tiere waren ab Tag 3 p. c. für drei bis vier Tage krank und währenddessen kurzzeitig schwer krank. Fünf Tiere waren ab Tag 3 bzw. 4 p. c. bis mindestens Tag 6 p. c. schwer krank. Drei der schwer kranken Tiere wurden an Tag 8 moribund getötet. Nach Tag 6 p. c. kam es zu einer Verbesserung des Allgemeinbefindens der Tiere, ab Tag 10 wurden alle Tiere der Gruppe als gesund beurteilt. Kein Tier der 2xR65-E-Gruppe zeigte neurologische Symptome. Der mittlere klinische Index ergab einen Wert von 0,81.

Bei der Sektion wurde bei den Tieren aller drei Gruppen mindestens eines der im Folgenden aufgeführten und für eine HPAIV-Infektion typischen Läsionen verzeichnet: Konjunktivitis, Tracheitis, Pneumonie, Pankreatitis, Hämorrhagien bzw. Petechien im Drüsenmagen, Herzbeutel und/oder den serösen Häuten. Die Sektionsbefunde sind in Anhang 2 tabellarisch zusammen gefasst.

4.8.4 Virusausscheidung nach HPAIV Challenge

Anhand von oropharyngealen und kloakalen Tupferproben, die den Versuchstieren an den Tagen 2, 4, 6 und 8 p. c. entnommen wurden, wurde das Vorhandensein viraler RNA durch qRT-PCR (Abschnitt 3.1.1.5) und die Ausscheidung von infektiösem Virus mittels Bestimmung der TCID₅₀ (Abschnitt 3.2.6.3) untersucht.

4.8.4.1 Virusausscheidung nach rgR65-Challenge

Abbildung 4.22 zeigt die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse der oropharyngealen und kloakalen Tupferproben aller überlebenden Tiere nach Challenge mit dem homologen rgR65-Virus. Es wurden die Mittelwerte aus den Ct-Werten der positiven Proben einer Gruppe berechnet. Eine Probe wurde dann als positiv angesehen, wenn für sie ein Ct-Wert bestimmt werden konnte. Proben, für die kein Ct-Wert bestimmt werden konnte, galten als negativ.

In den Balken der Grafik (Abbildung 4.22) wurde zudem die Zahl der Tiere mit positiven Tupferproben in Bezug zur Zahl der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Tiere einer Gruppe angegeben

ERGEBNISSE

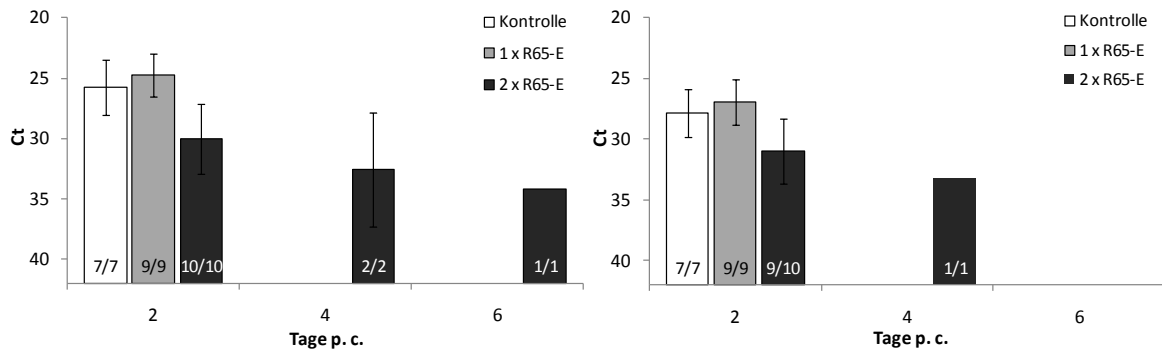


Abbildung 4.22: Nachweis viraler RNA in den oropharyngealen (links) und kloakalen (rechts) Tupferproben der Versuchstiere an den Tagen 2, 4 und 6 nach rgR65-Challenge mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ct-Werte aller positiven Tupfer einer Gruppe und die Anzahl der Tiere mit positiven Tupferproben im Verhältnis zur Gesamtzahl der zu dem Zeitpunkt noch lebenden Tiere. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Die Mengen Influenza-A-spezifischer RNA in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben der Kontroll-Gruppe und der 1xR65-E-Gruppe waren an Tag 2 p. c. nahezu gleich. Zudem wiesen die Tiere beider Gruppen in den oropharyngealen Proben eine geringfügig höhere Virusgenomlast auf als in den kloakalen Proben. Letzteres galt auch für die 2xR65-E-Gruppe. Die einzige Ausnahme bildete Tier 2-5, dessen kloakale Tupfer an allen Tagen der Tupfernahme in der qRT-PCR negativ waren.

Die Virusgenomlast war in den oropharyngealen Tupfern der 2xR65-E-Gruppe an Tag 2 p. c. im Schnitt um 5 Ct-Werte und die der kloakalen Tupfer um 3 Ct-Werte niedriger als bei den beiden anderen Gruppen. Diese Abweichungen waren nicht signifikant und hingen zum Teil mit den hohen Ct-Werten der Tiere 2-5 und 2-7 zusammen. Von Tag 2 zu Tag 4 p. c. wurde in den oropharyngealen und kloakalen Tupfern von Tier 2-7 eine Zunahme der viralen RNA-Menge detektiert. Dieser Anstieg ist auf eine gesteigerte Replikation des rgR65 zurück zu führen und ging dementsprechend mit dem Tod des Tieres an Tag 4 p. c. einher.

An Tag 8 p. c. war die oropharyngeale Tupferprobe von Tier 2-5 negativ. Die Tatsache, dass die kloakalen Tupferproben von Tier 2-5 zu allen Zeitpunkten der Tupfernahme negativ waren, deutet darauf hin, dass es hier nicht zu einer systemischen Ausbreitung des hoch-pathogenen Challenge-Virus rgR65 kam.

Der Nachweis von infektiösem Virus in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben 2 Tage nach rgR65-Challenge ist mittels Bestimmung der TCID₅₀ in Abbildung 4.23

dargestellt. Als Darstellungsform wurde ein Scatterplot gewählt, um die individuellen Streuungen innerhalb einer Gruppe besser abbilden zu können. Die Median-Werte jeder Gruppe sind als schwarze Querbalken gekennzeichnet.

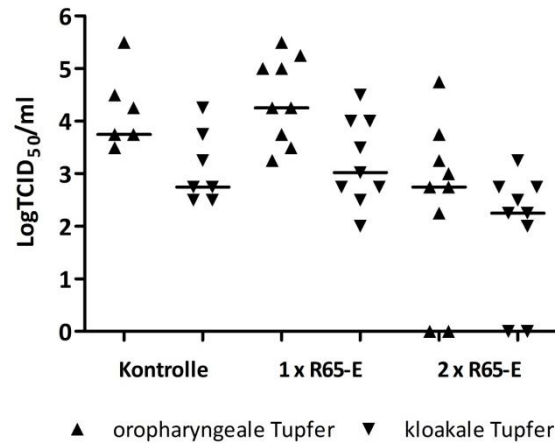


Abbildung 4.23: Nachweis der oralen und kloakalen Virus-Ausscheidung 2 Tage nach rgR65-Challenge anhand der Bestimmung der Zellkultur-infektiösen-Dosis-50 (TCID₅₀) je 1 ml Tupferprobe. Die Werte jeder Gruppe inklusive des Medians (Querbalken) sind in Form eines Scatterplots dargestellt.

In allen Tupferproben, deren Ct-Wert niedriger als 33 war, konnte infektiöses Virus mit einer TCID₅₀ von mindestens 10² je ml Virussuspension nachgewiesen werden.

Oral wie kloakal schieden die Kontrolltiere und die Tiere der 1xR65-E-Gruppe ähnliche Mengen Virus aus. Dabei war die kloakale Virusausscheidung unbedeutend geringer. Die TCID₅₀-Werte reichten oral von 10³ bis 3x10⁵/ml und kloakal von 10² bis 10⁵/ml. Bis auf zwei Proben lagen die TCID₅₀-Werte der oropharyngealen Tupfer der 2xR65-E-Gruppe zwischen 10² und 10⁴/ml mit einem Ausreißer bei 10⁵/ml und die TCID₅₀-Werte der kloakalen Tupfer zwischen 10² und 10³/ml. Diese Werte waren somit tendenziell niedriger als die der beiden anderen Gruppen, aber nicht signifikant abweichend.

Aus den Tupfern des Tieres 2-5 konnte an keinem Tag der Tupfernahme infektiöses Virus isoliert werden. Bei Tier 2-7 wurde lediglich im oropharyngealen Tupfer von Tag 4 p. c. infektiöses Virus mit einer TCID₅₀ von 2,3x10³/ml nachgewiesen (nicht in Abb. 4.22 gezeigt). Aus dem kloakalen Tupfer von Tag 4 p. c. konnte kein infektiöses Virus erhalten werden. Der Krankheitsverlauf und die von Tag 2 zu Tag 4 p. c. ermittelte Zunahme der Virusgenomlast in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben sprechen für eine systemische Ausbreitung des rgR65-Virus bei Tier 2-7.

4.8.4.2 Virusausscheidung nach Challenge mit R65-H9_{R66mutR65}

Der Nachweis viraler RNA in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben von Tag 2, 4, 6 und 8 nach Challenge mit dem heterosubtypischen R65-H9_{R66mutR65}-Virus ist anhand der in Abbildung 4.24 wieder gegebenen qRT-PCR-Ergebnisse gezeigt. Die Daten wurden wie zuvor beschrieben ausgewertet (Abschnitt 4.8.4.1).

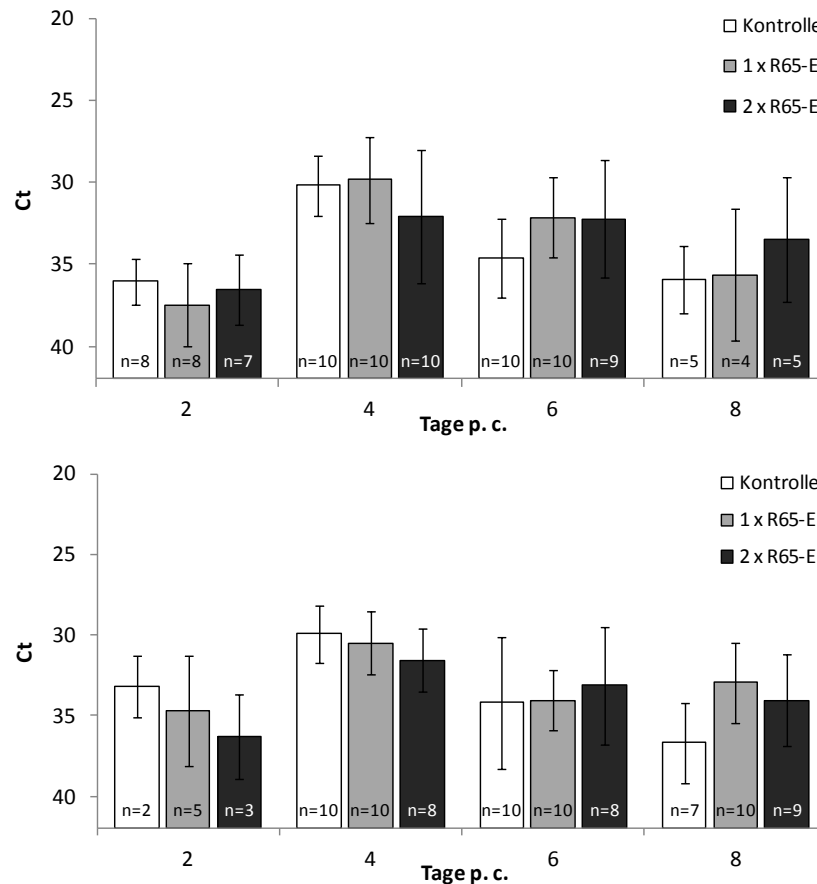


Abbildung 4.24: Nachweis viraler RNA in den oropharyngealen (oben) und kloakalen (unten) Tupferproben der Versuchstiere nach R65-H9_{R66mutR65}-Challenge mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ct-Werte aller positiven Tupfer einer Gruppe und die Anzahl (,n‘) der Tiere mit positiven Tupferproben von je 10 Tieren pro Gruppe. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Alle drei Gruppen wiesen an den Tagen der Tupfernahme keine deutlich unterschiedlichen Mengen virale RNA in den Tupferproben auf.

An Tag 2 p. c. war bei mindestens 7 von 10 Tieren jeder Gruppe virale RNA mit einem Ct-Wert über 32 in den oropharyngealen Tupfern nachweisbar, während dies in den kloakalen Tupferproben höchstens bei 5 von 10 Tieren möglich war. Eine systemische Ausbreitung des R65-H9_{R66mutR65}-Virus hatte zu diesem Zeitpunkt folglich noch nicht bei allen Tieren

stattgefunden. Tag 4 p. c. war mit einem mittleren Ct von 30 bis 32 bei allen Gruppen der Tag mit der höchsten Virusgenomlast in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben. Dabei schwankten die Ct-Werte der oropharyngealen Tupfer bei der 2xR65-E-Gruppe am stärksten. Bei 2 von 10 Tieren der 2xR65-E-Gruppe konnte kein Ct-Wert in den kloakalen Tupferproben bestimmt werden. Eines der beiden Tiere gehörte zu den Tieren, die über den gesamten Infektionszeitraum als gesund beurteilt wurden (Abschnitt 4.8.3.2).

Die Ct-Werte der an Tag 6 und 8 p. c. entnommenen Tupferproben waren überwiegend größer als 32 und lagen nur bei wenigen Tupfern zwischen 29 und 32. Dabei konnte an Tag 8 p. c. höchstens bei der Hälfte der Tiere in den oropharyngealen Tupfern ein Ct detektiert werden (siehe Abbildung 4.24).

Infektiöses Virus wurde an Tag 4 p. c. in den oropharyngealen Tupfern bei 4 Kontrolltieren, 5 Tieren der 1xR65-E-Gruppe und bei 3 Tieren der 2xR65-E-Gruppe isoliert. In den kloakalen Tupfern von Tag 4 p. c. wurde bei 4 Kontrollen sowie jeweils 3 Tieren der 1xR65-E-Gruppe und 2xR65-E-Gruppe infektiöses Virus detektiert. Dabei wurde in den Proben, bei denen ein Ct-Wert von 28 und niedriger gemessen wurde, eine TCID₅₀ von mindestens 3×10^2 /ml und höchstens 10^4 /ml ermittelt. In Tupferproben, deren Ct-Wert 30 bis 29 betrug, ergab die TCID₅₀ nicht mehr als 3×10^2 /ml. Aus Tupfern, deren Ct-Werte über 30 lagen, konnte kein infektiöses Virus isoliert werden. Dementsprechend war die Virusisolation aus Tupferproben der Tage 2 p. c. und 8 p. c. negativ. An Tag 6 p. c. lagen die TCID₅₀-Werte bei der Kontrolle und der 1xR65-E-Gruppe in je 4 oropharyngealen und 3 kloakalen Tupfern sowie bei der 2xR65-E-Gruppe in 1 oropharyngealen und 3 kloakalen Tupfern unter 3×10^2 /ml. Die übrigen Tupfer von Tag 6 p. c. waren negativ.

Zusammenfassend hat eine orale und kloakale Ausscheidung von infektiösem Virus mit einer TCID₅₀ von mehr als 3×10^2 /ml nur bei wenigen Tieren stattgefunden und beschränkte sich überwiegend auf Tag 4 p. c. Dies deckt sich mit den Daten der qRT-PCR. Die Höhe der detektierbaren TCID₅₀-Titer unterschied sich zudem zwischen den Gruppen kaum.

4.8.5 Immunantwort nach homologem und heterologem Challenge

Bei jeweils drei Tieren pro Gruppe wurde an den Tagen 2, 5, 7 und 14 p. c. die Zusammensetzung der aus dem Blut isolierten Lymphozyten-Population mittels FACS analysiert (Abschnitt 3.4.7.3). Zum Versuchsende an Tag 14 p. c. wurde zudem das

Vorhandensein AIV-spezifischer Antikörper im Serum der Versuchstiere durch HAH-Test (Abschnitt 3.4.7.1) untersucht.

Da ein Großteil der mit dem homologen rgR65 infizierten Tiere nach zwei Tagen verstorben war (Abschnitt 4.8.3.1), konnten für die drei Gruppen keine substantiellen Daten, die Induktion einer zellulären oder humoralen Immunantwort betreffend, gewonnen werden. Es wurde lediglich der H5-spezifische Antikörper-Titer im Serum von Tier 2-5 am Versuchsende bestimmt, der einen Wert von 1:16 hatte und damit im Vergleich zu dem HAH-Titer vor der Belastungsinfektion um ein Vierfaches höher lag. Nach der Challengeinfektion kam es demnach zu einer Stimulation der bereits vorhandenen, H5-spezifischen Antikörper-produzierenden B-Zellen, die offensichtlich wesentlich zum Schutz des Tieres vor der rgR65-Infektion beigetragen hat.

Bei den mit der Reassortante R65-H9_{R66mutR65} infizierten Tieren konnte eine immunologische Auswertung der Blutproben mit Hilfe der FACS-Analyse durchgeführt werden (Abbildung 4.25). Zur Schonung der Tiere wurde an den jeweiligen Tagen Blut von verschiedenen Tieren abgenommen. Damit war eine Kinetik für Einzeltiere nicht möglich. Weiterhin wurde besonders bei der 2xR65-E-Gruppe darauf geachtet, dass Tiere mit einem unterschiedlichen Schweregrad der Erkrankung beprobt wurden, so dass die Daten das gesamte immunologische Spektrum einer Gruppe widerspiegeln würden. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im Blut von 6 Wochen alten, nicht-infizierten Tieren untersucht und in Abbildung 4.25 an Tag 0 vergleichsweise dargestellt.

Die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im Blut war nach dem R65-H9_{R66mutR65}-Challenge innerhalb der drei Gruppen vergleichbar.

Der prozentuale Anteil CD4⁺ T-Zellen nahm an Tag 5 p. c. bei der 1xR65-E-Gruppe und nach Tag 5 p. c. bei den anderen beiden Gruppen von 40-50% ausgehend auf 20-40% ab. Gleichzeitig nahm bis Tag 5 p. c. der Anteil CD8⁺ T-Zellen kontinuierlich von 25% auf 5-10% ab, stieg nach Tag 5 p. c. aber wieder auf das Ausgangsniveau von 15-25% an. Im Gegensatz dazu wurde bei allen Gruppen bis Tag 5 p. c. eine Zunahme der Bu1A⁺ B-Zellen gemessen. Der Anteil anderer Antigen-präsentierender MHCII⁺/Bu1A⁻ Zellen stieg von Tag 2 p. c. bis Tag 7 p. c. stetig bzw. für die 2xR65-E-Gruppe sprunghaft von Tag 5 auf Tag 7 p. c. um jeweils 10-15% an. Insgesamt kam es infolge der Belastungsinfektion bei nahezu allen Tieren bis Tag 7 p. c. zu einer Zunahme des Anteils der Antikörper-produzierenden B-Zellen und anderer MHCII-positiven, Antigen-

präsentierenden Zellen bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils CD4+ T-Helferzellen und einer kurzfristigen Abnahme CD8+ CTL. Am Versuchsende entsprach die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation bei allen Gruppen der der 6 Wochen alten, nicht-infizierten Kontrolltiere.

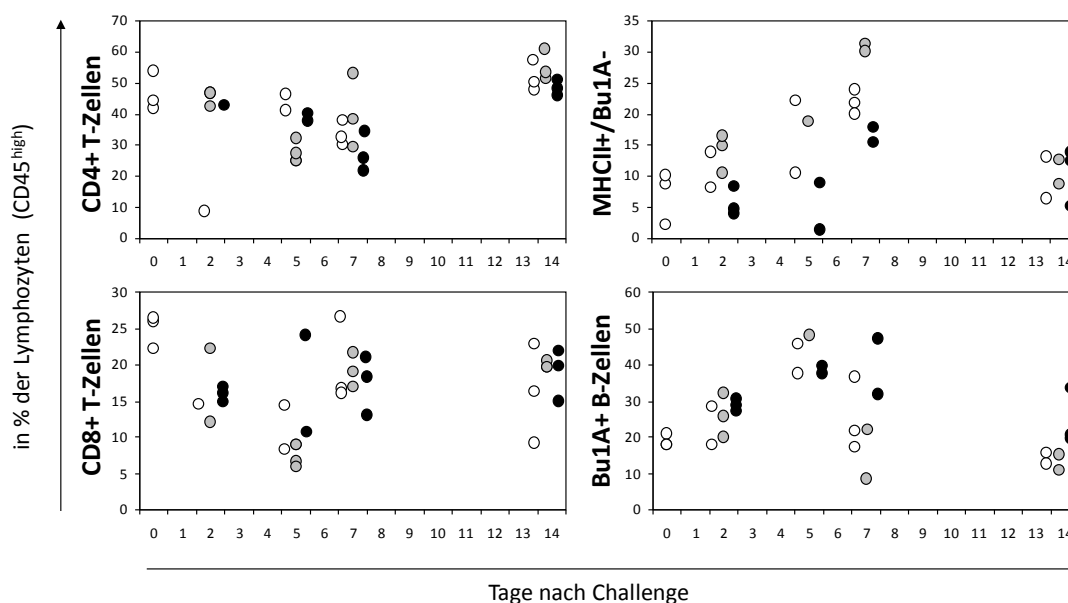


Abbildung 4.25: Zusammensetzung der aus dem Blut der Versuchstiere an den Tagen 2, 5, 7 und 14 nach R65-H9_{R66mutR65}-Challenge isolierten Lymphozytenpopulation (CD45^{high}). Kontrolle = weiße Markierung, 1xR65-E = graue Markierung, 2xR65-E = schwarze Markierung. Zusätzlich ist die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation im Blut von 6 Wochen alten, nicht-infizierten Hühnern gezeigt (weiße Markierung, Tag 0).

Abbildung 4.26 gibt die HAH-Titer der in den Seren der Versuchstiere an Tag 14 nach R65-H9_{R66mutR65}-Challenge detektierten H9-spezifischen Antikörper in Form eines Boxplots wieder. Dabei ist der Median jeder Gruppe in der Box als schwarzer Balken bzw. bei der 2xR65-E-Gruppe als obere Boxbegrenzung gezeigt. Die mittleren 50% der Gruppenwerte liegen im Bereich der jeweiligen Box. Die beiden Extrema, d. h. der höchste und der niedrigste Wert, sind durch die von der Box aus verlängerten Linien dargestellt. Die HAH-Titer der an Tag 8 p. c. moribund getöteten Tiere wurden nicht in die Grafik mit aufgenommen.

Die H9-spezifischen Antikörper-Titer der Tiere der Kontrollgruppe und der 1xR65-E-Gruppe waren sehr ähnlich und lagen hauptsächlich bei 1:512 oder 1:1024. Die HAH-Titer der 2xR65-E-Gruppe waren im Gegensatz dazu tendenziell niedriger und lagen

überwiegend bei bzw. zwischen 1:128 und 1:512. Das Ausmaß der humoralen Immunantwort, gemessen an der Höhe des H9-spezifischen Antikörper-Titers, orientierte sich am Ausmaß der Virusreplikation im Organismus. D. h. je effektiver die Vermehrung des Challengevirus durch das Immunsystem bekämpft werden konnte, umso weniger Antikörper wurden gebildet. So war beispielsweise bei einem Tier der 2xR65-E-Gruppe, das im Zuge der klinischen Beurteilung nach dem Challenge als gesund eingestuft wurde (Abschnitt 4.8.3.2), und bei dem zudem nur sehr hohe oder keine Ct-Werte in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben bestimmt werden konnten (Abschnitt 4.8.4.2), der H9-spezifische Antikörpertiter mit 1:32 am niedrigsten.

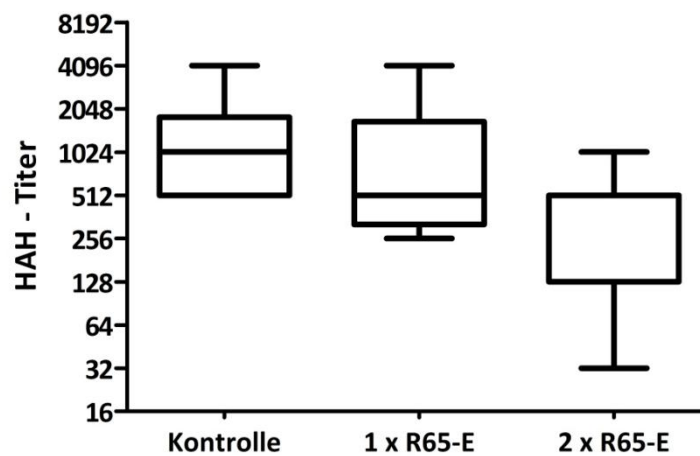


Abbildung 4.26: H9-spezifische HAH-Titer in den Seren der Kontrollen, der Tiere der 1xR65-E-Gruppe und der 2xR65-E-Gruppe nach R65-H9_{R66mutR65}-Challenge. Gezeigt sind die Mediane der HAH-Titer der drei Gruppen sowie die jeweiligen Extremwerte. In den Boxen liegen die jeweils mittleren 50% der Werte. Der Median der 2xR65-E-Gruppe entspricht der oberen Boxbegrenzung.

Die H9-spezifischen Antikörpertiter der an Tag 8 moribund getöteten Tiere lagen zwischen 1:256 und 1:1024 und damit im Bereich der an Tag 14 p. c. gewonnenen Seren. Das Vorhandensein H9-spezifischer Antikörper im Serum ab mindestens Tag 8 p. c. korrelierte wahrscheinlich mit der nach Tag 6 p. c. beobachteten Verbesserung des Gesundheitszustandes der Tiere.

4.8.6 Attenuierung und Schutzwirkung der R65-E-Mutante nach *in ovo* Applikation

Um zu testen, ob die R65-E-Mutante eine bessere Schutzwirkung gegen einen Challenge mit dem homologen rgR65-Virus bei veränderter Applikationsart bieten würde, wurden 24 embryonierte White Leghorn SPF Hühnereier *in ovo* mit 10^6 pfu R65-E infiziert (Abschnitt

3.4.1.2). Der Hälfte der Eier wurde zudem die Protease Elastase zugesetzt (Abschnitt 3.4.2.2). Die Gruppe wurde als R65-E+ bezeichnet. Dabei sollte überprüft werden, ob die R65-E-Mutante durch die Zugabe der im embryonierten Hühnerei nicht verfügbaren Elastase mehr als einen Replikationszyklus durchlaufen und somit eine höhere Antigenausbeute erzielt werden würde.

4.8.6.1 Klinik und Virusausscheidung nach Applikation von R65-E *in ovo*

Die Schlupfrate betrug bei beiden Gruppen 58%. Von je 12 infizierten Eiern pro Gruppe schlüpften nach Ablauf der Brutdauer von 21 Tagen 7 Küken aus. Es konnte keine zeitliche Verzögerung im Schlupfvorgang bei den beiden Gruppen untereinander festgestellt werden. Die Tiere wurden nach dem Schlupf täglich klinisch beurteilt (Abschnitt 3.4.3). Alle Tiere waren gesund.

Die am Tag des Schlüpfens und an den drei Folgetagen genommenen Tupferproben wurden durch Plaquetest (Abschnitt 3.2.6.2) in Gegenwart von Elastase auf die Ausscheidung von infektiösem Virus untersucht. Dazu wurden 400 µl der in 1 ml Tupfermedium ausgeschwenkten Tupfer unverdünnt sowie eine 1:10 und 1:100 Verdünnung als Inokulum eingesetzt. Die Plaquetests wurden in Gegenwart von Elastase durchgeführt. In keiner der Tupferproben wurde infektiöses Virus nachgewiesen.

Zusätzlich wurden die am Tag des Schlüpfens und am Tag darauf genommenen Tupferproben auf das Vorhandensein viraler RNA mittels qRT-PCR (Abschnitt 3.1.1.5) analysiert. Die mittlere Virusgenomlast ist anhand der in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben bestimmten Ct-Werte in Abbildung 4.27 gezeigt. Negative Proben, d. h. Proben ohne Ct, wurden nicht bei der Berechnung der Mittelwerte berücksichtigt.

Am Schlupftag konnte bis auf wenige Ausnahmen in allen Tupfern virale RNA mit Ct-Werten zwischen 40 und 32 detektiert werden. Die Virusgenomlast war bei beiden Gruppen gleich. Die Ct-Werte in den Tupferproben der R65-E-Gruppe von Tag 1 nach Schlupf deckten sich weitgehend mit den Ergebnissen vom Vortag. Sie lagen zwischen 40 und 34. Bei der R65-E+-Gruppe wurde hingegen nur noch in 3-4 Tieren virale RNA mit Ct-Werten über 36 nachgewiesen.

Die Detektion AIV-spezifischer RNA in den Tupferproben der *in ovo* infizierten Tiere nach dem Schlupf deuten darauf hin, dass die Tiere zwar infiziert wurden. Die hohen Ct-Werte und der negative Virusnachweis durch Plaquetest lassen jedoch vermuten, dass

wahrscheinlich keine Replikation der R65-E-Mutante über einen Infektionszyklus hinaus stattgefunden hat.

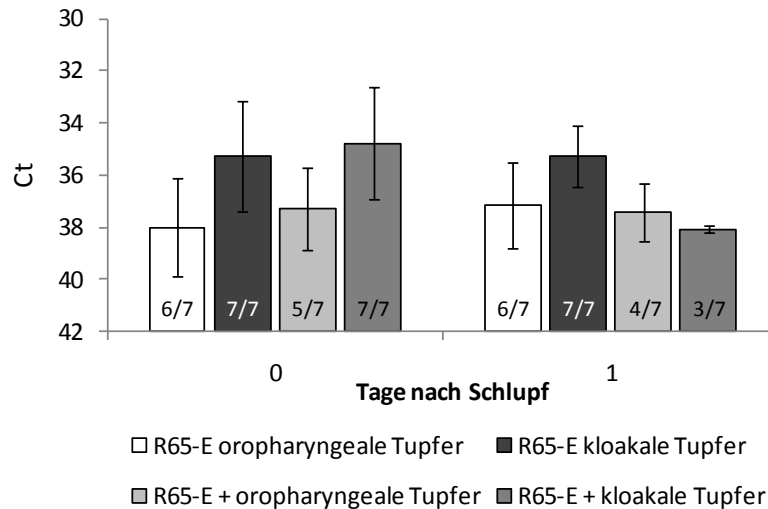


Abbildung 4.27: qRT-PCR-Nachweis viraler RNA in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben nach *in ovo* Infektion mit jeweils 10^6 pfu R65-E mit Elastase (+) oder ohne. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ct-Werte aller positiven Tupfer einer Gruppe und die Anzahl der Tiere mit positiven Tupferproben im Verhältnis zur Gruppengröße. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

4.8.6.2 Humorale Immunantwort vor Challenge

Der Nachweis H5-spezifischer Antikörper in den Serumproben, die von den Tieren im Alter von drei und sechs Wochen gewonnen wurden (Abschnitt 3.4.2.2), erfolgte mittels HAH-Test (Abschnitt 3.4.7.1) und indirekter Immunfluoreszenz auf mit R65m-infizierten Zellkulturen (Abschnitt 3.4.7.2).

Bis auf das Serum eines Tieres der R65-E+-Gruppe, Tier 2-1, waren alle Seren im HAH-Test negativ. Tier 2-1 wies drei Wochen nach Schlupf einen HAH-Titer von 1:4 und sechs Wochen nach Schlupf einen HAH-Titer von 1:8 auf. Die anschließend durchgeführte IF konnte bestätigen, dass Tier 2-1 das einzige Tier mit detektierbaren H5-spezifischen Antikörpern war.

4.8.6.3 Klinik und Virusausscheidung nach Challenge

Im Alter von sechs Wochen wurden die Tiere der R65-E und R65-E+-Gruppe mit 10^6 pfu des homologen rgR65 infiziert (Abschnitt 3.4.2.2). Die täglichen klinischen Indices der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen sind in Abbildung 4.28 wieder gegeben.

ERGEBNISSE

Innerhalb von 2-3 Tagen nach Challenge waren alle Tiere der R65-E-Gruppe und 6 von 7 Tiere der R65-E+-Gruppe tot. Tier 2-1 entwickelte keine Symptome und wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum als gesund beurteilt. Der mittlere klinische Index betrug für die R65-E-Gruppe 2,69 und für die R65-E+-Gruppe 2,26.

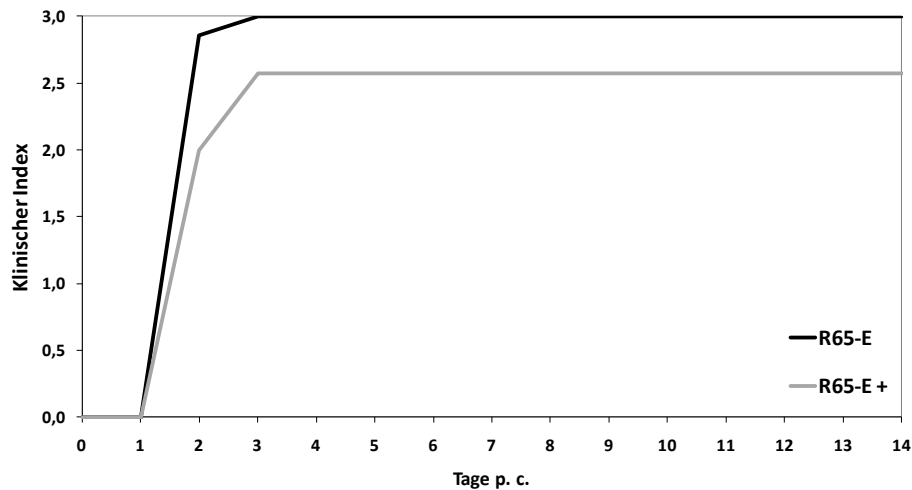


Abbildung 4.28: Über einen Zeitraum von 14 Tagen bestimmte tägliche klinische Indices nach Challenge der beiden Gruppen R65-E und R65-E+ mit dem homologen rgR65-Virus. Skalierung: 0 = gesund, 1 = krank, 2 = schwer krank, 3 = tot

Abbildung 4.29 zeigt die mittels qRT-PCR bestimmte Virusgenomlast in den Tupferproben der Tiere an Tag 2 p.c. (Abbildung 4.29 links) sowie die durch Bestimmung der TCID₅₀ detektierte orale und kloakale Virusausscheidung an Tag 2 p. c. (Abbildung 4.29 rechts). Dabei konnten nur 1 Tier der R65-E-Gruppe und 5 Tiere der R65-E+-Gruppe getupfert werden. Von den bereits verstorbenen Tieren wurden keine Proben genommen.

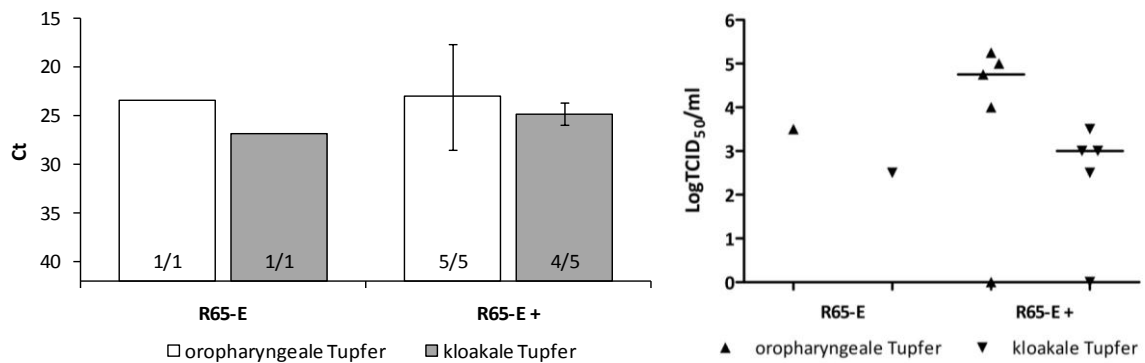


Abbildung 4.29: Nachweis von viraler RNA mittels qRT-PCR (links) und von infektiösem Virus mittels Bestimmung der TCID₅₀ (rechts) in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben 2 Tage nach rgR65-Challenge der beiden Gruppen R65-E und R65-E+. Im Scatterplot (rechts) sind die Median-Werte als schwarze Balken dargestellt.

Die Ct-Werte der oropharyngealen Tupfer der R65-E+-Gruppe lagen außer bei Tier 2-1 zwischen 23 und 17, die Ct-Werte der kloakalen Tupfer zwischen 26 und 24. Die Ct-Werte des Tieres 1-2 aus der R65-E-Gruppe lagen ebenfalls in diesen Bereichen.

Tier 2-1 wurde nach Tag 2 p. c. über einen Zeitraum von einer Woche täglich getupfert. In den oropharyngealen Tupfern konnte bis einschließlich Tag 6 p. c. virale RNA mit einem Ct-Wert zwischen 37 und 32 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis viraler RNA in den kloakalen Tupfern von Tier 2-1 war über den gesamten Zeitraum in der qRT-PCR negativ.

Infektiöses Virus wurde mit Ausnahme der Tupfer von Tier 2-1 aus allen an Tag 2 p. c. genommenen Tupferproben isoliert (Abbildung 4.29 rechts). Der Gehalt von infektiösem Virus schwankte in den oropharyngealen Tupfern zwischen einer TCID₅₀ von 3x10³/ml und 2x10⁵/ml und in den kloakalen Tupfern zwischen einer TCID₅₀ von 2x10²/ml und 3x10³/ml.

In den Tupfern von Tier 2-1 konnte zu keinem Zeitpunkt nach Challenge infektiöses Virus mittels Bestimmung der TCID₅₀ detektiert werden.

Bei der Sektion des Tieres 2-1 konnten keine Anzeichen einer vorangegangenen HPAIV Infektion festgestellt werden.

4.8.6.4 Humorale Immunantwort nach rgR65-Challenge

Der Nachweis H5-spezifischer Antikörper im Serum des einzigen überlebenden Tieres 14 Tage p.c. wurde mittels HAH-Test (Abschnitt 3.4.7.1) durchgeführt. Im Serum des Tieres 2-1 wurde ein HAH-Titer von 1:128 ermittelt. Dieser Titer war damit um ein Sechzehnfaches höher als vor der Belastungsinfektion. Die Challengeinfektion führte bei Tier 2-1 wie im dem vorangegangenen Tierversuch bei Tier 2-5 (Abschnitt 4.8.5) vermutlich zur Stimulation bereits vorhandener, H5-spezifischer Antikörper-produzierender B-Zellen, die einen Schutz gegenüber die homologe HPAIV-Infektion vermittelten.

5. Diskussion

5.1 Protein-Protein-Interaktionen

Die molekularen Mechanismen der Adaptation von Influenza-A-Viren an einen neuen Wirt sind komplex und noch nicht im Einzelnen aufgeklärt. Allgemein geht man jedoch davon aus, dass eine Anpassung an eine neue Spezies neben einer Veränderung der HA-Rezeptorspezifität (Ito *et al.*, 1998; Subbarao und Katz, 2000; Neumann und Kawaoka, 2006; Matrosovich *et al.*, 2009) an eine modifizierte Wechselwirkung viraler Proteine mit verschiedenen Wirtsfaktoren gebunden ist (Gabriel *et al.*, 2005; Labadie *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2008b; Mehle und Doudna, 2008; Naffakh *et al.*, 2008; Resa-Infante *et al.*, 2008; Moncorge *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit rekombinante Influenza-A-Viren unterschiedlichen Wirtsspektrums mit einem *Strep*-tag im PB2-Protein hergestellt, mit dessen Hilfe virale Ribonukleoprotein-Komplexe (vRNP) mittels Affinitäts-Chromatographie spezifisch aufgereinigt werden können.

5.1.1 Herstellung rekombinanter Influenza-A-Viren mit einem *Strep*-tag im PB2

Das *Strep*-tag gehört zu den kleinen Affinitätstags und kann als „molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung“ herangezogen werden (Skerra, 2003). Die *Strep*-tag-Technologie weist diverse Vorzüge auf (Skerra und Schmidt, 2000; Terpe, 2003; Lichty *et al.*, 2005; Schmidt und Skerra, 2007). Besonders hervor zu heben ist, dass eine kompetitive Elution des *Strep*-Fusionsproteins von der Affinitätsmatrix unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Dadurch kann die biologische Aktivität des Fusionspartners erhalten bleiben. Das *Strep*-tag II scheint zudem in Bezug auf Ausbeute, Reinheit und Kosten der Proteinreinigung anderen kleinen Affinitätstags wie dem Flag-tag oder His-tag überlegen zu sein (Lichty *et al.*, 2005) und wurde aufgrund dieser Eigenschaften als Hilfsmittel zur Aufreinigung viraler RNP-Komplexe ausgewählt.

Als Fusionspartner für das *Strep*-tag diente die Polymerase-Untereinheit PB2. Die Grundlage für die hierbei zur Anwendung gekommene Klonierungsstrategie (Abschnitt 4.2) bildeten die Untersuchungen von Dos Santos Afonso *et al.* (2005) zum Einfügen von Sequenzen an unterschiedlichen Positionen in das PB2-Segment und von Stech *et al.* (2008) sowie Geiser *et al.* (2001) zur Restriktionsenzym-unabhängigen Mutagenese. Unter Berücksichtigung der am 5'-Ende der vRNA des PB2-Segmentes vorhandenen

Assemblierungs-Signale, die für die Bildung von replikationsfähigen Viruspartikeln in zusammenhängender Form vorliegen müssen (Duhaut und Dimmock, 2000; 2002; Dos Santos Afonso *et al.*, 2005; Fujii *et al.*, 2005), wurden mittels reverser Genetik Influenza-A-Viren generiert, deren PB2-Protein am C-Terminus mit einem *Strep*-tag fusioniert ist (Abschnitt 4.2.2). Diese rekombinanten Viren waren – in Übereinstimmung mit den Daten von Dos Santos Afonso *et al.* (2005) – replikationsfähig und exprimierten mindestens bis zur 2. Viruspassage stabil das *Strep*-PB2-Fusionsprotein. Dies konnte durch indirekte Immunfluoreszenz (Abbildung 4.3; Abschnitt 4.3.1) und Western-Blot-Analysen (Abbildung 4.6; Abschnitt 4.3.2) verifiziert werden. In den Wachstumskinetiken auf Säuger- bzw. Vogelzellen zeigten die getaggtten Viren zum Teil einen geringen Replikationsnachteil gegenüber den jeweiligen ungetaggtten Viren (Abbildungen 4.4 und 4.5; Abschnitt 4.3.2), der sich entweder in einer leichten Verzögerung des Viruswachstums oder in einer Erniedrigung des Virus-Endtiters um höchstens 1 log-Stufe äußerte. Dies steht nicht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Dos Santos Afonso *et al.* (2005), welche zwar keine Wachstumsunterschiede beobachten konnten, bei ihren Experimenten allerdings einen anderen Affinitätstag und den Zellkultur-adaptierten Laborstamm WSN verwendeten.

Obwohl das *Strep*-tag als biologisch inert beschrieben ist (Schmidt und Skerra, 2007), ist es möglich, dass es durch die C-terminale Insertion in das PB2-Protein zu Konformationsänderungen innerhalb des PB2 oder Polymerase-Komplexes kommen kann, welche sich auf die Wechselwirkung mit anderen Proteinen negativ auswirken könnten. Um auch solche Proteine im Komplex mit viralen RNPs aufzureinigen, die eventuell mit dem C-Terminus des PB2-Proteins interagieren, wurden als zusätzliche Strategie rekombinante Viren erzeugt, deren PB2-Protein am N-Terminus mit einem *Strep*-tag fusioniert war (Abschnitt 4.2.1). Da das Vorhandensein interner Verpackungssignale am 3'-Ende der vRNA des PB2-Segmentes umstritten ist (Dos Santos Afonso *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005; 2008; Marsh *et al.*, 2008), wurde hierbei keine Rücksicht auf die mögliche Gegenwart entsprechender Signalsequenzen genommen. Obwohl die Sequenz des *Strep*-tags mindestens bis zur zweiten Passage im Genom der Virusnachkommen enthalten war, konnte die Expression des *Strep*-tags jedoch weder in der Immunfluoreszenz (Abschnitt 4.3.1) noch im Western-Blot (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Dabei waren der Einsatz eines polyklonalen α -StrepII-Antikörpers (Abschnitt 2.9) sowie des

monoklonalen *Strep*MAB-Classic (IBA, Göttingen) erfolglos. Ein Grund hierfür könnte das Auftreten posttranslativ Modifikationen des *Strep*-PB2-Fusionsprotein gewesen sein, in deren Folge das *Strep*-tag vom N-Terminus abgespalten wurde. Außerdem ist die Bildung von Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene im Zusammenhang mit einer N-terminalen Insertion von kleinen Peptidtags beschrieben, durch die die ribosomale Bindung und damit auch die Translation des Fusionsproteins beeinflusst werden (Waugh, 2005). Eine andere Erklärung könnte darin bestehen, dass bei der Herstellung einiger kommerziell erhältlicher α -*Strep*-Antikörper das *Strep*-tag inklusive des Serin-Alanin-Linkers vor der *Strep*-Sequenz (Abschnitt 4.2) als Immunogen diente. Dies ist für den α -*Strep*-Antikörper von IBA, aber nicht für den α -*Strep*-Antikörper von GenScript aus dem Hersteller-Datenblatt ersichtlich. Gemäß IBA reduziert sich die Affinität zum Antigen, wenn eine andere Sequenz als die des Serin-Alanin-Linkers vor das *Strep*-tag eingefügt wird (IBA, Göttingen). Im Zuge der Konstruktion von Hk68-N-*Strep*-PB2 und R65m-N-*Strep*-PB2 wurde der Linker jedoch zwischen *Strep*-tag und Protein inseriert. Eventuell könnte dies einen Einfluss auf die Antigenerkennung durch beide α -*Strep*-Antikörper gehabt haben. Da die N-*Strep*-PB2-Mutanten zudem einen erheblichen Wachstumsnachteil den ungetaggen Viren gegenüber aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurden sie nicht für die Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt.

5.1.2 Aufreinigung viraler RNP-Komplexe mittels Affinitätschromatographie

Die im Folgenden vorgestellten Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden exemplarisch anhand der R65m-C-*Strep*-PB2-Mutante durchgeführt. Zur Aufreinigung viraler RNP-Komplexe wurden die Zelllinien A549 und DF1 verwendet. A549-Zellen leiten sich von humanen Lungeneithelzellen ab und kommen den natürlichen Zielzellen von Influenza-A-Viren im Säuger sehr nahe (Rimmelzwaan *et al.*, 2004; Vester *et al.*, 2009). Die DF1-Zellen gehen auf Hühner-Fibroblastenzellen zurück und gelten als ein geeignetes *in vitro* Infektionsmodell für aviäre Influenza-A-Viren (Lee *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Wachstumskinetiken konnte gezeigt werden, dass das R65m-Virus und seine C-*Strep*-PB2-Mutante gleichwertig und zu hohen Titern auf den A549- und DF1-Zellen replizieren (Abbildung 4.4, Abschnitt 4.3.2). Dies ist nicht ungewöhnlich, da es sich bei dem R65-Wildtyp um ein Virus handelt, welches für diverse Vogel- und auch Säugetierspezies hochpathogen ist (Klopfleisch *et al.*, 2007).

Aufgrund des guten Wachstums des R65m und R65m-C-Strep-PB2-Virus konnten die für die Proteinreinigung eingesetzten Zellen problemlos mit einer MOI von 5 infiziert werden. So wurde sichergestellt, dass nahezu jede Zelle infiziert und eine maximale Ausbeute an vRNP-Komplexen erreicht werden konnte. Die Aufreinigung der vRNP-Komplexe erfolgte 6 h nach Infektion. Die Inkubationsdauer sollte möglichst innerhalb eines Infektionszyklus liegen, der für Influenza-A-Viren in der Regel 6-8 h beträgt (Martin und Helenius, 1991; Takeda *et al.*, 2002; Matrosova *et al.*, 2003b).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase der Influenza-A-Viren bildet zusammen mit der an Nucleoproteine gebundenen viralen RNA virale Ribonukleoprotein-Komplexe. Jeder vRNP-Komplex stellt dabei ein NP-bedecktes RNA-Segment dar, das mit einem Polymerase-Komplex – bestehend aus den Untereinheiten PB2, PB1 und PA (Palese und Shaw, 2006) – assoziiert ist (Klumpp *et al.*, 1997; Ortega *et al.*, 2000; Martin-Benito *et al.*, 2001; Jorba *et al.*, 2007).

Mittels Affinitätschromatographie war es möglich, virale RNP-Komplexe aus den Zellextrakten infizierter A549- und DF1-Zellen zu isolieren. So wurden in der MALDI-tof-Analyse zusätzlich zu dem PB2-Protein die zwei weiteren Polymerase-Untereinheiten PB1 und PA identifiziert. Wie aus den in Abbildung 4.7 und 4.8 dargestellten Proteinreinigungen hervorgeht (Abschnitt 4.4), schien das molare Verhältnis der Polymerase-Untereinheiten äquivalent gewesen zu sein. Es ist also davon auszugehen, dass der überwiegende Anteil des in den infizierten Zellen zum Zeitpunkt der Ernte (6 h p. i.) exprimierten PB2 im Komplex mit PB1 und PA vorlag. Weiterhin wurde das Nucleoprotein als Bestandteil der aufgereinigten Protein-Komplexe nachgewiesen. Das molare Verhältnis der einzelnen Polymeraseproteine zum NP liegt je nach Größe des RNA-Segmentes zwischen 1:37 und 1:97, da ein NP-Molekül an ca. 24 Nt virale RNA bindet (Ortega *et al.*, 2000). Das durchschnittliche Mengenverhältnis der Polymerase-Untereinheiten zum NP in den aufgereinigten Proteinfractionen ist jedoch von der Anzahl jedes individuellen Segmentes in den infizierten Zellen abhängig. Laut Smith und Hay (1982) unterscheiden sich die Mengen der einzelnen RNA-Segmente in der infizierten Zelle voneinander, wohingegen Enami *et al.* (1985) von äquimolaren Mengen, zumindest zu einem späten Infektionszeitpunkt, ausgehen. Das reale Mengenverhältnis der Polymerase-Proteine zum NP in den von der Streptactin-Säule eluierten Protein-Fractionen kann aus den Coomassie- und Silber-Gelen (Abbildung 4.7 und 4.8; Abschnitt 4.4) nicht

hergeleitet werden, da keine quantitativen Messungen durchgeführt wurden. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass nicht nur vRNP-Komplexe sondern ebenfalls vRNP-unabhängige Polymerase-Komplexe (3P) mit Hilfe des PB2-Fusionsprotein aufgereinigt wurden. Die Existenz löslicher Polymerase-Komplexe in infizierten Zellen, die zudem dazu in der Lage sein können, zu oligomerisieren (Jorba *et al.*, 2008a), ist bekannt (Detjen *et al.*, 1987).

Neben dem NP-Volllängenprotein wurden bei verschiedenen Aufreinigungen zwei NP-Fragmente unterschiedlicher Größe identifiziert. In der Literatur finden sich keine Aufzeichnungen über funktionelle, verkürzte NP-Proteine. Möglicherweise handelt es sich hierbei um unvollständige Translationsprodukte oder eine beginnende Degradation der Proben durch Proteasen trotz Zugabe eines Protease-Inhibitors in den Zelllysispuffer.

Insgesamt war die Ausbeute der isolierten Proteinkomplexe hoch genug, um die einzelnen vRNP-Proteinbestandteile durch MALDI-tof eindeutig nachweisen zu können. Somit waren die Zusammensetzung des Zelllysispuffers (Abschnitt 2.14.3) sowie die Pufferbedingungen des Streptactin-Waschpuffers für eine Aufreinigung intakter makromolekularer Proteinkomplexe geeignet. Trotz allem bedürfen die zur Anwendung gekommenen Methoden einer weiteren Optimierung. Dabei können verschiedene Parameter verändert werden: Variation von Zellzahl, Inokulum und Infektionsdauer, Testen anderer Extraktionsmethoden, Anpassung des Waschpuffers zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes bei gleichzeitiger Erhaltung spezifischer Protein-Interaktionen. Zudem könnten alternative Techniken zur Proteinfällung wie eine Fällung mit organischen Lösungsmitteln erprobt werden, da bei der TCA-Fällung oftmals Verluste beobachtet wurden.

Die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte mit kolloidalem Coomassie-G-250, dessen Nachweisgrenze etwa 10 ng Protein je Gelbande beträgt (Kang *et al.*, 2002; Dyballa und Metzger, 2009). Die Detektion von Proteinen im Polyacrylamidgel könnte beispielsweise durch die Verwendung von SYPRO Ruby verbessert werden. Die Sensitivität von SYPRO Ruby liegt zwischen 0,25-1 ng Protein je Gelbande und beeinträchtigt die MALDI-tof-Analyse nicht (Invitrogen, Karlsruhe). Für eine optimale Separation der aufgereinigten Protein-Komplexe könnten diese auch in einem 2D-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der Einsatz der SILAC-Methode (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) wäre nach erfolgter Optimierung der vRNP-Reinigung ebenfalls vorstellbar. Die Eignung der SILAC-Methode in Verbindung mit

massenspektrometrischen Analysen zur quantitativen Untersuchung des Wirtszell-Proteoms nach Influenza-A-Infektion konnte bereits gezeigt werden (Coombs *et al.*, 2010; Emmott *et al.*, 2010).

5.1.3 Identifizierung von Interaktionspartnern der viralen RNP-Komplexe

Abgesehen von den viralen Polymeraseproteinen, dem NP und den NP-Fragmenten konnten nach der Protein-Reinigung keine weiteren viralen oder zellulären Interaktionspartner, wie sie u. a. in Tabelle 1.2 (Abschnitt 1.7.2) aufgelistet sind, identifiziert werden. Die beiden Proteine Aktin und α -Actinin, die zusammen mit den *Strep*-getaggtten RNP-Komplexen aus DF1-Zellen aufgereinigt wurden, gingen vermutlich unspezifische Wechselwirkungen mit der Streptactin-Affinitätsmatrix ein. So waren sie ebenfalls in den Proben der ungetaggtten Virus-Kontrolle enthalten. Das Strukturprotein Aktin ist als Interaktionspartner des Nukleoproteins beschrieben und am intrazellulären Transport der vRNP-Komplexe beteiligt (Avalos *et al.*, 1997; Digard *et al.*, 1999). α -Actinin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, das für die Vernetzung der Aktinfilamente zuständig ist (Grazi *et al.*, 1992). Es könnte insofern auch indirekt über Aktin an die Streptactin-Matrix gebunden haben. Dennoch kann es nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Teil des in den aufgereinigten Proteinfractionen vorkommenden Aktins und α -Actinins spezifisch über eine Interaktion mit viralen RNP-Komplexen aus den Extrakten infizierter Zellen isoliert wurde.

Es kann verschiedene Gründe dafür geben, dass im Zuge der durchgeführten Experimente keine vRNP-Interaktionspartner detektiert werden konnten. Einerseits waren die Bedingungen, unter denen die Aufreinigungen stattgefunden haben, noch nicht optimiert (siehe oben). Die zwischen den Polymeraseproteinen und dem NP bestehenden Interaktionen sind sehr stabil (Area *et al.*, 2004) und beruhen auf hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoff-Bindungen und van-der-Waals-Kräften (He *et al.*, 2008). Schwächere oder nur temporäre Wechselwirkungen, wie sie zwischen zellulären bzw. anderen viralen Proteinen und den vRNP-Komplexen bestehen können, sind hingegen empfindlicher und könnten im Verlauf der Herstellung des Zellextraktes oder der Affinitätschromatographie gestört worden sein. So führte zwar der Zusatz von 0,5% NP-40 in den Streptactin-Waschpuffer zu einer Reduktion des unspezifischen Hintergrundes bei der Aufreinigung getaggtter vRNP-Komplexe aus A549-Zellen (Abbildung 4.8; Abschnitt 4.4). Dies ging jedoch womöglich auch zu Lasten spezifischer Interaktionspartner. Eine

Arbeit von Junttila *et al.* (2005) konnte z. B. zeigen, dass die Verwendung eines Waschpuffers mit 0,3% NP-40 anstelle von 0,1% NP-40 die Proteinausbeute erniedrigt. Eine Anpassung der Extraktionsmethode und der Waschbedingungen ist folglich notwendig.

Die Existenz zellulärer Interaktionspartner der viralen RNP-Komplexe und ihre Funktion im viralen Infektionszyklus wurde von diversen Arbeitsgruppen untersucht (Tabelle 1.2; Abschnitt 1.7.2). Die hierbei postulierten Interaktionspartner wurden nach Überexpression der Polymerase-Proteine und eines Influenza-Minigenoms durch Koimmunopräzipitation (Gabriel *et al.*, 2008b) oder Affinitätschromatographie aus transfizierten Zellen isoliert (Digard *et al.*, 1999; Engelhardt *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2007; Jorba *et al.*, 2008b). Diese Methoden sind jedoch sehr artifiziell. Die Verwendung rekombinanter Viren mit einem Affinitätstag in einer der Polymerase-Untereinheiten erscheint geeigneter (Jorba *et al.*, 2008b).

Es gibt noch weitere Ansätze, die Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Anpassung von Influenza-A-Viren an einen neuen Wirt unabhängig von einer Interaktion mit zellulären Faktoren geben könnten. Eine Theorie bezieht sich auf das Phänomen der „Codon-Usage“ (Wong *et al.*, 2010). Demnach werden bestimmte Codonvarianten von verschiedenen Wirtsspezies mit unterschiedlicher Häufigkeit bzw. bevorzugt verwendet. Das Vorhandensein der von einer Wirtszelle bevorzugten Codons kann die Translation der viralen Proteine und auf diese Weise den gesamten viralen Replikationszyklus beeinflussen. „Codon Usage“ könnte somit eine wichtige Rolle für die Adaptation und die Virulenz von Influenza-A-Viren spielen (Wong *et al.*, 2010).

Eine Studie von Brower-Sinning *et al.* (2009) konnte wiederum zeigen, dass die strukturelle Stabilität der für die Polymerase-Untereinheiten und NP kodierenden RNA-Segmente einen Einfluss auf die Fitness, Replikation und Übertragung von Influenza-A-Viren nehmen kann. Die RNA-Stabilität wird durch die freie Faltungsenthalpie bestimmt und ist unabhängig von der „Codon Usage“ und Aminosäuresequenz. Sie ist zudem für humane Influenza-Viren höher als für aviäre Viren und steht in enger Verbindung mit der Körpertemperatur des Wirtes (Brower-Sinning *et al.*, 2009).

Die meisten Studien zum Wirtswechsel und der Adaptation von Influenza-A-Viren befassen sich mit der Untersuchung von Punktmutationen in den P-Genen und im NP sowie deren Auswirkung auf die Interaktion mit zellulären Proteinen oder untereinander.

Möglicherweise ist es aber eine Kombination der verschiedenen zuvor aufgeführten Faktoren, die diesen Prozessen zu Grunde liegen.

5.1.4 Einsatz der *Strep*-tag-Technologie für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Die affinitätschromatographische Aufreinigung viraler Ribonukleoprotein-Komplexe mit Hilfe des am C-Terminus von PB2 eingefügten *Strep*-tag II war erfolgreich und effizient (Abschnitt 5.1.2). Die Frage, die sich anhand der bisher dargestellten Ergebnisse und der bekannten Literatur jedoch stellt, ist, ob sich die *Strep*-tag-Technologie tatsächlich als Screening-Methode für die Detektion wirtsspezifischer Interaktionspartner der viralen RNP-Komplexe von Influenza-A-Viren eignet. Hochdurchsatz-Studien zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Affinitätstags sind hauptsächlich auf Proteine ausgelegt, die zu ausreichenden Mengen in der Zelle produziert werden (von Mering *et al.*, 2002). Der Nachweis von Interaktionspartnern, die in geringen Mengen in der Zelle vorliegen oder nur transient interagieren, ist schwierig. Entweder kann nicht genügend Material für eine zuverlässige Identifizierung erhalten werden oder die Dissoziationsgeschwindigkeit vom Proteinkomplex ist zu hoch (Berggard *et al.*, 2007). Aktuellere Methoden wie ein RNAi-Screening nach Genen, deren Ausschaltung die Replikation der Influenza-A-Viren beeinflussen (Karlis *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010), könnten besser geeigneter sein. Produkte solcher Kandidatengene könnten anschließend gezielt durch Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe von Affinitätstags untersucht werden.

5.2 Adaptive Punktmutationen im PB1

Die Entstehung des pandemischen Influenza-Virus von 1968 (Hk68) geht auf ein Reassortment zwischen einem damals zirkulierenden humanen H2N2-Stamm und einem aviären H3-Stamm zurück. Sowohl das HA- als auch das PB1-Gen des aviären Virus wurden dabei in den humanen Stamm integriert (Scholtissek *et al.*, 1978; Fang *et al.*, 1981; Kawaoka *et al.*, 1989). Ein ähnliches Szenario spielte sich bereits zuvor bei der Entstehung des pandemischen H2N2-Virus von 1957 ab (Abschnitt 1.4). Daher wurde postuliert, dass ein aviäres PB1 einen Replikationsvorteil gegenüber einem humanen PB1 aufweisen könnte (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009).

Es ist bekannt, dass das Vorhandensein oder der Erwerb von Mutationen an bestimmten Positionen in den Polymeraseproteinen eine Auswirkung auf die Interaktion mit viralen und auch zellulären Proteinen haben kann und auf diese Weise die Virulenz eines Stammes oder dessen Adaptation an einen neuen Wirt begünstigt. Beispiele hierfür sind die Mutationen PB2 E627K und PB2 D701N (Abschnitt 1.6.2). Für das PB1 konnten zwar ebenfalls Punktmutationen identifiziert werden, wie PB1 Y436H, PB1 (M/V)317I, PB1 L13P und PB1 S678N (Katz *et al.*, 2000; Gabriel *et al.*, 2005; Hulse-Post *et al.*, 2007; Lycett *et al.*, 2009), die einen Einfluss auf die Virulenz des untersuchten Influenza-Virus ausüben. Die Identifizierung einer wirtsspezifischen PB1-Mutation, die zu einer gesteigerten Replikation des hoch-pathogenen SC35M-Virus vom Subtyp H7N7 in Säugerzellen, aber nicht in Vogelzellen führte, war bisher nur für PB1 L13P eindeutig möglich (Gabriel *et al.*, 2005).

5.2.1 Einfluss der Mutation PB1-12I/V auf die Polymeraseaktivität humaner und aviärer Polymerase-Komplexe

Der Eintrag eines aviären PB1 beim Entstehen der beiden pandemischen Viren von 1957 und 1968 wirft die Frage auf, ob dazu adaptive Mutationen im PB1-Segment erforderlich waren, um effizient im Mensch replizieren zu können (Taubenberger und Kash, 2010).

Als aviäres Donor-Virus der Hk68-Reassortante wird ein Virus eurasischer Abstammung angesehen (Wright *et al.*, 2001). Das Virus A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) (dUk) ist einer der wenigen bekannten vor 1968 zirkulierenden Vertreter dieser Linie. Sequenzanalysen zeigen, dass das dUk-Virus als Hk68-Donor gedeutet haben könnte (Fang *et al.*, 1981). Um zu testen, ob die PB1-Proteine des aviären dUk- und humanen Hk68-Virus eine ähnlich gute Polymerase-Aktivität in humanen Zellen aufweisen, wurden *in vitro* homologe (alle P-Gene und NP von Hk68 oder von dUk) und heterologe (PB2, PA, NP von Hk68 und PB1 von dUk) RNP-Komplexe in Säugerzellen durch Transfektion rekonstituiert. Bei der Bestimmung der Polymerase-Aktivität, die anhand eines *Firefly*-Luciferase-Gens als Reporter erfolgte, wurde eine 50%ige Erniedrigung der Polymerase-Aktivität des heterologen Hk68/dUk-PB1-Komplexes im Vergleich zum homologen Hk68-Polymerase-Komplex gemessen (Abbildung 4.9; Abschnitt 4.5.2). Dies steht nicht im Widerspruch zu den Studien von Naffakh *et al.* (2000), die eine effiziente Replikation eines aviären PB1 im Komplex mit dem PB2, PA und NP eines humanen Stammes in Säugerzellen beobachten konnten. Eine Aussage über die Effizienz kann nur in Form eines Vergleiches angegeben

werden. So ist es durchaus möglich, dass der heterologe Polymerase-Komplex Hk68/dUk-PB1 effizienter ist als der Polymerase-Komplex mit dem PB1 des humanen Hk68-Donors vom Subtyp H2N2. Dies wurde bislang nicht untersucht.

Die Polymerase-Aktivität des *in vitro* rekonstituierten homologen dUk-RNP-Komplexes war in Säugerzellen gegenüber dem homologen Hk68-Komplex um das 50fache reduziert. Eine nur geringe Aktivität aviärer Polymerase-Komplexe in Säugerzellen ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Gabriel *et al.*, 2008b; Resa-Infante *et al.*, 2008; Moncorge *et al.*, 2010). Diese könnte entweder auf die Anwesenheit eines inhibitorischen Faktors (Mehle und Doudna, 2008) oder auf die Abwesenheit eines positiven Kofaktors in Säugerzellen zurück zu führen sein (Moncorge *et al.*, 2010). Ebenso könnte aber auch die Assoziation des aviären dUk-Polymerase-Komplexes mit dem Nukleoprotein in den Säugerzellen beeinträchtigt gewesen sein (Labadie *et al.*, 2007; Rameix-Welti *et al.*, 2009). Weiterhin deuten die Daten der Polymerase-Aktivitäts-Tests darauf hin, dass adaptive Mutationen im PB1 des aviären Donors des pandemischen Hk68-Virus notwendig sein könnten, um eine effizientere Replikation der Reassortante im Säuger zu vermitteln. So konnte hier gezeigt werden, dass das Einfügen einer einzelnen Punktmutation, PB1 I12V, genügte, um die Polymerase-Aktivität des heterologen Hk68/dUk-PB1-Komplexes der des homologen Hk68-Komplexes anzugleichen. Auf der anderen Seite resultierte die Rückmutation PB1 V12I im Hk68-PB1 in einer um die Hälfte reduzierten Polymerase-Aktivität des homologen Hk68-Komplexes (Abbildung 4.9; Abschnitt 4.5.2). Aufgrund der hohen Fehlerrate der viralen Polymerase und dem hohen Selektionsdruck, unter dem die Influenza-A-Viren stehen (Boivin *et al.*, 2010), treten häufig Punktmutationen in den viralen Gen-Segmenten auf. Infolgedessen stellt ein Wildtyp-Isolat eine Quasispezies bzw. ein Gemisch aus mehreren Subpopulationen dar, die sich in verschiedenen Punktmutationen unterscheiden (Lauring und Andino, 2010). Ob die PB1 I12V Mutation in einer solchen Subpopulation des aviären Hk68-Donors bereits vorhanden war oder erst nach dem Wirtswechsel auftrat, kann deshalb im Nachhinein nicht geklärt werden.

Die übrigen untersuchten Punktmutationen (Tabelle 4.4; Abschnitt 4.5.1) hatten mit Ausnahme der Mutationen PB1 K121R und PB1 L212V, die die Aktivität des heterologen Hk68/dUkPB1-Komplexes um jeweils ca. 25 Prozentpunkte erhöhten, keinen im Luciferase-Test nachweisbaren Effekt auf die Polymerase-Aktivität. Möglicherweise sind sie ohne biologische Bedeutung. Ein Einfluss auf die „Codon-Usage“, RNA-

Sekundärstruktur oder die Verpackungssignale (Fujii *et al.*, 2005; Brower-Sinning *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010) ist jedoch nicht auszuschließen.

Die Erhöhung der Polymerase-Aktivität nach Einfügen der PB1 I12V Mutation in den Polymerase-Komplex des pandemischen H1N1-Virus bzw. die Erniedrigung der Polymerase-Aktivität nach Einfügen der Mutation PB1 V12I in den R65-Polymerase-Komplex (Abbildung 4.10; Abschnitt 4.5.2), impliziert einen generellen, Virusstamm-übergreifenden Einfluss der Aminosäure-Position 12 im PB1-Protein auf die Virusreplikation. Hierbei könnte eventuell ein Zusammenhang mit einer veränderten PA-Interaktion bestehen (Abschnitt 5.2.2). Interessant ist zudem, dass der Ersatz des PB1 im Polymerasekomplex des pandemischen H1N1-Virus durch das dUk-PB1 zu einer sechsfachen Steigerung der Aktivität führte, welche durch den Austausch PB1 I12V sogar noch weiter erhöht werden konnte. In diesem Fall scheint die Theorie, dass ein aviäres PB1 gegenüber einem humanen PB1 einen Replikationsvorteil aufweist (Naffakh *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009), zuzutreffen. Andererseits stammen die für die Polymerase-Proteine PB2 und PA kodierenden Segmente der pandemischen H1N1-Reassortante von aviären Schweineviren, während das PB1-Segment von einem humanen H3N2-Virus stammt (Neumann *et al.*, 2009). Anscheinend kooperiert das aviäre PB1 des dUk-Virus besser mit den ursprünglichen aviären PA- und PB2-Proteinen des pandemischen H1N1-Virus als das humane H3N2-PB1. Dies würde auch mit den Daten von Naffakh *et al.* (2000) übereinstimmen, die einen solchen Effekt anhand heterologer Polymerase-Komplexe des humanen Laborstammes PR8 und einem aviären H7N1-Virus beschreiben. Ob sich die erhöhte Polymerase-Aktivität des heterologen H1N1/dUk-PB1-Komplexes in gleichem Maße auf die Virulenz des pandemischen H1N1-Virus auswirken würde, müsste mit Hilfe einer entsprechenden Reassortante *in vivo* untersucht werden. So wurde beispielsweise in einer Reassortment-Studie, bei der das PB1 und die HA und NA Segmente eines HPAIV H5N1-Virus mit den internen Genen eines humanen H3N2-Stammes kombiniert wurden, eine höhere Virulenz im Mausmodell dokumentiert – verglichen mit einer Reassortante, bei der nur die aviären Segmente für HA und NA in das humane Virus integriert wurden (Chen *et al.*, 2008b).

Die Wachstumskinetiken der Virusreassortanten und Virusmutanten im Vergleich zum Hk68- und dUk revers-genetischen Wildtyp lassen keine eindeutigen Schlüsse über den

Einfluss der PB1 I12V Punktmutation auf die Polymeraseaktivität zu (Abbildung 4.11; Abschnitt 4.5.3). Zum einen führte die Mutation PB1 V12I an einem frühen Infektionszeitpunkt zu einer minimalen Replikationssteigerung der homologen Hk68-Mutante. Zum anderen bewirkt dies die PB1 I12V Mutation bei der Hk68/dUk-PB1-Reassortante ebenfalls. Letztere verhält sich auf den A549-Zellen trotz der im Polymerase-Test gemessenen 50%igen Aktivitätserniedrigung (Abbildung 4.9; Abschnitt 4.5.2) wie das homologe Hk68-Virus. Valin an PB1-Position 12 im dUk-Virus hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Virusreplikation.

Ob Isoleucin oder Valin an PB1-Position 12 in A549-Zellen vorteilhafter ist, kann aus diesen Daten folglich nicht geschlossen werden. Die Möglichkeit, dass eine der anderen untersuchten Punktmutationen (Tabelle 4.4; Abschnitt 4.5.1) zusammen mit Aminosäure-Position 12 eine funktionelle Rolle spielt, müsste mit Hilfe entsprechender Mutanten eingehender untersucht werden. Abwegig ist diese Hypothese allerdings nicht, da die Punktmutationen jeweils in Domänen wie der cRNA- oder vRNA-Bindedomäne des PB1-Proteins lokalisiert sind. Vor allem die Mutation PB1 L212V wäre ein vielversprechender Kandidat. Sie hatte einerseits einen signifikanten Effekt auf die Polymerase-Aktivität (s.o.). Andererseits befindet sie sich in direkter räumlicher Nähe zu einem NLS, was aus Darstellungen zur Domänenstruktur der Polymeraseproteine abgeleitet werden kann (Toyoda *et al.*, 1996; Ohtsu *et al.*, 2002; Boulo *et al.*, 2007). Eine modifizierte Wechselwirkung mit Importproteinen, im Fall von PB1 also RanBP5 (Deng *et al.*, 2006), ist hiermit denkbar. Dass eine verbesserte Virusreplikation in Säugerzellen mit einer erleichterten Rekrutierung der Polymerase-Untereinheiten in den Kern zusammenhängt, konnte bereits anhand der Mutation PB2 D701N gezeigt werden (Gabriel *et al.*, 2008b).

Des Weiteren ist auffallend, dass die revers-genetischen Hk68- und dUk-Viren nahezu äquivalent auf den A549-Zellen replizieren, was aufgrund der Wirtsspezifität der beiden Viren nicht den Erwartungen entsprach. Möglicherweise ist die A549-Zelllinie nicht geeignet, um die eventuell vorhandenen Wachstumsunterschiede der Viren deutlich aufzuzeigen. Eine Alternative könnte z. B. die Verwendung primärer Zellen wie humane, *in vitro* differenzierte, tracheobronchiale Epithelzellen (HTBE) sein, deren Eignung als Infektionsmodell für Influenza-A-Viren in Reassortment- und Virulenz-Studien bereits getestet wurde (Chen *et al.*, 2008b).

5.2.2 Einfluss der Mutation PB1-12I/V auf die PA-Bindung

Die Mutation PB1 I12V liegt im Bereich der PA-Bindungsdomäne des PB1-Proteins, die am äußersten N-Terminus lokalisiert ist (Perez und Donis, 1995; Perez und Donis, 2001). Dabei binden kristallographischen Untersuchungen zufolge die PB1-Aminosäuren 5-11 in Form einer 3_{10} -Helix an die C-terminale PA-Domäne (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). Gemäß einer neueren Studie könnte die Kernsequenz der PA-Bindungsdomäne im PB1 sogar auf die Aminosäuren 2-12 ausgedehnt werden (Wunderlich *et al.*, 2010). Eine durch die PB1 I12V-Mutation hervorgerufene veränderte Polymerase-Aktivität könnte daher unter Umständen mit einer veränderten PA-Interaktion verbunden sein. So konnten He *et al.* (2008) beispielsweise zeigen, dass die Mutation bestimmter Aminosäure-Reste im PB1, wozu V3, N4, P5, L7, L8, F9 und L10 zählen, den Verlust von mindestens zwei Dritteln der PA-Bindungsaffinität hervorrufen und die Polymerase-Aktivität sowie Virusvermehrung signifikant verringern. Im Gegensatz dazu hatten die Mutationen PB1 D2V und PB1 A14D eine Unterbindung der Polymerase-Aktivität zur Folge, ohne dass die PA-Bindung beeinträchtigt wurde (He *et al.*, 2008).

Im Verlauf der hier durchgeführten PA-Bindungstests nach Wunderlich *et al.* (2009) konnte lediglich eine tendenzielle Affinitätssteigerung der PA-Proteine des Hk68- und pandemischen H1N1-Virus zum PB1 1-15 Peptid mit Isoleucin anstelle von Valin an Position 12 detektiert werden (Abbildung 4.12; Abschnitt 4.5.4). Für das dUk-PA können hingegen keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden. Die Proteinexpression war in den Säugerzellen nur gering, so dass wahrscheinlich nicht genügend HA-getaggtetes PA-Protein zur Verfügung stand, um in detektierbaren Mengen an die PB1-Peptide zu binden. Zudem zeigte das Hk68-PA im Vergleich zum PA des pandemischen H1N1-Virus eine erheblich niedrigere Affinität zu den PB1 1-15 Peptiden. Eine Beeinträchtigung der Proteinstruktur durch den HA-tag ist unwahrscheinlich, da die Affinität zum PB1 1-25-Konsensuspeptid vergleichbar zum H1N1-PA war. Gemäß Ghanem *et al.* (2007) genügen die N-terminalen 25 Aminosäuren im PB1-Protein für eine effiziente PA-Interaktion. Zudem konnte eine nur geringfügig niedrigere Affinität von N-terminal verkürzten PB1-Peptiden mit einer Länge von 15 Aminosäuren zum PA gezeigt werden (Wunderlich *et al.*, 2009). Unter Umständen sind für eine effizientere Interaktion mit dem PA des Hk68-Virus mehr als die N-terminalen 15 PB1-Aminosäuren notwendig.

Anhand der bisherigen Ergebnisse wird deutlich, dass Isoleucin bzw. Valin an Aminosäure-Position 12 im PB1-Protein einen differenziellen Einfluss auf die Polymerase-Aktivität verschiedener Influenza-A-Viren in Säugerzellen ausüben. Um die Mutation PB1 I12V im Hk68-PB1 mit Sicherheit als adaptive Mutation zu identifizieren, sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig. So könnten z. B. zusätzlich zu den Luciferase-Tests als Messgröße der Polymerase-Aktivität „Primer-extension-Assays“ durchgeführt werden. Mit diesen könnte gezeigt werden, ob die PB1 I12V Mutation einen Einfluss auf die mRNA-, cRNA- oder vRNA-Synthese nimmt (Fodor *et al.*, 1998; Vreede *et al.*, 2004). Des Weiteren könnten die *in vitro* Studien auf aviären DF1-Zellen durchgeführt werden. Auf diese Weise könnte man überprüfen, ob eine erhöhte PB1 I12V-vermittelte Polymerase-Aktivität in Säugerzellen mit einer reduzierten Polymerase-Aktivität in Vogelzellen einhergeht. HTBE-Zellen als ein geeigneteres Modell für den Vergleich des Wachstums der revers-genetischen Wildtyp-Viren sowie der entsprechenden PB1-Mutanten und Reassortanten wurden bereits vorgeschlagen (s.o.). Beim Sequenzvergleich des Hk68-PB1 und dUk-PB1 wurden 132 Nukleotidunterschiede dokumentiert, von denen nur 6 zu einem Aminosäure-Austausch führten. Mit Hilfe von Chimären zwischen dem Hk68-PB1 und dem dUk-PB1 könnte zusätzlich untersucht werden, ob die nicht-synonymen Mutationen mit der höheren Polymerase-Aktivität des Hk68-Virus gegenüber dem heterologen Hk68/dUk-PB1-Komplex z. B. aufgrund einer differenziellen „Codon-Usage“ in Zusammenhang stehen.

Es existieren verschiedene Studien zur Identifizierung adaptiver Punktmutationen im PB1-Protein. Diese basieren entweder auf Sequenzvergleichen (Naffakh *et al.*, 2000; Taubenberger *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2006; Miotto *et al.*, 2010), phylogenetischen Analysen (Tamuri *et al.*, 2009) oder der *in vitro* Adaptation eines aviären Influenza-Stammes an Säugerzellen (Gabriel *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010a). Dabei wurden insgesamt 17 verschiedene Mutationen vorgeschlagen, die potentiell bei der Anpassung von Influenza-A-Viren an den Säuger eine Rolle gespielt haben könnten. Lediglich eine dieser Punktmutationen, PB1 K327R (Chen *et al.*, 2006), stimmte mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutationen überein, hatte allerdings im Polymerase-Test keinen signifikanten Einfluss auf die Polymerase-Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass adaptive Mutationen nicht nur wirtsspezifisch sondern vor allem auch Virusstamm-spezifisch auftreten können.

5.3 Impfstudien

Die Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen aviäre Influenza-A-Viren ist ein dringliches Anliegen (Abschnitt 1.9.2.5). Hierbei steht nicht nur die Wirksamkeit der Vakzine selbst sondern auch eine praktikable Applikation im Vordergrund (Swayne und Kapczynski, 2008). Zusätzlich soll der Einsatz von Impfstoffen dazu dienen, Infektionsketten zu unterbrechen und damit zur Eindämmung der Virusausbreitung beizutragen (Lee und Suarez, 2005).

Lebendimpfstoffe besitzen gegenüber inaktivierten Vollvirus-Präparationen bzw. Totimpfstoffen verschiedene Vorzüge (Abschnitt 1.9.2.2). Für das Geflügel konzipierte Lebendimpfstoffe, die z. B. auf einer Deletion im NS1-Protein oder auf Mutationen in den Polymerase-Proteinen beruhen und demnach *in vivo* einen attenuierten Phänotyp aufweisen, wurden bisher nur zu Forschungszwecken in der Maus oder an SPF-Hühnern getestet (Song *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Steel *et al.*, 2009). Zudem wurde das Konzept einer HA-Spaltstellenmutante als eine alternative lebend-attenuierte Vakzine gegen porcine Influenza-A-Viren im Schwein sowie gegen das Maus-virulente WSN-Virus und das hoch-pathogene SC35M im Mausmodell erprobt (Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009b). Weiterhin ist eine Elastase-abhängige, Trypsin-resistente H7N7-Mutante beschrieben, deren protektive Wirkung nach intratrachealer Applikation gegen eine Belastungsinfektion mit dem HPAIV SC35 im Huhn untersucht wurde (Orlich *et al.*, 1995).

Bei der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Spaltstellenmutante handelt es sich um das erste Elastase-abhängige, von einem HPAIV abstammende Virus, dessen Attenuierung und Protektivität nach okulonasaler und *in ovo* Applikation im Huhn eingehend untersucht und dokumentiert wurde.

5.3.1 Herstellung einer *in vivo* attenuierten HPAIV-Spaltstellenmutante

Mittels reverser Genetik wurde eine Elastase-abhängige sowie Trypsin- und Furin-unabhängige Variante des HPAIV A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) generiert. Im Gegensatz zu vorhergehenden Studien (Stech *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009a) war jedoch der Austausch der ursprünglichen Spaltstelle gegen ein Alanin oder Valin als Elastase-Erkennungssequenz nicht ausreichend, um replikationsfähiges Virus zu erzeugen. Da für eine effektive HA-Spaltung durch Furin die Anpassung umliegender HA-Bereiche notwendig zu sein scheint (Gohrbandt *et al.*, 2010), wurde in das R65-HA

zusätzlich zu einem Alanin als Elastase-Spaltstelle die Spaltstellenumgebung der von Gabriel *et al.* (2008) generierten Elastase-abhängigen SC35M_H-E-Mutante eingefügt (Abbildung 4.13; Abschnitt 4.6). Die auf diese Weise erhaltene R65-E-Mutante konnte *in vitro* in Gegenwart von Elastase zu hohen Titern vermehrt werden (Abbildung 4.15; Abschnitt 4.7). Die von Gohrbandt *et al.* (2010) aufgestellte Theorie der Anpassung der Spaltstellenregion für eine effektive HA-Spaltung trifft demnach nicht nur auf den Erwerb einer polybasischen HA-Spaltstelle zu, sondern kann im Fall des R65-Virus auch auf das Einfügen einer artifiziellen Elastase-Spaltstelle im Haemagglutinin übertragen werden.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Stech *et al.* (2005), Gabriel *et al.* (2008a) und Masic *et al.* (2009a) war die R65-E-Mutante streng Elastase-abhängig und replizierte nicht in Gegenwart von Trypsin oder in Abwesenheit einer von außen bereitgestellten Protease. Dies wurde anhand von Plaquetests, Wachstumskinetiken und Western-Blot-Analysen verifiziert (Abbildungen 4.14 - 4.16; Abschnitt 4.7).

Für eine Reversion der Elastase-abhängigen R65-E-Spaltstelle zur Trypsin-abhängigen Spaltstelle genügen zwei Nukleotid-Substitutionen, die zum Austausch von Alanin gegen Lysin oder Arginin an Position P1 vor dem Fusionspeptid führen. Die in Zellkultur bestimmte Reversionsfrequenz lag für die R65-E-Mutante mit 1 von 5×10^8 Viruspartikeln (Abschnitt 4.7.4) um ein Zehnfaches niedriger als für das Elastase-Virus WSN-E (Stech *et al.*, 2005). Die R65-E-Mutante schien somit *in vitro* weitgehend stabil zu sein. Interessanterweise wiesen die zwei isolierten R65-E-Revertanten ein Lysin an Position P1 der HA-Spaltstelle auf, obwohl sich im HA des R65-Wildtyps ein Arginin an dieser Position befindet (Abbildung 4.17; Abschnitt 4.7.4). Eine mögliche Kontamination des Virusstocks mit monobasischen R65-HA-Varianten ist somit auszuschließen. Während zudem bei der einen Revertante eine Punktmutation an der Spaltstellen-Position wie zuvor beschrieben stattgefunden hat, kam es bei der anderen Revertante zu einer Insertion des Aminosäure-Motivs ‚TCCYSSK‘ zwischen dem Alanin und dem Fusionspeptid. Dieses Motiv kommt bei im Feld zirkulierenden Influenza-A-Viren nicht vor und wurde demnach unter den Selektionsbedingungen erworben. Eine Insertion von Sequenzen in der HA-Spaltstellenumgebung ist für niedrig-pathogene Viren der Subtypen H5 und H7 belegt (Khatchikian *et al.*, 1989; Perdue *et al.*, 1997).

5.3.2 Attenuierung, Immunogenität und Protektivität der R65-E-Mutante *in vivo*

Um die Eignung der R65-E-Mutante als lebend-attenuierte Vakzine zu überprüfen, wurden zwei Impfversuche an White Leghorn Hühnern (SPF) durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Applikationsformen zur Anwendung – eine okulonasale Infektion von Eintagsküken und die *in ovo* Infektion von 18 Tage alten Hühnerembryonen.

Aufgrund der Abwesenheit einer geeigneten Protease zeigte die R65-E-Mutante *in vivo* einen stark attenuierten Phänotyp und unterschied sich damit deutlich von dem parentalen hoch-pathogenen rgR65-Virus. Während nach okulonasaler rgR65-Infektion alle Tiere innerhalb von 48 h starben, kam es nach okulonasaler R65-E-Infektion zu keinen Krankheitserscheinungen und die *in ovo* infizierten Tiere wiesen nach dem Schlupf weder Krankheitssymptome noch Fehlbildungen auf. Außerdem wurde das „Impfvirus“ bei beiden Impfversuchen nicht bzw. in nicht-detektierbaren Mengen ausgeschieden (Abschnitte 4.8.1.1 und 4.8.6.1). Es war allerdings ein positiver Nachweis Influenza-A-Virus-spezifischer RNA in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben der *in ovo* infizierten Tiere am Schlupftag und größtenteils auch an Tag 1 nach Schlupf mittels qRT-PCR möglich (Abbildung 4.27, Abschnitt 4.8.6.1). Dies bestätigt zum einen die gelungene Verabreichung der R65-E-Mutante und deutet darauf hin, dass vermutlich wenigstens ein Replikationszyklus *in ovo* stattgefunden hat. Der Zusatz von Elastase zum Inokulum bei der Infektion von 11 Tage alten Hühnerembryonen mit einer niedrigen Virusdosis (10^3 pfu) führte zur Generierung großer Mengen infektiösen Virus (Orlich *et al.*, 1995). Da die Ct-Werte in den Tupferproben der Tiere der beiden Gruppen R65-E und R65-E+ in einem ähnlichen Bereich lagen, hatte die Zugabe von Elastase bei der *in ovo* Infektion der 18 Tage alten Hühnerembryonen wahrscheinlich jedoch keinen weiteren förderlichen Einfluss auf die Replikation der R65-E-Mutante im Ei.

Die Annahme, dass nach R65-E-Infektion nicht mehr als ein Replikationszyklus *in vivo* stattgefunden hat, wird neben fehlenden Krankheitssymptomen durch die Ergebnisse der Immunhistochemie zum Nachweis von Influenza-Antigen in verschiedenen Organschnitten okulonasal infizierter Tiere unterstützt. So zeigte die negative Immunfluoreszenz von Influenza-NP in den Organschnitten okulonasal R65-E-infizierter Tiere, dass im Gegensatz zum rgR65 keine systemische Ausbreitung der Mutante erfolgt ist (Abbildung 4.18, Abschnitt 4.8.1.2). Dies ist ein weiteres Indiz für die Attenuierung der Spaltstellenmutante *in vivo*.

Die Deletion der polybasischen Spaltstelle im R65-HA reichte demnach aus, um die Transformation des HPAIV in ein nicht virulentes Virus herbeizuführen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer (Horimoto und Kawaoka, 1994; Gohrbandt *et al.*, 2010) und unterstreicht die Rolle des HA als Haupt-Virulenzdeterminante (Abschnitt 1.6.1).

Die R65-E-Mutante induzierte nach okulonasaler Infektion lediglich in einem Tier, das im Alter von 3 Wochen eine zweite Dosis des „Impfvirus“ erhalten hatte (2xR65-E-Gruppe), eine nachweisbare Antikörper-Antwort in Form von Influenza-A-Virus-spezifischem Serum-IgY (IgG-Äquivalent im Huhn). Der 3 Wochen nach dem Boost gemessene H5-spezifische Antikörper-Titer war mit einem Wert von 1:4 sehr niedrig und lag nicht im spezifischen Nachweisbereich (Abschnitt 4.8.2.2). Jedoch muss die Wirksamkeit einer LAIV nicht mit dem Antikörpergehalt im Serum korrelieren (Belshe *et al.*, 2000; Swayne und Kapczynski, 2008). Ebenso konnte 7 Tage nach okulonasaler R65-E-Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren eine prozentuale Zunahme CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils CD4⁺ T-Lymphozyten an der Gesamt-Lymphozytenpopulation in der Milz beobachtet werden (Abbildung 4.19, Abschnitt 4.8.2.1; Anhang 1). Die zelluläre Immunität kann zwar zum Schutz vor einer HPAIV-Infektion beitragen. Zumeist sterben HPAIV-infizierte Tiere jedoch bevor eine adäquate T-Zell-vermittelte Immunantwort aufgebaut wird (Swayne und Pantin-Jackwood, 2006; Swayne und Kapczynski, 2008).

Bei der Untersuchung des Serums der *in ovo* infizierten Tiere wurden ebenfalls nur bei einem Tier, dem zusätzlich zu dem „Impfvirus“ Elastase verimpft wurde (R65-E+-Gruppe), H5-spezifische Antikörper nachgewiesen (Abschnitt 4.8.6.2).

Im Gegensatz zu anderen Elastase-abhängigen Spaltstellenmutanten, die im Mausmodell eine potente humorale sowie mukosale Immunantwort und im Schwein zudem nachweislich eine Zell-vermittelte Immunantwort hervorrufen konnten (Stech *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009b), war die R65-E-Mutante im Huhn nicht ausreichend immunogen, um einen Schutz gegen den homologen rgR65-Challenge zu gewährleisten. Bis auf jeweils 1 von 10 Tieren der 2xR65-E-Gruppe im Impfversuch mit okulonasaler R65-E-Infektion bzw. 1 von 7 Tieren der R65-E+-Gruppe im *in ovo* Impfversuch, bei denen vor der Belastungsinfektion H5-spezifische Antikörper detektiert wurden, waren alle Tiere innerhalb von 48 h bis 96 h nach homologem HPAIV Challenge verstorben (Abbildung 4.20, Abschnitt 4.8.3.1; Abbildung 4.28, Abschnitt 4.8.6.1). Die im

ersten Impfversuch im Alter von drei Wochen mit einer zweiten Dosis R65-E okulonasal infizierten Tiere der 2xR65-E-Gruppe starben im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren und Tieren der 1xR65-E-Gruppe leicht verzögert. Dies könnte unter Umständen mit einer zellulären Immunantwort basierend auf CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen, die eventuell in der Milz 7 Tage nach okulonasaler R65-E-Infektion entstanden sein könnten, in Zusammenhang gestanden haben. CD8⁺ T-Zellen, nicht aber CD4⁺ T-Zellen, konnte beispielsweise eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Virusvermehrung in der Lunge Influenza-A-Virus infizierter Mäuse zugewiesen werden (Allan *et al.*, 1990). Eine Impfstoff-vermittelte Schutzwirkung gegen eine HPAIV-Infektion ist aber primär das Resultat einer humoralen Immunantwort (Chambers *et al.*, 1988; Swayne und Kapczynski, 2008). Dies wurde anhand der in den beiden Impfversuchen einzigen überlebenden Tiere deutlich. Diese entwickelten nach der Belastungsinfektion mit dem HPAIV rgR65 weder für eine Influenza-A-Infektion typische Symptome noch konnte infektiöses Virus aus den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben isoliert werden (Abbildung 4.23, Abschnitt 4.8.4.1; Abbildung 4.29, Abschnitt 4.8.6.3). Influenza-A-Virus-spezifische RNA wurde zwar bei beiden Tieren in den oropharyngealen Tupferproben detektiert. Der Nachweis Influenza-A-Virus-spezifischer RNA in den kloakalen Tupferproben war jedoch negativ, so dass die Replikation des rgR65 vermutlich lokal auf den Respirationstrakt beschränkt blieb und es wahrscheinlich zu keiner systemischen Ausbreitung des Challengevirus kam. Die in den beiden Impfversuchen mit okulonasaler oder *in ovo* R65-E-Infektion jeweils einzigen überlebenden Tiere wiesen erwartungsgemäß 14 Tage p. c. H5-spezifische Antikörper im Serum auf. Hierbei lag der HAH-Titer des *in ovo* mit einer Dosis R65-E infizierten Tieres achtmal höher als der HAH-Titer des im Abstand von drei Wochen zweimal okulonasal R65-E-infizierten Tieres (Abschnitte 4.8.5 und 4.8.6.4). Bei Ersterem wurde an Tag 2 und 4 p. c. eine höhere Konzentration viraler RNA in den oropharyngealen Tupferproben ermittelt. Die Daten sprechen für eine etwas stärkere Replikation des rgR65-Virus in diesem Tier, die dementsprechend zu einer stärkeren Antikörperproduktion führte. Die unterschiedliche Applikationsart von R65-E, die innerhalb von drei Wochen zweimal verabreichte Dosis R65-E bei dem okulonasal infizierten Tier und individuelle Schwankungen könnten ebenfalls für die hohe Differenz verantwortlich gewesen sein.

Bei einigen Tieren der 2xR65-E-Gruppe, die im Alter von sechs Wochen anstelle des homologen rgR65-Virus mit dem heterosubtypischen HPAIV R65-H9_{R66mutR65}-Virus

infiziert wurden, deuten die Krankheitsverläufe und Ausscheidungsdaten auf die Induktion einer zellulären Immunantwort hin. Während alle R65-H9_{R66mutR65}-infizierten Tiere der Kontroll- und 1xR65-E-Gruppe über mehrere Tage krank bis schwer krank waren, bildeten die Tiere der 2xR65-E-Gruppe ein sehr differenziertes Krankheitsbild aus (Abbildung 4.21, Abschnitt 4.8.3.2). So waren nur 50% der Tiere über mehrere Tage hinweg schwer krank, 30% waren krank und 20% vollkommen gesund. Die gesunden Tiere wiesen zudem nur sehr geringe Mengen Influenza-A-Virus-spezifische RNA in den oropharyngealen Tupferproben und keine bzw. nur äußerst geringe RNA-Mengen in den kloakalen Tupfern auf (Abschnitt 4.8.4.2). Eine Ausscheidung von infektiösem Virus konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde das R65-H9_{R66mutR65}-Virus selbst bei den Tieren der Kontroll- und 1xR65-E-Gruppe nicht in hoher Konzentration (TCID₅₀ 3x10²/ml - 10⁴/ml) und nur für kurze Zeit (hauptsächlich Tag 4) ausgeschieden (Abschnitt 4.8.4.2). Das Auftreten neurologischer Symptome bei zwei Tieren der 1xR65-E-Gruppe und einem Kontrolltier spricht für eine systemische Ausbreitung und Neurovirulenz des durch reverse Genetik hergestellten hoch-pathogenen R65-H9_{R66mutR65}-Virus (Gohrbandt *et al.*, in revision).

Da das HA des R65-H9_{R66mutR65}-Virus nicht dem Serotyp des R65-Virus entsprach, kann der partielle bis vollständige Schutz der Tiere der 2xR65-E-Gruppe nicht auf eine Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen das Oberflächenprotein HA zurückzuführen sein, zumal bei den Tieren keine H5-spezifischen Antikörper vor dem Challenge detektiert wurden (Abschnitt 4.8.2.2). Eine Beteiligung NA-spezifischer und M2-spezifischer Antikörper, die ebenfalls zum Schutz vor Influenza-Infektionen beitragen können (McNulty *et al.*, 1986; Sylte *et al.*, 2007; Layton *et al.*, 2009), ist nicht vollkommen auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich, da die R65-E-Mutante überwiegend kaum nachweisbare Mengen Antikörper gegen das HA-Hauptimmunogen induzieren konnte (Abschnitt 4.8.2.2). Eine Zell-vermittelte Immunität scheint die einzig wahrscheinliche Erklärung für die beobachteten Effekte. Sie kann sowohl den Schweregrad als auch die Dauer einer HPAIV Infektion im Huhn begrenzen (Swayne und Kapczynski, 2008), was mit den hier vorgestellten Daten übereinstimmt. Dabei könnten CD8⁺ CTL gerichtet gegen konservierte Epitope im HA und in den übrigen Virusproteinen, die sich zwischen R65-E und R65-H9_{R66mutR65} nicht unterschieden, eine Rolle gespielt haben. So ist die Mitwirkung von CD8⁺ CTL bei der Abwehr von Influenza-Infektionen beschrieben (Mackenzie *et al.*, 1989; Allan *et al.*, 1990; Kuwano *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1999). Die

Auswertung der Blutproben von jeweils drei Tieren pro Gruppe nach heterosubtypischer Belastungsinfektion zeigte allerdings bis auf wenige Ausnahmen eher eine Abnahme des Anteils CD8⁺ CTL an der Gesamt-Lymphozytenpopulation bis Tag 5 p. c. bei den Tieren jeder Gruppe (Abbildung 4.25, Abschnitt 4.8.5). Dieser scheinbare Widerspruch ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass an den Tagen der Blutentnahme in der 2xR65-E-Gruppe Tiere unterschiedlichen Erkrankungsgrades und somit auch nicht-geschützte Tiere beprobt wurden (Abschnitt 4.8.5).

Die systemische Ausbreitung des rgR65-Virus verlief im Vergleich zum R65-H9_{R66mutR65}-Virus deutlich schneller. So waren schon nach zwei Tagen größere Mengen virale RNA mit einem Ct von 28 bis 23 in den oropharyngealen und kloakalen Tupferproben der rgR65 infizierten Tiere nachweisbar (Abbildung 4.22, Abschnitt 4.8.4.1). Auf die R65-H9_{R66mutR65}-infizierten Tiere traf dies hingegen erst an Tag 4 p. c. zu (Abbildung 4.24, Abschnitt 4.8.4.2). Die verlangsamte Virusreplikation könnte die Effektivität der zellulären Immunantwort bei einigen Tieren der 2xR65-E-Gruppe u. a. positiv beeinflusst haben.

Die R65-E-Mutante erfüllte, da sie *in vitro* unter Zugabe von Elastase zu hohen Titern vermehrt werden konnte und *in vivo* attenuiert war, zunächst wesentliche Kriterien einer potentiellen Lebend-Vakzine (Fuchs *et al.*, 2009). Die geringe Reversions-Wahrscheinlichkeit der R65-E-Mutante war eine zusätzliche Eigenschaft, die unter der Voraussetzung der Kombination der Spaltstellenmutation mit anderen attenuierenden Mutationen für den sicheren Einsatz als LAIV *in vivo* sprechen würde. Es ist jedoch unklar, weshalb jeweils nur 1 von 10 okulonasal infizierten Tieren der 2xR65-E-Gruppe und 1 von 7 *in ovo* infizierten Tieren der R65-E+-Gruppe den homologen HPAIV Challenge überlebten. Die R65-E-Mutante rief im Unterschied zu anderen Elastase-abhängigen potentiellen Lebendimpfstoffen (Stech *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009b) sowie anderen gegen H5N1 gerichteten LAIV (Lu *et al.*, 2006; Suguitan *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2009b) überwiegend keine humorale Immunantwort sondern wahrscheinlich nur eine T-Zell-vermittelte Immunität hervor. Dies lässt vermuten, dass R65-E im Huhn überattenuiert war. Die in beiden Impfversuchen jeweils einzigen Tiere mit H5-spezifischen Antikörpern vor dem Challenge könnten mit einer möglichen Reversion der R65-E-HA-Spaltstelle zum monobasischen Spaltmotiv *in vivo* begründet werden. So zeigte eine monobasische R65-Variante R65_{mono}-V-ETR im Huhn nur sehr milde respiratorische Symptome und wirkte protektiv bei homologer rgR65-

Belastungsinfektion, ohne dass es nach dem Challenge zur Ausscheidung von infektiösem Virus kam (Gohrbandt *et al.*, 2010). Dies deckt sich mit den Daten zu den beiden überlebenden Tieren.

Eventuell war die in dieser Arbeit verwendete Dosis von 10^6 pfu zu niedrig für ein LAIV, dessen Replikation *in vivo* strikt auf einen Replikationszyklus beschränkt ist. Bei der Verwendung einer höheren Dosis von beispielsweise 10^7 - 10^8 pfu würden deutlich mehr Zellen infiziert und demzufolge mehr nicht-infektiöse Viruspartikel freigesetzt werden, wodurch wiederum eine effektivere Immunabwehr induziert werden könnte. Andererseits verwendeten Orlich *et al.* (1995) bei ihren Experimenten eine Dosis von nur 10^5 pfu des von SC35 abgeleiteten Elastase-Virus, die zehn Wochen alte White Leghorn Hühner gegen eine homologe HPAIV Belastungsinfektion schützen konnte. Jedoch wurde das Elastase-Virus hierbei wie in der Studie von Masic *et al.* (2009), die Schweine mit einer porzinen Elastase-abhängigen Mutante immunisierten, intratracheal gegeben. Auf diese Weise gelangte das Virus direkt an den natürlichen Ort der Virusreplikation, wo es u. a. eine effektive mukosale Immunantwort induzieren konnte (Masic *et al.*, 2009). Der Weg von Auge und Nasenhöhle in den unteren Respirationstrakt des Huhns war für das R65-E-Virus möglicherweise nicht zurückzulegen, gerade weil es aufgrund der Attenuierung lokal eingeschränkt war. Eine sofortige Eliminierung der infizierten Zellen durch Bestandteile des adaptiven Immunsystems wie Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen oder natürliche Killerzellen, die im Huhn nachweislich vorkommen (Mast *et al.*, 1998; Avakian *et al.*, 2007; Del Cacho *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010b), könnte ebenfalls dem Aufbau einer wirkungsvollen zellulären und humoralen Gedächtnis-Immunantwort entgegen gewirkt haben.

Bei der *in ovo* Infektion könnte es weiterhin zu einer ungewollten Verdünnung des „Impfvirus“ in der Allantoisflüssigkeit gekommen sein, denn eine gezielte Applikation in die Amnionhöhle war selbst bei gleichzeitiger Durchleuchtung der Hühnereier während der Infektion nicht vollends zu garantieren. Eine drastische Abnahme der Effizienz einer *in ovo* Vakzine gegen die Marek'sche Krankheit bei Verabreichung des Impfstoffes in die Allantoishöhle anstelle der Amnionhöhle ist beschrieben (Wakenell *et al.*, 2002). Eine alternative Applikationsform der R65-E-Mutante wie eine intratracheale Infektion wäre demnach zu überlegen, obgleich die *in ovo* Immunisierung als Methode der Wahl bei der Vakzinierung von Geflügel angesehen werden kann. Die Vorteile sind eine automatisierte

Massenapplikation und eine möglicherweise früher einsetzende Immunantwort und bessere Protektivität im Vergleich zur Immunisierung von Eintagsküken (Avakian *et al.*, 2007). So konnte ein effektiver Schutz gegen verbreitete Geflügelkrankheiten wie Marek'sche Krankheit, infektiöse Bursitis und Geflügelpocken nach *in ovo* Immunisierung erreicht werden (Gagic *et al.*, 1999; Coletti *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002). Eine *in ovo* Immunisierung mit einem H5-exprimierenden Adenovirus oder einem Lebend-attenuierten H5-Virus basierend auf attenuierenden Mutationen im PB1, PB2 und NP führten ebenfalls zu erfolgreichen Ergebnissen (Avakian *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007; Toro *et al.*, 2008).

Das Prinzip der Elastase-abhängigen Spaltstellenmutante als potentielle LAIV wurde bisher nur im Säuger eingehend untersucht. Das aviäre Immunsystem unterscheidet sich von dem des Säugers jedoch in einigen Merkmalen, besonders in Bezug auf das Lymphsystem. Diese Unterschiede könnten unter Umständen die Diskrepanz bei der Immunantwort auf eine Elastase-Mutante erklären. Z. B. besitzen Hühner keine Lymphknoten (Reese *et al.*, 2006), die im Säuger einen wichtigen Knotenpunkt für die Interaktion Antigen-präsentierender Zellen (APC) mit B-Lymphozyten und T-Lymphozyten bilden. Stattdessen treten im Huhn diffuse lymphatische Ansammlungen auf, die nicht verkapselt sind und kleine Lymphozyten enthalten (Swayne und Kapczynski, 2008).

Außerdem gibt es im Huhn vermutlich kein RIG-I (Barber *et al.*, 2010). RIG-I ist ein löslicher, cytosolischer Pattern-Recognition-Receptor (PRR), der als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Interferon-vermittelten antiviralen Immunantwort und somit auch bei der Regulation der adaptiven Immunantwort spielt (Kato *et al.*, 2005; Yoneyama und Fujita, 2009).

Die Tatsache, dass sich die R65-E-Mutante in der vorliegenden Arbeit als nicht geeignet für den Einsatz als HPAIV Lebend-Vakzine herausgestellt hat, bedeutet nicht, dass das Prinzip generell nicht im Huhn funktioniert. Man könnte Elastase-abhängige Spaltstellenmutanten in Kombination mit anderen attenuierenden Mutationen gegen niedrig-pathogene aviäre Influenza-Viren vom Subtyp H5 und H7 – oder auch H6 und H9, welche ebenfalls ein großes Problem in der Geflügelwirtschaft darstellen (Das und Suarez, 2007) – testen. Sollten sich diese LAIV als effizient erweisen, könnte mitunter zugleich der Neuentstehung hoch-pathogener Virusvarianten vorgebeugt werden.

Die Verwendung von HA-Spaltstellen-Mutanten als Grundlage für die Herstellung von inaktivierten Impfstoffen gegen hoch-pathogene H5- oder H7-Viren wäre aufgrund einer zusätzlichen Sicherheit im Huhn und auch während der Produktion sinnvoll.

Darüber hinaus wäre ein Einsatz Elastase-abhängiger Lebend-Vakzinen in Verbindung mit weiteren attenuierenden Mutationen und als Impfstoff-Subkomponente beim Menschen denkbar. Für den Menschen entwickelte Impfstoffe werden in der Regel zunächst im Mausmodell, Frettchen oder Makaken geprüft (van der Laan *et al.*, 2008; Bodewes *et al.*, 2010). Da verschiedene Elastase-abhängige Mutanten im Maus- sowie Schweinmodell gute Ergebnisse lieferten (Stech *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2008a; Masic *et al.*, 2009b), könnte dies ein erster Hinweis auf eine potentielle Anwendbarkeit für den Menschen sein.

6. Zusammenfassung

Wildvögel stellen die natürlichen Wirte und das Hauptreservoir für Influenza-A-Viren dar. Einige Influenza-Stämme konnten sich zudem an verschiedene Säugetierarten wie Mensch, Schwein oder Pferd anpassen. Die molekularen Mechanismen der Adaptation von Influenza-A-Viren an einen neuen Wirt sind komplex. Sie werden u. a. auf eine modifizierte Interaktion viraler Proteine mit Wirtszellproteinen zurückgeführt, die in Verbindung mit dem Auftreten von Punktmutationen in viralen Proteinen, vor allem den Polymeraseproteinen, steht und zu einer optimierten Replikation von Influenza-A-Viren im neuen Wirt führen kann.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden molekulare Werkzeuge entwickelt, die der Identifizierung wirtsspezifischer Interaktionspartner der viralen Ribonukleoprotein-Komplexe (vRNP) dienen können. Dazu wurden mittels reverser Genetik rekombinante Influenza-A-Viren unterschiedlichen Wirtsspektrums mit einem *Strep*-tag als Markierung am C-Terminus der Polymerase-Untereinheit PB2 generiert. Zu den verwendeten Viren zählten das humane A/HongKong/1/68 (H3N2), die beiden spezieübergreifenden Viren A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) („R65“) sowie A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) und das aviäre A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8). Durch Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen wurde die stabile Expression des *Strep*-PB2-Fusionsproteins in infizierten Zellen bestätigt. Es wurde zudem gezeigt, dass die markierten Viren auf Säuger- und Vogelzellen vergleichbar mit den entsprechenden unmarkierten Viren replizieren. Anhand des *Strep*-getaggtten PB2-Proteins des R65-Virus wurden erfolgreich virale RNP-Komplexe aus infizierten Säuger- und Vogel-Zellen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und deren vier Protein-Bestandteile PB2, PB1, PA und NP durch MALDI-tof-Massenspektrometrie identifiziert.

Die Palette getaggtter Viren bildet die Grundlage für weiterführende Studien zur Untersuchung Virus-Wirt-spezifischer Wechselwirkungen, die für den Wirtswechsel und die Adaptation von Influenza-A-Viren entscheidend sein können.

Die Entstehung des pandemischen Influenza-Virus A/HongKong/1/68 (H3N2) („Hk68“) geht auf ein Reassortment zwischen dem zuvor zirkulierenden humanen H2N2-Virus und einem aviären H3-Stamm zurück. Hierbei wurden die Segmente des humanen Virus, die

für das Rezeptor-bindende Protein Haemagglutinin (HA) und die Polymerase-Untereinheit PB1 kodieren, gegen die entsprechenden Segmente des aviären H3-Virus ausgetauscht. Bei einem Sequenzvergleich zwischen dem Hk68-PB1 und dem PB1 des dem unbekanntem aviären Donor nahestehenden Isolates A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) („dUk“) wurden lediglich sechs Unterschiede in der Aminosäuresequenz identifiziert, die möglicherweise Folge der Adaptation des Hk68-Virus an den humanen Wirt sind. Nach dem Einfügen der einzelnen Mutationen in das dUk-PB1 wurden homologe RNP-Komplexe (PB2, PB1 und PA sowie NP von Hk68) und heterologe RNP-Komplexe (PB2, PA, NP von Hk68 und PB1 bzw. PB1-Punktmutante von dUk) in transfizierten Säugerzellen rekonstituiert. Mit Hilfe eines Luciferase-Reportertests konnte gezeigt werden, dass der heterologe Hk68/dUk-PB1-Komplex im Vergleich zum homologen Hk68-Komplex eine um 50% erniedrigte Polymerase-Aktivität aufweist. Dieser negative Effekt konnte durch das Einfügen der Mutation PB1 I12V in das dUk-PB1, aber nicht durch eine der anderen fünf Punktmutationen, vollständig aufgehoben werden. Folglich könnte es sich bei dieser Mutation um eine adaptive Mutation handeln. Untersuchungen an *in vitro* rekonstituierten RNP-Komplexen anderer Viren konnten diese Theorie unterstützen. Wachstumskinetiken des homologen Hk68- und dUk-Virus sowie von ihnen abgeleiteter PB1-Reassortanten und PB1-Mutanten deuteten ebenfalls auf einen Einfluss von Aminosäureposition 12 im PB1-Protein auf die Virusreplikation hin. Mit Hilfe eines ELISAs durchgeführte Bindungsstudien zwischen den PA-Proteinen verschiedener Influenza-A-Viren und PB1-Peptiden mit Valin oder Isoleucin an Position 12 legten zudem eine Zu- bzw. Abnahme der Affinität zwischen PA und PB1 als Ursache für die veränderte Polymeraseaktivität nahe.

Hochpathogene aviäre Influenza-A-Viren (HPAIV) vom Subtyp H5 oder H7 verursachen enorme wirtschaftliche Schäden und stellen eine potentielle Bedrohung für den Menschen dar. Die Entwicklung effektiver Impfstoffe ist deshalb in vielfacher Hinsicht sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels reverser Genetik eine Elastase-abhängige Mutante des HPAIV A/swan/Germany/R65/06 (H5N1), genannt R65-E, als potentielle lebend-attenuierte Vakzine erzeugt. Dazu wurde die polybasische Spaltstelle im HA des hochpathogenen Virus gegen eine Spaltstelle für die *in vivo* kaum verfügbare Protease Elastase ersetzt. *In vitro* wurde mit Hilfe von Plaqueassays, Wachstumskinetiken und Western-Blot-Analysen die strikte Abhängigkeit der R65-E-Replikation und der R65-E-HA-Spaltung von Elastase nachgewiesen. Im Gegensatz zum R65-Wildtyp war die R65-E-

Mutante *in vivo* aufgrund der Abwesenheit von Elastase auf einen Replikationszyklus beschränkt und somit hochgradig attenuiert. Insgesamt erwies sich die R65-E-Mutante im Huhn jedoch als wenig immunogen. So kam es 7 Tage nach okulonasaler Infektion von Eintagsküken lediglich zu einer schwachen zellulären Immunantwort basierend auf CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Milz. Eine Antikörper-Antwort wurde nach okulonasaler oder *in ovo* Infektion nur bei jeweils einem von zehn bzw. einem von sieben Tieren induziert. Das Vorhandensein H5-spezifischer Antikörper korrelierte hierbei mit einem Schutz der Tiere gegen eine Belastungsinfektion mit dem homologen HPAIV R65. Gleichmaßen ging die Abwesenheit H5-spezifischer Antikörper bei den übrigen Versuchstieren mit einem letalen Verlauf der homologen R65-Belastungsinfektion einher. Ein partieller Schutz gegen eine heterosubtypische Belastungsinfektion mit dem HPAIV R65-H9_{R66mutR65} sowie eine reduzierte Virusausscheidung bei einigen Tieren der Boostergruppe, die drei Wochen nach okulonasaler Infektion eine zweite Dosis R65-E erhalten hatten, deuteten auf eine R65-E-induzierte zellvermittelte Schutzwirkung hin. Es ist zu vermuten, dass die R65-E-Mutante *in vivo* überattenuiert war und aus diesem Grund keine protektive Immunabwehr induzieren konnte. R65-E eignet sich daher nicht als lebend-attenuierte Geflügelvakzine.

7. Summary

Wild birds are the natural hosts and main reservoir for influenza A viruses of all known subtypes. However, some influenza viruses have established stable lineages in mammals. The molecular basis of host restriction and adaptation of influenza viruses is determined by the interaction of viral proteins with specific host cell factors and based on adaptive point mutations in the viral polymerase proteins enhancing viral replication in a species-specific manner.

To identify host-specific interaction partners of viral ribonucleoprotein (vRNP) complexes, recombinant influenza A viruses with a *Strep* affinity tag at the C-terminus of the polymerase protein PB2 were generated by reverse genetics. For this, a human H3N2 strain, an avian H3N8 strain and two strains of subtype H5N1 and H7N7 infecting avian and mammalian hosts were used. The stable expression of *Strep*-tagged fusion protein in infected cells was confirmed by immunofluorescence and Western blot analysis. Replication of tagged mutants was shown to be comparable to that of the untagged recombinant parent viruses. Tagged vRNP complexes were purified from human and avian cell extracts by affinity chromatography. All vRNP protein components were successfully identified by MALDI-tof mass spectrometry. These experiments form the basis for ongoing studies to investigate virus-host-specific interactions that are important for host switch and adaptation of influenza A viruses.

The pandemic virus A/Hong Kong/1/68 (H3N2) (Hk68) is a reassortant between the at that time circulating human H2N2 and an avian H3 strain which provided its HA and PB1 segments. The avian donor virus is supposed to have a common ancestor with reference strain A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8) (dUk). The alignment of the PB1 segments revealed six amino acid substitutions suggesting relevance for adaptation of Hk68-PB1. To investigate their adaptive potential, these point mutations were introduced into dUk-PB1. Homologous (PB2, PB1, PA, NP from Hk68) and heterologous (PB2, PA, NP from Hk68 and PB1 or PB1 mutant from dUk) RNP complexes were reconstituted *in vitro* in transfected human cells and polymerase activity was determined by a luciferase reporter assay. dUk-PB1 reduced the polymerase activity of the heterologous Hk68 complex by 50%. This negative effect was abolished by insertion of PB1 I12V into dUk-PB1 but not

SUMMARY

by any of the other 5 point mutations. Therefore, PB1 I12V could be an adaptive mutation. This hypothesis was supported by comparing the polymerase activity of other influenza A viruses with either valin or isoleucin at PB1 position 12. Growth kinetics of homologous Hk68 and dUk virus, their reassortants and PB1 mutants also implied an influence of PB1 amino acid position 12 on viral replication. Binding studies of different PA proteins to PB1 peptides with either valin or isoleucin at position 12 also suggested an altered affinity between both proteins as a reason for the differing polymerase activity.

Highly pathogenic avian influenza A viruses (HPAIV) of subtype H5 and H7 are a major economic burden and a threat to human health. The development of efficient vaccines against HPAIV is therefore highly desirable.

In the present study, an elastase-dependent mutant of HPAIV A/swan/Germany/R65/06 (H5N1) was generated by reverse genetics (R65-E). The polybasic cleavage site of parental R65 was replaced by a cleavage site for elastase. The strict dependence of R65-E replication on the availability of elastase was confirmed *in vitro* by plaque assays, growth kinetics and western blot analysis. In contrast to HPAIV R65 and due to the absence of elastase, R65-E was highly attenuated *in vivo*. Unexpectedly, R65-E was not immunogenic in chicken. After oculonasally infecting 1-day-old chicks with R65-E only a slight cell-mediated immune response based on CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes was detected. Additionally, antibody was induced in only one of ten or seven chickens each after oculonasal or *in ovo* R65-E infection. Here, the presence of H5-specific antibodies correlated with protection against homologous HPAIV challenge. Partial protection against heterosubtypic challenge with HPAIV R65-H9_{R66mutR65} and reduced viral shedding in some animals immunized twice with R65-E was probably linked to a cell-mediated immune response.

R65-E is very likely to be over-attenuated *in vivo* and thus did not induce a protective immune response. It is not a suitable live attenuated vaccine against HPAIV in chicken.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, R., M. B. Oldstone and P. Palese (2007). "Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic." *Nat Immunol* 8(11): 1188-1193.
- Akarsu, H., W. P. Burmeister, C. Petosa, I. Petit, C. W. Muller, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2003). "Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)." *EMBO J* 22(18): 4646-4655.
- Alexander, D. J. (2008). "Avian influenza - diagnosis." *Zoonoses Public Health* 55(1): 16-23.
- Allan, W., Z. Tabi, A. Cleary and P. C. Doherty (1990). "Cellular events in the lymph node and lung of mice with influenza. Consequences of depleting CD4+ T cells." *J Immunol* 144(10): 3980-3986.
- Anantpadma, M., D. A. Stein and S. Vрати (2010). "Inhibition of Japanese encephalitis virus replication in cultured cells and mice by a peptide-conjugated morpholino oligomer." *J Antimicrob Chemother* 65(5): 953-961.
- Anderson, R. W., J. R. Bennink, J. W. Yewdell, W. L. Maloy and J. E. Coligan (1992). "Influenza basic polymerase 2 peptides are recognized by influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T lymphocytes." *Mol Immunol* 29(9): 1089-1096.
- Area, E., J. Martin-Benito, P. Gastaminza, E. Torreira, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2004). "3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 308-313.
- Avakian, A. P., R. M. Poston, F. K. Kong, K. R. Van Kampen and D. C. Tang (2007). "Automated mass immunization of poultry: the prospect for nonreplicating human adenovirus-vectored in ovo vaccines." *Expert Rev Vaccines* 6(3): 457-465.
- Avalos, R. T., Z. Yu and D. P. Nayak (1997). "Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells." *J Virol* 71(4): 2947-2958.
- Babcock, H. P., C. Chen and X. Zhuang (2004). "Using single-particle tracking to study nuclear trafficking of viral genes." *Biophys J* 87(4): 2749-2758.
- Bancroft, C. T. and T. G. Parslow (2002). "Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome." *J Virol* 76(14): 7133-7139.

- Banks, J., E. S. Speidel, E. Moore, L. Plowright, A. Piccirillo, I. Capua, P. Cordioli, A. Fioretti and D. J. Alexander (2001). "Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy." *Arch Virol* 146(5): 963-973.
- Barber, M. R., J. R. Aldridge Jr, R. G. Webster, K. E. Magor (2010). "Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza." *Proc Natl Acad Sci USA* 107(13):5913-8.
- Barman, S., A. Ali, E. K. Hui, L. Adhikary and D. P. Nayak (2001). "Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses." *Virus Res* 77(1): 61-69.
- Baulcombe, D. (2002). "RNA silencing." *Curr Biol* 12(3): R82-84.
- Belshe, R. B., W. C. Gruber, P. M. Mendelman, H. B. Mehta, K. Mahmood, K. Reisinger, J. Treanor, K. Zangwill, F. G. Hayden, D. I. Bernstein, K. Kotloff, J. King, P. A. Piedra, S. L. Block, L. Yan and M. Wolff (2000). "Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine." *J Infect Dis* 181(3): 1133-1137.
- Belshe, R. B. (2005). "The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus." *N Engl J Med* 353(21): 2209-2211.
- Bender, C., H. Hall, J. Huang, A. Klimov, N. Cox, A. Hay, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim and K. Subbarao (1999). "Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998." *Virology* 254(1): 115-123.
- Berggard, T., S. Linse and P. James (2007). "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions." *Proteomics* 7(16): 2833-2842.
- Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. P. Nayak (1998). "Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins." *J Virol* 72(7): 5493-5501.
- Bodewes, R., G. F. Rimmelzwaan and A. D. Osterhaus (2010). "Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines." *Expert Rev Vaccines* 9(1): 59-72.
- Bogs, J., J. Veits, S. Gohrbandt, J. Hundt, O. Stech, A. Breithaupt, J. P. Teifke, T. C. Mettenleiter and J. Stech (2010). "Highly pathogenic H5N1 influenza viruses carry virulence determinants beyond the polybasic hemagglutinin cleavage site." *PLoS One* 5(7): e11826.

- Boivin, S., S. Cusack, R. W. Ruigrok and D. J. Hart (2010). "Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms." *J Biol Chem* 285(37): 28411-28417.
- Boltz, D. A., J. R. Aldridge, Jr., R. G. Webster and E. A. Govorkova (2010). "Drugs in development for influenza." *Drugs* 70(11): 1349-1362.
- Bosch, F. X., M. Orlich, H. D. Klenk and R. Rott (1979). "The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses." *Virology* 95(1): 197-207.
- Bottcher-Friebertshauser, E., C. Freuer, F. Sielaff, S. Schmidt, M. Eickmann, J. Uhlendorff, T. Steinmetzer, H. D. Klenk and W. Garten (2010). "Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors." *J Virol* 84(11): 5605-5614.
- Boulo, S., H. Akarsu, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2007). "Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes." *Virus Res* 124(1-2): 12-21.
- Bouvier, N. M. and P. Palese (2008). "The biology of influenza viruses." *Vaccine* 26 Suppl 4: D49-53.
- Breithaupt, A., D. Kalthoff, J. Dale, F. Bairlein, M. Beer and J. P. Teifke (2010). "Neurotropism in Blackcaps (*Sylvia atricapilla*) and Red-Billed Queleas (*Quelea quelea*) After Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Infection." *Vet Pathol*.
- Brett, I. C. and B. E. Johansson (2005). "Immunization against influenza A virus: comparison of conventional inactivated, live-attenuated and recombinant baculovirus produced purified hemagglutinin and neuraminidase vaccines in a murine model system." *Virology* 339(2): 273-280.
- Brower-Sinning, R., D. M. Carter, C. J. Crevar, E. Ghedin, T. M. Ross and P. V. Benos (2009). "The role of RNA folding free energy in the evolution of the polymerase genes of the influenza A virus." *Genome Biol* 10(2): R18.
- Bruce, E. A., P. Digard and A. D. Stuart (2010). "The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation." *J Virol* 84(12): 5848-5859.
- Bui, M., G. Whittaker and A. Helenius (1996). "Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins." *J Virol* 70(12): 8391-8401.

- Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley (1994). "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* 371(6492):37-43.
- Calfee, D. P. and F. G. Hayden (1998). "New approaches to influenza chemotherapy. Neuraminidase inhibitors." *Drugs* 56(4): 537-553.
- Capua, I. and D. J. Alexander (2004). "Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(1): 1-6.
- Capua, I. and S. Marangon (2007). "The use of vaccination to combat multiple introductions of Notifiable Avian Influenza viruses of the H5 and H7 subtypes between 2000 and 2006 in Italy." *Vaccine* 25(27): 4987-4995.
- Carrasco, M., M. J. Amorim and P. Digard (2004). "Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane." *Traffic* 5(12): 979-992.
- Castillo, M. J., K. Nakajima, M. Zimmerman, J. C. Powers (1979). "Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases." *Anal Biochem* 99(1):53-64.
- Chambers, T. M., Y. Kawaoka and R. G. Webster (1988). "Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccinia-expressed hemagglutinin." *Virology* 167(2): 414-421.
- Chambers, T. M., M. Quinlivan, T. Sturgill, A. Cullinane, D. W. Horohov, D. Zamarin, S. Arkins, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2009). "Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of safety and efficacy in horses." *Equine Vet J* 41(1): 87-92.
- Chan, A. Y., F. T. Vreede, M. Smith, O. G. Engelhardt and E. Fodor (2006). "Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation." *Virology* 351(1): 210-217.
- Chen, G. W., S. C. Chang, C. K. Mok, Y. L. Lo, Y. N. Kung, J. H. Huang, Y. H. Shih, J. Y. Wang, C. Chiang, C. J. Chen and S. R. Shih (2006). "Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses." *Emerg Infect Dis* 12(9): 1353-1360.
- Chen, B. J., G. P. Leser, D. Jackson and R. A. Lamb (2008a). "The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding." *J Virol* 82(20): 10059-10070.

- Chen, L. M., C. T. Davis, H. Zhou, N. J. Cox and R. O. Donis (2008b). "Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses." *PLoS Pathog* 4(5): e1000072.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* 7(12): 1306-1312.
- Chen, Z., Y. Li and R. M. Krug (1999). "Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery." *EMBO J* 18(8): 2273-2283.
- Cheng, P. K., T. W. Leung, E. C. Ho, P. C. Leung, A. Y. Ng, M. Y. Lai and W. W. Lim (2009a). "Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1)." *Emerg Infect Dis* 15(6): 966-968.
- Cheng, X., M. Eisenbraun, Q. Xu, H. Zhou, D. Kulkarni, K. Subbarao, G. Kemble and H. Jin (2009b). "H5N1 vaccine-specific B cell responses in ferrets primed with live attenuated seasonal influenza vaccines." *PLoS One* 4(2): e4436.
- Coletti, M., E. Del Rossi, M. P. Franciosini, F. Passamonti, G. Tacconi and C. Marini (2001). "Efficacy and safety of an infectious bursal disease virus intermediate vaccine in ovo." *Avian Dis* 45(4): 1036-1043.
- Compans, R. W., H. D. Klenk, L. A. Caliguri and P. W. Choppin (1970). "Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins." *Virology* 42(4): 880-889.
- Conenello, G. M., D. Zamarin, L. A. Perrone, T. Tumpey and P. Palese (2007). "A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence." *PLoS Pathog* 3(10): 1414-1421.
- Coombs, K. M., A. Berard, W. Xu, O. Krokhin, X. Meng, J. P. Cortens, D. Kobasa, J. Wilkins and E. G. Brown (2010). "Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells." *J Virol* 84(20): 10888-10906.
- Crawford, J., B. Wilkinson, A. Vosnesensky, G. Smith, M. Garcia, H. Stone and M. L. Perdue (1999). "Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes." *Vaccine* 17(18): 2265-2274.
- Das, A. and D. L. Suarez (2007). "Development and bench validation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction protocols for rapid detection of the

- subtypes H6, H9, and H11 of avian influenza viruses in experimental samples." *J Vet Diagn Invest* 19(6): 625-634.
- Davis, A. R. and D. P. Nayak (1979). "Sequence relationships among defective interfering influenza viral RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3092-3096.
- de Jong, M. D., C. P. Simmons, T. T. Thanh, V. M. Hien, G. J. Smith, T. N. Chau, D. M. Hoang, N. V. Chau, T. H. Khanh, V. C. Dong, P. T. Qui, B. V. Cam, Q. Ha do, Y. Guan, J. S. Peiris, N. T. Chinh, T. T. Hien and J. Farrar (2006). "Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia." *Nat Med* 12(10): 1203-1207.
- Deas, T. S., C. J. Bennett, S. A. Jones, M. Tilgner, P. Ren, M. J. Behr, D. A. Stein, P. L. Iversen, L. D. Kramer, K. A. Bernard and P. Y. Shi (2007). "In vitro resistance selection and in vivo efficacy of morpholino oligomers against West Nile virus." *Antimicrob Agents Chemother* 51(7): 2470-2482.
- Del Cacho, E., M. Gallego, F. Lopez-Bernard, C. Sanchez-Acedo and H. S. Lillehoj (2008). "Isolation of chicken follicular dendritic cells." *J Immunol Methods* 334(1-2): 59-69.
- Deng, T., O. G. Engelhardt, B. Thomas, A. V. Akoulitchev, G. G. Brownlee and E. Fodor (2006). "Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex." *J Virol* 80(24): 11911-11919.
- Detjen, B. M., C. St Angelo, M. G. Katze and R. M. Krug (1987). "The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex." *J Virol* 61(1): 16-22.
- Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack and R. W. Ruigrok (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." *Nature* 458(7240): 914-918.
- Digard, P., D. Elton, K. Bishop, E. Medcalf, A. Weeds and B. Pope (1999). "Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments." *J Virol* 73(3): 2222-2231.
- Dos Santos Afonso, E., N. Escriou, I. Leclercq, S. van der Werf and N. Naffakh (2005). "The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment." *Virology* 341(1): 34-46.

- Draper, B. W., P. A. Morcos and C. B. Kimmel (2001). "Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown." *Genesis* 30(3): 154-156.
- Duhaut, S. and N. J. Dimmock (2000). "Approximately 150 nucleotides from the 5' end of an influenza A segment 1 defective virion RNA are needed for genome stability during passage of defective virus in infected cells." *Virology* 275(2): 278-285.
- Duhaut, S. D. and N. J. Dimmock (2002). "Defective segment 1 RNAs that interfere with production of infectious influenza A virus require at least 150 nucleotides of 5' sequence: evidence from a plasmid-driven system." *J Gen Virol* 83(Pt 2): 403-411.
- Dyballa, N. and S. Metzger (2009). "Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels." *J Vis Exp*(30).
- Ekiert, D. C., G. Bhabha, M. A. Elsliger, R. H. Friesen, M. Jongeneelen, M. Throsby, J. Goudsmit and I. A. Wilson (2009). "Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope." *Science* 324(5924): 246-251.
- Emmott, E., H. Wise, E. M. Loucaides, D. A. Matthews, P. Digard and J. A. Hiscox (2010). "Quantitative proteomics using SILAC coupled to LC-MS/MS reveals changes in the nucleolar proteome in influenza A virus-infected cells." *J Proteome Res* 9(10): 5335-5345.
- Enami, M., R. Fukuda and A. Ishihama (1985). "Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus." *Virology* 142(1): 68-77.
- Enami, M. and K. Enami (1996). "Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein." *J Virol* 70(10): 6653-6657.
- Engelhardt, O. G., M. Smith and E. Fodor (2005). "Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II." *J Virol* 79(9): 5812-5818.
- Falcon, A. M., A. Fernandez-Sesma, Y. Nakaya, T. M. Moran, J. Ortin and A. Garcia-Sastre (2005). "Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins." *J Gen Virol* 86(Pt 10): 2817-2821.
- Fang, R., W. Min Jou, D. Huylebroeck, R. Devos, W. Fiers (1981). "Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin." *Cell* 25(2):315-23.

- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.
- Flick, R. and G. Hobom (1999). "Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation." *J Gen Virol* 80 (Pt 10): 2565-2572.
- Flick, R., G. Neumann, E. Hoffmann, E. Neumeier and G. Hobom (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." *RNA* 2(10): 1046-1057.
- Fodor, E., P. Palese, G. G. Brownlee and A. Garcia-Sastre (1998). "Attenuation of influenza A virus mRNA levels by promoter mutations." *J Virol* 72(8): 6283-6290.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen and A. D. Osterhaus (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." *J Virol* 79(5): 2814-2822.
- Fouchier, R. A., A. D. Osterhaus and I. H. Brown (2003). "Animal influenza virus surveillance." *Vaccine* 21(16): 1754-1757.
- Fouchier, R. A., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G. J. Van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans and A. D. Osterhaus (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1356-1361.
- Fu, T. M., L. Guan, A. Friedman, T. L. Schofield, J. B. Ulmer, M. A. Liu and J. J. Donnelly (1999). "Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge." *J Immunol* 162(7): 4163-4170.
- Fuchs, W., A. Romer-Oberdorfer, J. Veits and T. C. Mettenleiter (2009). "Novel avian influenza virus vaccines." *Rev Sci Tech* 28(1): 319-332.
- Fujii, K., Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto and Y. Kawaoka (2005). "Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions." *J Virol* 79(6): 3766-3774.
- Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida and Y. Kawaoka (2003). "Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4): 2002-2007.

- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk and J. Stech (2005). "The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18590-18595.
- Gabriel, G., H. Garn, M. Wegmann, H. Renz, A. Herwig, H. D. Klenk and J. Stech (2008a). "The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine." *Vaccine* 26(7): 956-965.
- Gabriel, G., A. Herwig and H. D. Klenk (2008b). "Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus." *PLoS Pathog* 4(2): e11.
- Gabriel, G., A. Nordmann, D. A. Stein, P. L. Iversen and H. D. Klenk (2008c). "Morpholino oligomers targeting the PB1 and NP genes enhance the survival of mice infected with highly pathogenic influenza A H7N7 virus." *J Gen Virol* 89(Pt 4): 939-948.
- Gagic, M., C. A. St Hill and J. M. Sharma (1999). "In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents." *Avian Dis* 43(2): 293-301.
- Gambaryan, A. S., V. E. Piskarev, I. A. Yamskov, A. M. Sakharov, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, N. E. Nifant'ev and M. N. Matrosovich (1995). "Human influenza virus recognition of sialyloligosaccharides." *FEBS Lett* 366(1): 57-60.
- Gao, Q., A. C. Lowen, T. T. Wang and P. Palese (2010). "A nine-segment influenza A virus carrying subtype H1 and H3 hemagglutinins." *J Virol* 84(16): 8062-8071.
- Gao, W., A. C. Soloff, X. Lu, A. Montecalvo, D. C. Nguyen, Y. Matsuoka, P. D. Robbins, D. E. Swayne, R. O. Donis, J. M. Katz, S. M. Barratt-Boyes and A. Gambotto (2006). "Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization." *J Virol* 80(4): 1959-1964.
- Garcia, M., J. M. Crawford, J. W. Latimer, E. Rivera-Cruz and M. L. Perdue (1996). "Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico." *J Gen Virol* 77 (Pt 7): 1493-1504.
- Garcia-Robles, I., H. Akarsu, C. W. Muller, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2005). "Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes." *Virology* 332(1): 329-336.

- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese and T. Muster (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." *Virology* 252(2): 324-330.
- Garten, W., F. X. Bosch, D. Linder, R. Rott and H. D. Klenk (1981). "Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage." *Virology* 115(2): 361-374.
- Garten, W. and H. D. Klenk (1999). "Understanding influenza virus pathogenicity." *Trends Microbiol* 7(3): 99-100.
- Garten, W. and H. D. Klenk (2008). Cleavage Activation of the Influenza Virus Hemagglutinin and Its Role in Pathogenesis pp. 156-167. in *Avian Influenza*. Edited by H.-D. Klenk, Matrosovich, M. N., Stech, J.; Basel: Karger.
- Geiser, M., R. Cebe, D. Drewello and R. Schmitz (2001). "Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase." *Biotechniques* 31(1): 88-90, 92.
- Geiss, G. K., M. Salvatore, T. M. Tumpey, V. S. Carter, X. Wang, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, R. E. Bumgarner, P. Palese, M. G. Katze and A. Garcia-Sastre (2002). "Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10736-10741.
- Ghanem, A., D. Mayer, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, G. Kochs, A. Garcia-Sastre and M. Schwemmle (2007). "Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase." *J Virol* 81(14): 7801-7804.
- Gohrbandt, S., J. Veits, J. Hundt, J. Bogs, A. Breithaupt, J. P. Teifke, S. Weber, T. C. Mettenleiter and J. Stech (2010). "The amino acids adjacent to the hemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5." *J Gen Virol*. Sep 29. [Epub ahead of print]
- Gohrbandt, S., J. Veits, A. Breithaupt, J. Hundt, J. P. Teifke, O. Stech, T. C. Mettenleiter, J. Stech (2010). "H9 avian influenza reassortant with engineered polybasic cleavage site displays high pathogenic phenotype in chicken." *J Virol* in revision

- Gotoh, B., F. Yamauchi, T. Ogasawara and Y. Nagai (1992). "Isolation of factor Xa from chick embryo as the amniotic endoprotease responsible for paramyxovirus activation." *FEBS Lett* 296(3): 274-278.
- Grazi, E., P. Cuneo, E. Magri and C. Schwienbacher (1992). "Preferential binding of alpha-actinin to actin bundles." *FEBS Lett* 314(3): 348-350.
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss and R. G. Webster (1999). "Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9363-9367.
- Hai, R., M. Schmolke, Z. T. Varga, B. Manicassamy, T. T. Wang, J. A. Belser, M. B. Pearce, A. Garcia-Sastre, T. M. Tumpey and P. Palese (2010). "PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models." *J Virol* 84(9): 4442-4450.
- Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin and D. Jackson (2008). "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses." *J Gen Virol* 89(Pt 10): 2359-2376.
- Hamilton M. A., Russo R. C., Robert V. (1977). Thurston Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays *Environ. Sci. Technol.*; 11 (7), pp 714–719.
- Han, X., J. H. Bushweller, D. S. Cafiso and L. K. Tamm (2001). "Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin." *Nat Struct Biol* 8(8): 715-720.
- Harris, A., G. Cardone, D. C. Winkler, J. B. Heymann, M. Brecher, J. M. White and A. C. Steven (2006). "Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19123-19127.
- Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 690-698.
- Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann and Y. Kawaoka (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." *Science* 293(5536): 1840-1842.
- Hay, A. J., A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel and M. H. Smith (1985). "The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine." *EMBO J* 4(11): 3021-3024.
- He, X., J. Zhou, M. Bartlam, R. Zhang, J. Ma, Z. Lou, X. Li, J. Li, A. Joachimiak, Z. Zeng, R. Ge, Z. Rao and Y. Liu (2008). "Crystal structure of the polymerase PA(C)-

- PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus." *Nature* 454(7208): 1123-1126.
- Hinshaw, V. S., G. M. Air, A. J. Gibbs, L. Graves, B. Prescott and D. Karunakaran (1982). "Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls." *J Virol* 42(3): 865-872.
- Hinshaw, V. S., R. G. Webster and R. J. Rodriguez (1981). "Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources." *Arch Virol* 67(3): 191-201.
- Hinshaw, V. S., J. M. Wood, R. G. Webster, R. Deibel and B. Turner (1985). "Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America." *Bull World Health Organ* 63(4): 711-719.
- Hirayama, E., H. Atagi, A. Hiraki and J. Kim (2004). "Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex." *J Virol* 78(3): 1263-1270.
- Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom and R. G. Webster (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 6108-6113.
- Hoffmann, B., T. Harder, E. Starick, K. Depner, O. Werner and M. Beer (2007). "Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR." *J Clin Microbiol* 45(2): 600-603.
- Honda, A. (2008). "Role of host protein Ebp1 in influenza virus growth: intracellular localization of Ebp1 in virus-infected and uninfected cells." *J Biotechnol* 133(2): 208-212.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (1994). "Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus." *J Virol* 68(5): 3120-3128.
- Horimoto, T., E. Rivera, J. Pearson, D. Senne, S. Krauss, Y. Kawaoka and R. G. Webster (1995). "Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico." *Virology* 213(1): 223-230.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (2001). "Pandemic threat posed by avian influenza A viruses." *Clin Microbiol Rev* 14(1): 129-149.

- Hsu, M. T., J. D. Parvin, S. Gupta, M. Krystal and P. Palese (1987). "Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(22): 8140-8144.
- Hu, C. D., Y. Chinenov and T. K. Kerppola (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." *Mol Cell* 9(4): 789-798.
- Hu, C. D. and T. K. Kerppola (2003). "Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis." *Nat Biotechnol* 21(5): 539-545.
- Huarte, M., A. Falcon, Y. Nakaya, J. Ortin, A. Garcia-Sastre and A. Nieto (2003). "Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses." *J Virol* 77(10): 6007-6013.
- Hulse-Post, D. J., J. Franks, K. Boyd, R. Salomon, E. Hoffmann, H. L. Yen, R. J. Webby, D. Walker, T. D. Nguyen and R. G. Webster (2007). "Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks." *J Virol* 81(16): 8515-8524.
- Hutchinson, E. C., J. C. von Kirchbach, J. R. Gog and P. Digard (2010). "Genome packaging in influenza A virus." *J Gen Virol* 91(Pt 2): 313-328.
- IBA, Göttingen:
http://www.iba-go.com/prottools/index.php?prot_p_dect.html
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV);
<http://www.ictvdb.org/Ictv/index.html>
- Invitrogen, Karlsruhe:
<http://proteomics.wayne.edu/pdf/syproruby.pdf>
- Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster and Y. Kawaoka (1998). "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential." *J Virol* 72(9): 7367-7373.
- Ito, T., H. Goto, E. Yamamoto, H. Tanaka, M. Takeuchi, M. Kuwayama, Y. Kawaoka and K. Otsuki (2001). "Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens." *J Virol* 75(9): 4439-4443.

- Jackson, D., M. J. Hossain, D. Hickman, D. R. Perez and R. A. Lamb (2008). "A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11): 4381-4386.
- Jackwood, M. W., S. Bogoch, E. S. Bogoch, D. Hilt and S. M. Williams (2009). "Efficacy of a replikin peptide vaccine against low-pathogenicity avian influenza H5 virus." *Avian Dis* 53(4): 613-617.
- Johansson, B. E. and I. C. Brett (2007). "Changing perspective on immunization against influenza." *Vaccine* 25(16): 3062-3065.
- Jorba, N., E. Area and J. Ortin (2008a). "Oligomerization of the influenza virus polymerase complex in vivo." *J Gen Virol* 89(Pt 2): 520-524.
- Jorba, N., S. Juarez, E. Torreira, P. Gastaminza, N. Zamarreno, J. P. Albar and J. Ortin (2008b). "Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors." *Proteomics* 8(10): 2077-2088.
- Jorba, N., R. Coloma and J. Ortin (2009). "Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication." *PLoS Pathog* 5(5): e1000462.
- Josset, L., E. Frobert and M. Rosa-Calatrava (2008). "Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions." *J Clin Virol* 43(4): 381-390.
- Junttila, M. R., S. Saarinen, T. Schmidt, J. Kast and J. Westermarck (2005). "Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells." *Proteomics* 5(5): 1199-1203.
- Kang, D., S. G. Gho, M. Suh and C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bull. Korean Chem. Soc.* 11, 1511-1512.
- Karlas, A., N. Machuy, Y. Shin, K. P. Pleissner, A. Artarini, D. Heuer, D. Becker, H. Khalil, L. A. Ogilvie, S. Hess, A. P. Maurer, E. Muller, T. Wolff, T. Rudel and T. F. Meyer (2010). "Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication." *Nature* 463(7282): 818-822.
- Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* 23(1):19-28.

- Katz, J. M., X. Lu, T. M. Tumpey, C. B. Smith, M. W. Shaw and K. Subbarao (2000). "Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice." *J Virol* 74(22): 10807-10810.
- Kawaguchi, A. and K. Nagata (2007). "De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM." *EMBO J* 26(21): 4566-4575.
- Kawaoka, Y., S. Krauss and R. G. Webster (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." *J Virol* 63(11): 4603-4608.
- Kawaoka, Y., C. W. Naeve and R. G. Webster (1984). "Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin?" *Virology* 139(2): 303-316.
- Kawaoka, Y. and R. G. Webster (1988). "Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(2): 324-328.
- Kawaoka, Y., S. Yamnikova, T. M. Chambers, D. K. Lvov and R. G. Webster (1990). "Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus." *Virology* 179(2): 759-767.
- Kendal, A. P., M. P. Kiley and H. F. Maassab (1973). "Comparative studies of wild-type and "cold-mutant" (temperature-sensitive) influenza viruses: polypeptide synthesis by an Asian (H2N2) strain and its cold-adapted variant." *J Virol* 12(6): 1503-1511.
- Khatchikian, D., M. Orlich and R. Rott (1989). "Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus." *Nature* 340(6229): 156-157.
- Klenk, H. D. and W. Garten (1994). "Host cell proteases controlling virus pathogenicity." *Trends Microbiol* 2(2): 39-43.
- Klenk, H. D. and R. Rott (1988). "The molecular biology of influenza virus pathogenicity." *Adv Virus Res* 34: 247-281.
- Klenk, H. D., R. Rott, M. Orlich and J. Blodorn (1975). "Activation of influenza A viruses by trypsin treatment." *Virology* 68(2): 426-439.
- Klopfleisch, R., P. U. Wolf, W. Uhl, S. Gerst, T. Harder, E. Starick, T. W. Vahlenkamp, T. C. Mettenleiter and J. P. Teifke (2007). "Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in

- domestic cats after presumptive infection by wild birds." *Vet Pathol* 44(3): 261-268.
- Klumpp, K., R. W. Ruigrok, F. Baudin (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *EMBO J.* 16(6):1248-57.
- Kochs, G., A. Garcia-Sastre and L. Martinez-Sobrido (2007). "Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein." *J Virol* 81(13): 7011-7021.
- Konig, R., S. Stertz, Y. Zhou, A. Inoue, H. H. Hoffmann, S. Bhattacharyya, J. G. Alamares, D. M. Tscherne, M. B. Ortigoza, Y. Liang, Q. Gao, S. E. Andrews, S. Bandyopadhyay, P. De Jesus, B. P. Tu, L. Pache, C. Shih, A. Orth, G. Bonamy, L. Miraglia, T. Ideker, A. Garcia-Sastre, J. A. Young, P. Palese, M. L. Shaw and S. K. Chanda (2010). "Human host factors required for influenza virus replication." *Nature* 463(7282): 813-817.
- Kreibich, A., J. Stech, T. C. Mettenleiter and O. Stech (2009). "Simultaneous one-tube full-length amplification of the NA, NP, M, and NS genes of influenza A viruses for reverse genetics." *J Virol Methods* 159(2): 308-310.
- Kreijtz, J. H., Y. Suezter, G. van Amerongen, G. de Mutsert, B. S. Schnierle, J. M. Wood, T. Kuiken, R. A. Fouchier, J. Lower, A. D. Osterhaus, G. Sutter and G. F. Rimmelzwaan (2007). "Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1." *J Infect Dis* 195(11): 1598-1606.
- Krug, R. M., B. A. Broni and M. Bouloy (1979). "Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?" *Cell* 18(2): 329-334.
- Kundu, A., R. T. Avalos, C. M. Sanderson and D. P. Nayak (1996). "Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells." *J Virol* 70(9): 6508-6515.
- Kuwano, K., M. Tamura and F. A. Ennis (1990). "Cross-reactive protection against influenza A virus infections by an NS1-specific CTL clone." *Virology* 178(1): 174-179.
- Labadie, K., E. Dos Santos Afonso, M. A. Rameix-Welti, S. van der Werf and N. Naffakh (2007). "Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells." *Virology* 362(2): 271-282.

- Lauring, A. S. and R. Andino (2010). "Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses." *PLoS Pathog* 6(7): e1001005.
- Layton, S. L., D. R. Kapczynski, S. Higgins, J. Higgins, A. D. Wolfenden, K. A. Liljebjelke, W. G. Bottje, D. Swayne, L. R. Berghman, Y. M. Kwon, B. M. Hargis and K. Cole (2009). "Vaccination of chickens with recombinant Salmonella expressing M2e and CD154 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge." *Poult Sci* 88(11): 2244-2252.
- Lee, C. W. and D. L. Suarez (2005). "Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination." *Anim Health Res Rev* 6(1): 1-15.
- Lee, C. W., K. Jung, S. J. Jadhao and D. L. Suarez (2008). "Evaluation of chicken-origin (DF-1) and quail-origin (QT-6) fibroblast cell lines for replication of avian influenza viruses." *J Virol Methods* 153(1): 22-28.
- Li, O. T., M. C. Chan, C. S. Leung, R. W. Chan, Y. Guan, J. M. Nicholls and L. L. Poon (2009). "Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation." *PLoS One* 4(5): e5658.
- Li, X. and P. Palese (1992). "Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis." *J Virol* 66(7): 4331-4338.
- Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu and H. Chen (2006). "The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses." *J Virol* 80(22): 11115-11123.
- Liang, Y., Y. Hong and T. G. Parslow (2005). "cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments." *J Virol* 79(16): 10348-10355.
- Liang, Y., T. Huang, H. Ly and T. G. Parslow (2008). "Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments." *J Virol* 82(1): 229-236.
- Lichty, J. J., J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz and S. Tan (2005). "Comparison of affinity tags for protein purification." *Protein Expr Purif* 41(1): 98-105.

- Lin, S., H. Y. Naim, A. C. Rodriguez and M. G. Roth (1998). "Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells." *J Cell Biol* 142(1): 51-57.
- Lipatov, A. S., E. A. Govorkova, R. J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon and R. G. Webster (2004). "Influenza: emergence and control." *J Virol* 78(17): 8951-8959.
- Liu, T., J. Muller and Z. Ye (2002). "Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology." *Virology* 304(1): 89-96.
- Lowy, R. J. (2003). "Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms." *Int Rev Immunol* 22(5-6): 425-449.
- Lu, X., L. E. Edwards, J. A. Desheva, D. C. Nguyen, A. Rekstin, I. Stephenson, K. Szretter, N. J. Cox, L. G. Rudenko, A. Klimov and J. M. Katz (2006). "Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses." *Vaccine* 24(44-46): 6588-6593.
- Ludwig, S., X. Wang, C. Ehrhardt, H. Zheng, N. Donelan, O. Planz, S. Pleschka, A. Garcia-Sastre, G. Heins and T. Wolff (2002). "The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors." *J Virol* 76(21): 11166-11171.
- Lycett, S. J., M. J. Ward, F. I. Lewis, A. F. Poon, S. L. Kosakovsky Pond and A. J. Brown (2009). "Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data." *J Virol* 83(19): 9901-9910.
- Mackenzie, C. D., P. M. Taylor and B. A. Askonas (1989). "Rapid recovery of lung histology correlates with clearance of influenza virus by specific CD8+ cytotoxic T cells." *Immunology* 67(3): 375-381.
- Marion, R. M., T. Zurcher, S. de la Luna and J. Ortin (1997). "Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo." *J Gen Virol* 78 (Pt 10): 2447-2451.
- Marsh, M, A. Helenius (1989). "Virus entry into animal cells" *Adv Virus Res.* 36:107-51.

- Marsh, G. A., R. Rabadan, A. J. Levine and P. Palese (2008). "Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging." *J Virol* 82(5): 2295-2304.
- Martin, K. and A. Helenius (1991). "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." *Cell* 67(1): 117-130.
- Masic, A., L. A. Babiuk and Y. Zhou (2009a). "Reverse genetics-generated elastase-dependent swine influenza viruses are attenuated in pigs." *J Gen Virol* 90(Pt 2): 375-385.
- Masic, A., J. S. Booth, G. K. Mutwiri, L. A. Babiuk and Y. Zhou (2009b). "Elastase-dependent live attenuated swine influenza A viruses are immunogenic and confer protection against swine influenza A virus infection in pigs." *J Virol* 83(19): 10198-10210.
- Martín-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, J. Ortín (2001). "Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle." *EMBO Rep.* 2(4):313-7.
- Massin, P., S. van der Werf and N. Naffakh (2001). "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses." *J Virol* 75(11): 5398-5404.
- Mast, J., B. M. Goddeeris, K. Peeters, F. Vandesande and L. R. Berghman (1998). "Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01." *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 343-357.
- Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius, K. Simons (1982). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." *J Cell Biol* 91(3 Pt 1):601-13.
- Matrosovich, M., H. D. Klenk, J. Stech (2009). "Influenza receptors, polymerase and host range." *Rev Sci Tech* 28(1):203-17.
- Matrosovich, M., T. Matrosovich, J. Carr, N. A. Roberts and H. D. Klenk (2003a). "Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors." *J Virol* 77(15): 8418-8425.
- Matrosovich, M., T. Matrosovich, J. Uhendorff, W. Garten and H. D. Klenk (2007). "Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium." *Virology* 361(2): 384-390.

- Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, H. D. Klenk (2003b). "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium." *Proc Natl Acad Sci USA* 101(13):4620-4.
- Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka and R. Webster (1999). "The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties." *J Virol* 73(2): 1146-1155.
- Mayer, D., K. Molawi, L. Martinez-Sobrido, A. Ghanem, S. Thomas, S. Baginsky, J. Grossmann, A. Garcia-Sastre and M. Schwemmle (2007). "Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches." *J Proteome Res* 6(2): 672-682.
- Mazur, I., D. Anhlan, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert and S. Ludwig (2008). "The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein." *Cell Microbiol* 10(5): 1140-1152.
- McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell and J. A. McCullers (2007). "Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia." *Cell Host Microbe* 2(4): 240-249.
- McAuley, J. L., K. Zhang and J. A. McCullers (2010). "The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis." *J Virol* 84(1): 558-564.
- McNulty, M. S., G. M. Allan and B. M. Adair (1986). "Efficacy of avian influenza neuraminidase-specific vaccines in chickens." *Avian Pathol* 15(1): 107-115.
- Mecham, R. P., T. J. Broekelmann, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, H. G. Welgus, R. M. Senior (1997). "Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastaolysis." *J Biol Chem* 272(29):18071-6.
- Medcalf, L., E. Poole, D. Elton and P. Digard (1999). "Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein." *J Virol* 73(9): 7349-7356.
- Mehle, A. and J. A. Doudna (2008). "An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase." *Cell Host Microbe* 4(2): 111-122.

- Mibayashi, M., L. Martinez-Sobrido, Y. M. Loo, W. B. Cardenas, M. Gale, Jr. and A. Garcia-Sastre (2007). "Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus." *J Virol* 81(2): 514-524.
- Min, J. Y. and R. M. Krug (2006). "The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7100-7105.
- Min, J. Y., S. Li, G. C. Sen and R. M. Krug (2007). "A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis." *Virology* 363(1): 236-243.
- Miotto, O., A. T. Heiny, R. Albrecht, A. Garcia-Sastre, T. W. Tan, J. T. August and V. Brusica (2010). "Complete-proteome mapping of human influenza A adaptive mutations: implications for human transmissibility of zoonotic strains." *PLoS One* 5(2): e9025.
- Mitnaul, L. J., M. N. Matrosovich, M. R. Castrucci, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, D. Kobasa and Y. Kawaoka (2000). "Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus." *J Virol* 74(13): 6015-6020.
- Momose, F., C. F. Basler, R. E. O'Neill, A. Iwamatsu, P. Palese and K. Nagata (2001). "Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis." *J Virol* 75(4): 1899-1908.
- Momose, F., T. Naito, K. Yano, S. Sugimoto, Y. Morikawa and K. Nagata (2002). "Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis." *J Biol Chem* 277(47): 45306-45314.
- Moncorge, O., M. Mura and W. S. Barclay (2010). "Evidence for avian and human host cell factors that affect the activity of influenza virus polymerase." *J Virol* 84(19): 9978-9986.
- Munier, S., T. Larcher, F. Cormier-Aline, D. Soubieux, B. Su, L. Guigand, B. Labrosse, Y. Cherel, P. Quere, D. Marc and N. Naffakh (2010). "A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens." *J Virol* 84(2): 940-952.

- Munster, V. J., E. J. Schrauwen, E. de Wit, J. M. van den Brand, T. M. Bestebroer, S. Herfst, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2010). "Insertion of a multibasic cleavage motif into the hemagglutinin of a low-pathogenic avian influenza H6N1 virus induces a highly pathogenic phenotype." *J Virol* 84(16): 7953-7960.
- Muramoto, Y., A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida and Y. Kawaoka (2006). "Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions." *J Virol* 80(5): 2318-2325.
- Naffakh, N., P. Massin, N. Escriou, B. Crescenzo-Chaigne and S. van der Werf (2000). "Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses." *J Gen Virol* 81(Pt 5): 1283-1291.
- Naffakh, N., A. Tomoiu, M. A. Rameix-Welti and S. van der Werf (2008). "Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins." *Annu Rev Microbiol* 62: 403-424.
- Naito, T., F. Momose, A. Kawaguchi and K. Nagata (2007). "Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits." *J Virol* 81(3): 1339-1349.
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou and S. Barman (2009). "Influenza virus morphogenesis and budding." *Virus Res* 143(2): 147-161.
- Nemeroff, M. E., S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller and R. M. Krug (1998). "Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs." *Mol Cell* 1(7): 991-1000.
- Neumann, G., M. T. Hughes and Y. Kawaoka (2000). "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." *EMBO J* 19(24): 6751-6758.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka (2006). "Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic." *Emerg Infect Dis* 12(6): 881-886.
- Neumann, G., T. Noda and Y. Kawaoka (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." *Nature* 459(7249): 931-939.
- Nicholls, J. M., R. W. Chan, R. J. Russell, G. M. Air and J. S. Peiris (2008). "Evolving complexities of influenza virus and its receptors." *Trends Microbiol* 16(4): 149-157.

- Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng and Y. Kawaoka (2006). "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* 439(7075): 490-492.
- Obayashi, E., H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata, J. R. Tame and S. Y. Park (2008). "The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase." *Nature* 454(7208): 1127-1131.
- Office International des Epizooties (OIE). http://www.oie.int/eng/en_index.htm
- O'Neill, R. E., J. Talon and P. Palese (1998). "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins." *EMBO J* 17(1): 288-296.
- Ogasawara, T., B. Gotoh, H. Suzuki, J. Asaka, K. Shimokata, R. Rott and Y. Nagai (1992). "Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo." *EMBO J* 11(2): 467-472.
- Ohtsu, Y., Y. Honda, Y. Sakata, H. Kato, T. Toyoda (2002). "Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase." *Microbiol Immunol* 46(3):167-75.
- Orlich, M., D. Linder, R. Rott (1995). „Trypsin-resistant protease activation mutants of an influenza virus.“ *J Gen Virol* 76 (Pt 3):625-33.
- Ortega, J., J. Martin-Benito, T. Zurcher, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2000). "Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification." *J Virol* 74(1): 156-163.
- Palese, P. (2004). "Influenza: old and new threats." *Nat Med* 10(12 Suppl): S82-87.
- Palese, P. (2006). "Making better influenza virus vaccines?" *Emerg Infect Dis* 12(1): 61-65.
- Palese P. and Shaw M. L. (2006). "Orthomyxoviridae: the viruses and their replication" In Knipe D. M., Howley P. M., eds. *Fields Virology* 5th edition
- Palese, P. and A. Garcia-Sastre (2002). "Influenza vaccines: present and future." *J Clin Invest* 110(1): 9-13.
- Palese, P. and J. F. Young (1982). "Variation of influenza A, B, and C viruses." *Science* 215(4539): 1468-1474.
- Pappas, C., P. V. Aguilar, C. F. Basler, A. Solorzano, H. Zeng, L. A. Perrone, P. Palese, A. Garcia-Sastre, J. M. Katz and T. M. Tumpey (2008). "Single gene reassortants

- identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 3064-3069.
- Park, M. S., J. Steel, A. Garcia-Sastre, D. Swayne and P. Palese (2006). "Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8203-8208.
- Parvin, J. D., P. Palese, A. Honda, A. Ishihama and M. Krystal (1989). "Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase." *J Virol* 63(12): 5142-5152.
- Pasick, J., K. Handel, J. Robinson, J. Copps, D. Ridd, K. Hills, H. Kehler, C. Cottam-Birt, J. Neufeld, Y. Berhane and S. Czub (2005). "Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia." *J Gen Virol* 86(Pt 3): 727-731.
- Peiris, J. S., M. D. de Jong and Y. Guan (2007). "Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health." *Clin Microbiol Rev* 20(2): 243-267.
- Perdue, M. L., M. Garcia, D. Senne and M. Fraire (1997). "Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses." *Virus Res* 49(2): 173-186.
- Perez, D. R. and R. O. Donis (1995). "A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA." *J Virol* 69(11): 6932-6939.
- Perez, D. R. and R. O. Donis (2001). "Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity." *J Virol* 75(17): 8127-8136.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger and R. A. Lamb (1992). "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." *Cell* 69(3): 517-528.
- Ponimaskin, E. and M. F. Schmidt (1998). "Domain-structure of cytoplasmic border region is main determinant for palmitoylation of influenza virus hemagglutinin (H7)." *Virology* 249(2): 325-335.
- Poon, L. L., D. C. Pritlove, J. Sharps and G. G. Brownlee (1998). "The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA." *J Virol* 72(10): 8214-8219.
- Portela, A. and P. Digard (2002). "The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication." *J Gen Virol* 83(Pt 4): 723-734.

- Presti, R. M., G. Zhao, W. L. Beatty, K. A. Mihindukulasuriya, A. P. da Rosa, V. L. Popov, R. B. Tesh, H. W. Virgin and D. Wang (2009). "Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae." *J Virol* 83(22): 11599-11606.
- Qiu, Y. and R. M. Krug (1994). "The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A)." *J Virol* 68(4): 2425-2432.
- Rameix-Welti, M. A., A. Tomoiu, E. Dos Santos Afonso, S. van der Werf and N. Naffakh (2009). "Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection." *J Virol* 83(3): 1320-1331.
- Read, E. K. and P. Digard (2010). "Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export." *J Gen Virol* 91(Pt 5): 1290-1301.
- Reese, S., G. Dalamani and B. Kaspers (2006). "The avian lung-associated immune system: a review." *Vet Res* 37(3): 311-324.
- Resa-Infante, P., N. Jorba, N. Zamarreno, Y. Fernandez, S. Juarez and J. Ortin (2008). "The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication." *PLoS One* 3(12): e3904.
- Richt, J. A. and A. Garcia-Sastre (2009). "Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins." *Curr Top Microbiol Immunol* 333: 177-195.
- Richt, J. A., P. Lekcharoensuk, K. M. Lager, A. L. Vincent, C. M. Loiacono, B. H. Janke, W. H. Wu, K. J. Yoon, R. J. Webby, A. Solorzano and A. Garcia-Sastre (2006). "Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine." *J Virol* 80(22): 11009-11018.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol* 17(10): 1030-1032.
- Rimmelzwaan, G. F., A. C. Boon, M. M. Geelhoed-Mieras, J. T. Voeten, R. A. Fouchier and A. D. Osterhaus (2004). "Human airway epithelial cells present antigen to influenza virus-specific CD8+ CTL inefficiently after incubation with viral protein together with ISCOMATRIX." *Vaccine* 22(21-22): 2769-2775.

- Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez and A. Nieto (2007). "Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II." *J Virol* 81(10): 5315-5324.
- Rogers, G. N. and J. C. Paulson (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(2): 361-373.
- Rossman, J. S., X. Jing, G. P. Leser and R. A. Lamb (2010). "Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission." *Cell* 142(6): 902-913.
- Ruigrok, R. W. and F. Baudin (1995). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles." *J Gen Virol* 76 (Pt 4): 1009-1014.
- Sakaguchi, T., G. P. Leser and R. A. Lamb (1996). "The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus." *J Cell Biol* 133(4): 733-747.
- Salomon, R., J. Franks, E. A. Govorkova, N. A. Ilyushina, H. L. Yen, D. J. Hulse-Post, J. Humberd, M. Trichet, J. E. Rehg, R. J. Webby, R. G. Webster and E. Hoffmann (2006). "The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04." *J Exp Med* 203(3): 689-697.
- Salomon, R. and R. G. Webster (2009). "The influenza virus enigma." *Cell* 136(3): 402-410.
- Schauer, R. (2000). "Achievements and challenges of sialic acid research." *Glycoconj J* 17(7-9): 485-499.
- Schmidt, T. G. and A. Skerra (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." *Nat Protoc* 2(6): 1528-1535.
- Schmitt, A. P. and R. A. Lamb (2005). "Influenza virus assembly and budding at the viral budzone." *Adv Virus Res* 64: 383-416.
- Scholtissek, C., W. Rohde, V. Von Hoyningen and R. Rott (1978). "On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2." *Virology* 87(1): 13-20.
- Scholtissek, C., H. Burger, O. Kistner and K. F. Shortridge (1985). "The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses." *Virology* 147(2): 287-294.

- Schroeder, C., H. Heider, E. Moncke-Buchner and T. I. Lin (2005). "The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein." *Eur Biophys J* 34(1): 52-66.
- Schultz-Cherry, S., J. K. Dybing, N. L. Davis, C. Williamson, D. L. Suarez, R. Johnston and M. L. Perdue (2000). "Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses." *Virology* 278(1): 55-59.
- Senne, D. A., B. Panigrahy, Y. Kawaoka, J. E. Pearson, J. Suss, M. Lipkind, H. Kida and R. G. Webster (1996). "Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential." *Avian Dis* 40(2): 425-437.
- Seo, S. H., E. Hoffmann and R. G. Webster (2002). "Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses." *Nat Med* 8(9): 950-954.
- Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr. and R. M. Krug (1987). "Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs." *J Virol* 61(3): 764-773.
- Sharma, J. M., Y. Zhang, D. Jensen, S. Rautenschlein and H. Y. Yeh (2002). "Field trial in commercial broilers with a multivalent in ovo vaccine comprising a mixture of live viral vaccines against Marek's disease, infectious bursal disease, Newcastle disease, and fowl pox." *Avian Dis* 46(3): 613-622.
- Shaw, M. L., K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek and P. Palese (2008). "Cellular proteins in influenza virus particles." *PLoS Pathog* 4(6): e1000085.
- Shinya, K., M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, Y. Kawaoka (2006). "Avian flu: influenza virus receptors in the human airway." *Nature* 40(7083):435-6.
- Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, D. C. Wiley (1982). "Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(4):968-72.
- Skehel, J. J., M. D. Waterfield (1975). "Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1):93-7.
- Skerra, A. and T. G. Schmidt (2000). "Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins." *Methods Enzymol* 326: 271-304.

- Skerra, A. (2003). „Das *Strep*-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung“. *BIOspektrum* 02/03 9. Jahrgang
- Skiba, M., T. C. Mettenleiter and A. Karger (2008). "Quantitative whole-cell proteome analysis of pseudorabies virus-infected cells." *J Virol* 82(19): 9689-9699.
- Sleeman, K., V. P. Mishin, V. M. Deyde, Y. Furuta, A. I. Klimov and L. V. Gubareva (2010). "In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses." *Antimicrob Agents Chemother* 54(6): 2517-2524.
- Smith, G. L. and A. J. Hay (1982). "Replication of the influenza virus genome." *Virology* 118(1): 96-108.
- Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghwani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan and A. Rambaut (2009). "Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic." *Nature* 459(7250): 1122-1125.
- Snyder, M. H., R. F. Betts, D. DeBorde, E. L. Tierney, M. L. Clements, D. Herrington, S. D. Sears, R. Dolin, H. F. Maassab and B. R. Murphy (1988). "Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines." *J Virol* 62(2): 488-495.
- Song, H., G. R. Nieto and D. R. Perez (2007). "A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates." *J Virol* 81(17): 9238-9248.
- Spackman, E., D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum and D. L. Suarez (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(9): 3256-3260.
- Stech, J., H. Garn, M. Wegmann, R. Wagner and H. D. Klenk (2005). "A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin." *Nat Med* 11(6): 683-689.
- Stech, J., O. Stech, A. Herwig, H. Altmepfen, J. Hundt, S. Gohrbandt, A. Kreibich, S. Weber, H. D. Klenk and T. C. Mettenleiter (2008). "Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification." *Nucleic Acids Res* 36(21): e139.

- Stech, O., J. Veits, S. Weber, D. Deckers, D. Schroer, T. W. Vahlenkamp, A. Breithaupt, J. Teifke, T. C. Mettenleiter and J. Stech (2009). "Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain." *J Virol* 83(11): 5864-5868.
- Steel, J., A. C. Lowen, L. Pena, M. Angel, A. Solorzano, R. Albrecht, D. R. Perez, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2009). "Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza." *J Virol* 83(4): 1742-1753.
- Steel, J., A. C. Lowen, T. Wang, M. Yondola, Q. Gao, K. Haye, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2010). "Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain." *MBio* 1(1).
- Steensels, M., S. Van Borm, B. Lambrecht, J. De Vriese, F. X. Le Gros, M. Bublot and T. van den Berg (2007). "Efficacy of an inactivated and a fowlpox-vectored vaccine in Muscovy ducks against an Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viral challenge." *Avian Dis* 51(1 Suppl): 325-331.
- Steinhauer, D. A. (1999). "Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus." *Virology* 258(1):1-20.
- Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk and W. Garten (1992). "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." *EMBO J* 11(7): 2407-2414.
- Suarez, D. L., D. A. Senne, J. Banks, I. H. Brown, S. C. Essen, C. W. Lee, R. J. Manvell, C. Mathieu-Benson, V. Moreno, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, H. Rojas, E. Spackman and D. J. Alexander (2004). "Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile." *Emerg Infect Dis* 10(4): 693-699.
- Subbarao, E. K., W. London and B. R. Murphy (1993a). "A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range." *J Virol* 67(4): 1761-1764.
- Subbarao, E. K., Y. Kawaoka and B. R. Murphy (1993b). "Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation." *J Virol* 67(12): 7223-7228.
- Subbarao, E. K., E. J. Park, C. M. Lawson, A. Y. Chen and B. R. Murphy (1995). "Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity

- and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine." *J Virol* 69(10): 5969-5977.
- Subbarao, K. and J. Katz (2000). "Avian influenza viruses infecting humans." *Cell Mol Life Sci* 57(12): 1770-1784.
- Suguitan, A. L., Jr., J. McAuliffe, K. L. Mills, H. Jin, G. Duke, B. Lu, C. J. Luke, B. Murphy, D. E. Swayne, G. Kemble and K. Subbarao (2006). "Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets." *PLoS Med* 3(9): e360.
- Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-195.
- Suzuki, Y., T. Ito, T. Suzuki, R. E. Holland Jr, T. M. Chambers, M. Kiso, H. Ishida, Y. Kawaoka (2000). „Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses.“ *J Virol* 74(24):11825-31.
- Swayne, D. E., J. R. Beck and N. Kinney (2000). "Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine." *Avian Dis* 44(1): 132-137.
- Swayne, D. E. and D. Kapczynski (2008). "Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds." *Immunol Rev* 225: 314-331.
- Swayne, D. E. and M. Pantin-Jackwood (2006). "Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry." *Dev Biol (Basel)* 124: 61-67.
- Swenson, D. L., K. L. Warfield, T. K. Warren, C. Lovejoy, J. N. Hassinger, G. Ruthel, R. E. Blouch, H. M. Moulton, D. D. Weller, P. L. Iversen and S. Bavari (2009). "Chemical modifications of antisense morpholino oligomers enhance their efficacy against Ebola virus infection." *Antimicrob Agents Chemother* 53(5): 2089-2099.
- Sylte, M. J., B. Hubby and D. L. Suarez (2007). "Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection." *Vaccine* 25(19): 3763-3772.
- Takeda, M., A. Pekosz, K. Shuck, L. H. Pinto and R. A. Lamb (2002). "Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture." *J Virol* 76(3): 1391-1399.

- Talon, J., C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese and A. Garcia-Sastre (2000a). "Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein." *J Virol* 74(17): 7989-7996.
- Talon, J., M. Salvatore, R. E. O'Neill, Y. Nakaya, H. Zheng, T. Muster, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2000b). "Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4309-4314.
- Tamuri, A. U., M. Dos Reis, A. J. Hay and R. A. Goldstein (2009). "Identifying changes in selective constraints: host shifts in influenza." *PLoS Comput Biol* 5(11): e1000564.
- Taubenberger, J. K. (2005a). "The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma." *Arch Virol Suppl*(19): 101-115.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin and T. G. Fanning (2005b). "Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes." *Nature* 437(7060): 889-893.
- Taubenberger, J. K. and J. C. Kash (2010). "Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation." *Cell Host Microbe* 7(6): 440-451.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol* 60(5): 523-533.
- Tompkins, S. M., Z. S. Zhao, C. Y. Lo, J. A. Mispelon, T. Liu, Z. Ye, R. J. Hogan, Z. Wu, K. A. Benton, T. M. Tumpey and S. L. Epstein (2007). "Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1." *Emerg Infect Dis* 13(3): 426-435.
- Toro, H., D. C. Tang, D. L. Suarez, M. J. Sylte, J. Pfeiffer and K. R. Van Kampen (2007). "Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector." *Vaccine* 25(15): 2886-2891.
- Toro, H., D. C. Tang, D. L. Suarez, J. Zhang and Z. Shi (2008). "Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine." *Vaccine* 26(21): 2640-2646.
- Toyoda, T., D. M. Adyshev, M. Kobayashi, A. Iwata, A. Ishihama (1996). "Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites." *J Gen Virol* 77(Pt 9):2149-57.
- Tumpey, T. M., C. F. Basler, P. V. Aguilar, H. Zeng, A. Solorzano, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, J. K. Taubenberger, P. Palese and A. Garcia-Sastre (2005a).

- "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus." *Science* 310(5745): 77-80.
- Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, J. K. Taubenberger, P. Palese, D. E. Swayne, M. J. Pantin-Jackwood, S. Schultz-Cherry, A. Solorzano, N. Van Rooijen, J. M. Katz and C. F. Basler (2005b). "Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice." *J Virol* 79(23): 14933-14944.
- Tumpey, T. M., D. R. Kapczynski and D. E. Swayne (2004). "Comparative susceptibility of chickens and turkeys to avian influenza A H7N2 virus infection and protective efficacy of a commercial avian influenza H7N2 virus vaccine." *Avian Dis* 48(1): 167-176.
- Twu, K. Y., R. L. Kuo, J. Marklund and R. M. Krug (2007). "The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells." *J Virol* 81(15): 8112-8121.
- van der Laan, J. W., C. Herberts, R. Lambkin-Williams, A. Boyers, A. J. Mann and J. Oxford (2008). "Animal models in influenza vaccine testing." *Expert Rev Vaccines* 7(6): 783-793.
- Veit, M. and M. F. Schmidt (2006). "Palmitoylation of influenza virus proteins." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119(3-4): 112-122.
- Veits, J., D. Luschow, K. Kindermann, O. Werner, J. P. Teifke, T. C. Mettenleiter and W. Fuchs (2003). "Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague." *J Gen Virol* 84(Pt 12): 3343-3352.
- Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung): <http://bundesrecht.juris.de/geflpestschr/BJNR234800007.html>
- Vester, D., E. Rapp, D. Gade, Y. Genzel and U. Reichl (2009). "Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines." *Proteomics* 9(12): 3316-3327.
- von Mering, C., R. Krause, B. Snel, M. Cornell, S. G. Oliver, S. Fields and P. Bork (2002). "Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions." *Nature* 417(6887): 399-403.

- Vreede, F. T., A. Y. Chan, J. Sharps and E. Fodor (2010). "Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells." *Virology* 396(1): 125-134.
- Vreede, F. T., T. E. Jung and G. G. Brownlee (2004). "Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates." *J Virol* 78(17): 9568-9572.
- Wagner, R., M. Matrosovich and H. D. Klenk (2002). "Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections." *Rev Med Virol* 12(3): 159-166.
- Wakenell, P. S., T. Bryan, J. Schaeffer, A. Avakian, C. Williams and C. Whitfill (2002). "Effect of in ovo vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys/SB-1 efficacy and viremia." *Avian Dis* 46(2): 274-280.
- Walker, J. A., T. Sakaguchi, Y. Matsuda, T. Yoshida and Y. Kawaoka (1992). "Location and character of the cellular enzyme that cleaves the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus." *Virology* 190(1): 278-287.
- Wan, H. and D. R. Perez (2006). "Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses." *Virology* 346(2): 278-286.
- Wang, P., P. Palese and R. E. O'Neill (1997). "The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." *J Virol* 71(3): 1850-1856.
- Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg and A. Garcia-Sastre (2000). "Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon." *J Virol* 74(24): 11566-11573.
- Wang, L., D. L. Suarez, M. Pantin-Jackwood, M. Mibayashi, A. Garcia-Sastre, Y. M. Saif and C. W. Lee (2008). "Characterization of influenza virus variants with different sizes of the non-structural (NS) genes and their potential as a live influenza vaccine in poultry." *Vaccine* 26(29-30): 3580-3586.
- Wasilenko, J. L., C. W. Lee, L. Sarmiento, E. Spackman, D. R. Kapczynski, D. L. Suarez and M. J. Pantin-Jackwood (2008). "NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens." *J Virol* 82(9): 4544-4553.

- Wasilenko, J. L., L. Sarmiento and M. J. Pantin-Jackwood (2009). "A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens." *Arch Virol* 154(6): 969-979.
- Watanabe, T., S. Watanabe, H. Ito, H. Kida and Y. Kawaoka (2001). "Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity." *J Virol* 75(12): 5656-5662.
- Watanabe T., S. Watanabe, Y. Kawaoka (2010). "Cellular networks involved into the influenza virus life cycle." *Cell Host Microbe* 7(6):427-39.
- Watanabe, T., S. Watanabe, H. Kida and Y. Kawaoka (2002). "Influenza A virus with defective M2 ion channel activity as a live vaccine." *Virology* 299(2): 266-270.
- Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii and Y. Kawaoka (2003). "Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes." *J Virol* 77(19): 10575-10583.
- Waugh, D. S. (2005). "Making the most of affinity tags." *Trends Biotechnol* 23(6): 316-320.
- Webster, R. G. (2004). "Wet markets--a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza?" *Lancet* 363(9404): 234-236.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers and Y. Kawaoka (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* 56(1): 152-179.
- Webster, R. G., G. B. Sharp and E. C. Claas (1995). "Interspecies transmission of influenza viruses." *Am J Respir Crit Care Med* 152(4 Pt 2): S25-30.
- Wei, C. J., J. C. Boyington, P. M. McTamney, W. P. Kong, M. B. Pearce, L. Xu, H. Andersen, S. Rao, T. M. Tumpey, Z. Y. Yang and G. J. Nabel (2010). "Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination." *Science* 329(5995): 1060-1064.
- Wharton, S. A., R. B. Belshe, J. J. Skehel and A. J. Hay (1994). "Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine." *J Gen Virol* 75 (Pt 4): 945-948.
- White, J., J. Kartenbeck, A. Helenius (1982). "Membrane fusion activity of influenza virus." *EMBO J* 1(2):217-22.
- Whittaker, G., M. Bui and A. Helenius (1996). "The role of nuclear import and export in influenza virus infection." *Trends Cell Biol* 6(2): 67-71.

- Whittaker, G., I. Kemler and A. Helenius (1995). "Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein, M1, causes its retention in the nucleus." *J Virol* 69(1): 439-445.
- WHO (1982).
http://whqlibdoc.who.int/publications/1982/a86910_partA.pdf
- WHO (2009a).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- WHO (2009b).
http://www.wpro.who.int/vietnam/sites/dcc/pandemic_flu/
- WHO (2009c).
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_31/en/index.html
- WHO (2010a).
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>
- WHO (2010b).
http://www.who.int/csr/don/2010_06_25/en/index.html
- Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay and P. Digard (2009). "A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA." *J Virol* 83(16): 8021-8031.
- Wong, E. H., D. K. Smith, R. Rabadan, M. Peiris and L. L. Poon (2010). "Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. Codon Usage Biases of Influenza Virus." *BMC Evol Biol* 10: 253.
- Wright P. F., Neumann G., Kawaoka Y. (2001). "*Orthomyxoviruses*" in Fields Virology 4th edition
- Wu, R., Z. Sui, Z. Liu, W. Liang, K. Yang, Z. Xiong and D. Xu (2010a). "Transmission of avian H9N2 influenza viruses in a murine model." *Vet Microbiol* 142(3-4): 211-216.
- Wu, W. W. and N. Pante (2009). "The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein." *Virol J* 6: 68.

- Wu, W. W., Y. H. Sun and N. Pante (2007). "Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein." *Virology* 4: 49.
- Wu, Z., L. Rothwell, J. R. Young, J. Kaufman, C. Butter and P. Kaiser (2010b). "Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells." *Immunology* 129(1): 133-145.
- Wunderlich, K., D. Mayer, C. Ranadheera, A. S. Holler, B. Manz, A. Martin, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, U. Kessler and M. Schwemmler (2009). "Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication." *PLoS One* 4(10): e7517.
- Wunderlich, K., M. Juozapaitis, C. Ranadheera, U. Kessler, A. Martin, J. Eisel, U. Beutling, R. Frank, M. Schwemmler (2010). "Identification of high-affinity PB1-derived peptides with enhanced affinity to the PA protein of the influenza A virus polymerase." *Antimicrob Agents Chemother* [Epub ahead of print]
- Ye, Z., D. Robinson and R. R. Wagner (1995). "Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus." *J Virol* 69(3): 1964-1970.
- Young, K. H. (1998). "Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time." *Biol Reprod* 58(2): 302-311.
- Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang and P. Palese (2005). "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1." *PLoS Pathog* 1(1): e4.
- Zell, R., A. Krumbholz, A. Eitner, R. Krieg, K. J. Halbhuber and P. Wutzler (2007). "Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses." *J Gen Virol* 88(Pt 2): 536-546.
- Zhirnov, O. P. (1992). "Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent." *Virology* 186(1): 324-330.
- Zhou, H., M. Jin, Z. Yu, X. Xu, Y. Peng, H. Wu, J. Liu, H. Liu, S. Cao and H. Chen (2007). "Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice." *Antiviral Res* 76(2): 186-193.
- Zhu, Q., H. Yang, W. Chen, W. Cao, G. Zhong, P. Jiao, G. Deng, K. Yu, C. Yang, Z. Bu, Y. Kawaoka and H. Chen (2008). "A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens." *J Virol* 82(1): 220-228.

Zielecki, F., I. Semmler, D. Kalthoff, D. Voss, S. Mael, A. D. Gruber, M. Beer and T. Wolff (2010). "Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein." *J Virol* 84(20): 10708-10718.

Abkürzungsverzeichnis

AI	Aviäre Influenza
AIV	aviäres Influenza Virus
ANT3	adenine nukleotide translocator
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BSL	Biosicherheitsstufe (biosafety level)
cDNA	komplementäre DNA
CPE	cytopathischer Effekt
CPSF30	cleavage and polyadenylation specificity factor
CRM1	chromosome region maintenance protein 1
cRNA	komplementäre RNA
Ct	cycle treshold
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DI	defective interfering
DIVA	differentiation of infected from vaccinated animals
dsRNA	doppelsträngige RNA
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Haemagglutinin/Haemagglutinations-Test
HAH	Haemagglutinations-Hemmtest
HPAIV	hoch-pathogene aviäre Influenza Viren (highly pathogenic avian influenza virus)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
ILTV	infektiöses Laryngotracheitis-Virus
IRF-3	Interferon regulierender Faktor 3
IVPI	intravenöser Pathogenitätsindex
LAIV	lebend-attenuierte Influenza Viren
LPAIV	niedrig-pathogene aviäre Influenza Viren (low pathogenic avian influenza virus)

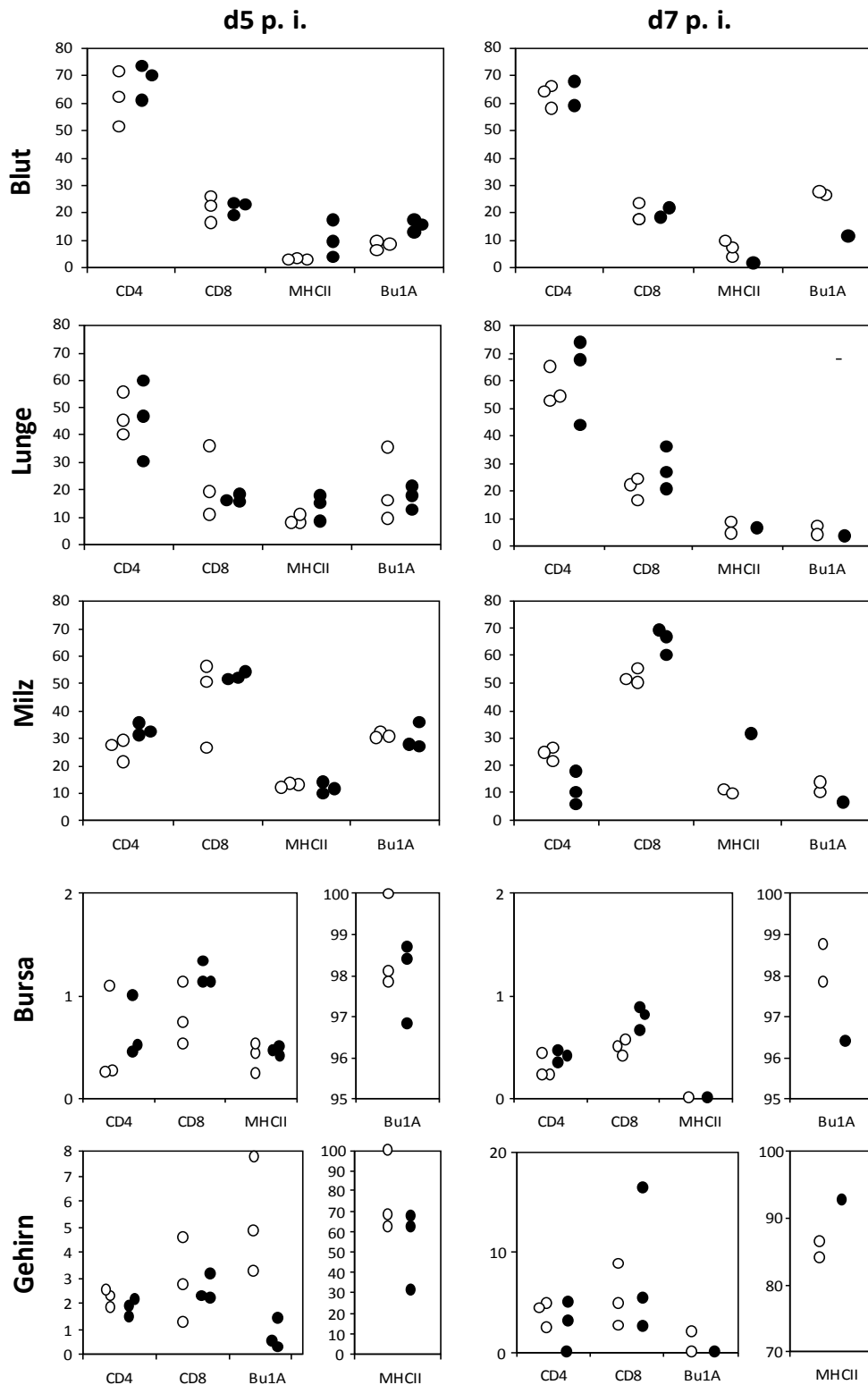
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2 (viraler Ionenkanal)
MBP	Maltose-bindendes Protein
min	Minute
miRNA	micro RNA
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
MTS	mitochondrial targeting site
NA	Neuraminidase
NDV	Newcastle Disease Virus
NEP	nukleäres Exportprotein (nuclear export protein)
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal (nuclear localization signal)
NP	Nukleoprotein
NS1	Nicht-Strukturprotein 1
NS2	Nicht-Strukturprotein 2
Nt	Nukleotid/Nukleotide
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD	optische Dichte
OIE	World Organization for Animal Health
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PA	polymerase acid protein
PABPII	poly(A)-bindendes Protein II
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
p. c.	nach Belastungsinfektion (post challenge)
pfu	Plaque-bildende Einheiten (plaque forming units)
P-Gene	Polymerase-Gene (PB2, PB1, PA)
p. i.	nach Infektion (post infection)
PKR	Proteinkinase R
PRR	Pattern recognition receptor
qRT-PCR	quantitative real-time RT-PCR
RanGTP	GTP assoziierte GTPase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rg	revers-genetisch
RIG-I/IPS-1	Retinoic acid-inducible gene 1 protein/interferon-beta promoter stimulator 1
RNAi	RNA-Interferenz
siRNA	small interfering RNA
s.o.	siehe oben
SOIV	swine originated influenza virus
SPF	spezifisch pathogen frei
-ssRNA	einzelsträngige RNA in negativer Orientierung
TAP	tandem-affinity-purification
TCID ₅₀	Zellkultur-infektiöse Dosis 50
TEV	tobacco etch virus
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
V	Volt
VDAC1	Spannungs-abhängiger Anionen-Kanal (voltage-dependent anion channel)
vRNA	virale RNA
vRNP-Komplex	virale Ribonukleoprotein-Komplexe
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp

Anhang



Anhang 1: Dargestellt ist die prozentuale Zusammensetzung der aus den Organen und dem Blut R65-E-infizierter (weiß) und nicht infizierter (schwarz) Tiere isolierten Lymphozytenpopulationen (CD45high) an den Tagen 5 und 7 p. i.

Anhang 2: Sektionsbefunde der drei Gruppen Kontrolle, 1xR65-E und 2xR65-E nach Belastungsinfektion mit rgR65 bzw. R65-H9_{R66mutR65}

Challenge- Virus	Gruppe	Kammzyanose/ Kammnekrose	Kon- junktivitis	Tracheitis	Lungen- Pneumonie	Pankreatitis	Blutungen im Drüsenmagen	Herzmuskel - Blutung	Petechien am Epikard	gerötete Kloaken -SH**	Bursa- Blutung	ohne Befund
rgR65	Kontrolle	2/10	2/10	2/10	-	3/10	1/10	3/10	-	4/10	2/10	2/10
	1xR65-E	7/10	5/10	3/10	3/10	-	1/10	2/10	3/10	1/10	3/10	-
	2xR65-E	3/10	3/10	2/10	-	2/10	2/10	1/10	-	2/10	1/10	1/10
R65- H9 _{R66mutR65}	Kontrolle	-	1/10	3/10	6/10	2/10	-	1/10	-	-	-	1/10
	1xR65-E	-	1/10	4/10	5/10	6/10	-	-	-	-	-	1/10
	2xR65-E	-	-	2/10	1/10	8/10	1/10	1/10	-	1/10	-	1/10

* SH=Schleimhaut

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Jana Hundt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jana Hundt
Geburtsdatum: 14.12.1980
Geburtsort: Stralsund
Familienstand: ledig

Ausbildung

1987-1991 Karsten Sarnow-Grundschule, Stralsund
1991-1993 Marie Curie-Realschule, Stralsund
1993-1999 Johann Gottfried Herder-Gymnasium, Stralsund
Abschluss: Abitur
1999-2001 Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
2001-2006 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Abschluss: Diplom-Biologin
Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz:
„Effekt von Retinsäure auf die Promotoraktivität der α -Sekretase ADAM10“
2007-2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Riems

Veröffentlichungen

Publikationen

Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification

Stech J, Stech O, Herwig A, Altmeyen H, Hundt J, Gohrbandt S, Kreibich A, Weber S, Klenk HD, Mettenleiter TC.

Nucleic Acids Res. 2008 Dec;36(21):e139

Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin

Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F.

FASEB J. 2009 Jun;23(6):1643-54

Highly pathogenic H5N1 influenza viruses carry virulence determinants beyond the polybasic hemagglutinin cleavage site

Bogs J, Veits J, Gohrbandt S, Hundt J, Stech O, Breithaupt A, Teifke JP, Mettenleiter TC, Stech J

PLoS One 2010 Jul;5(7):e11826

The amino acids adjacent to the hemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5

Gohrbandt S, Veits J, Hundt J, Bogs J, Breithaupt A, Teifke JP, Weber S, Mettenleiter TC, Stech J

J Gen Virol. 2010 Sep 29. [Epub ahead of print]

H9 avian influenza reassortant with engineered polybasic cleavage site displays high pathogenic phenotype in chicken

Gohrbandt S, Veits J, Breithaupt A, Hundt J, Teifke JP, Stech O, Mettenleiter TC, Stech J
JVI in revision

The NS1 protein of avian influenza viruses suppresses interferon synthesis in mice but not in chicken

Penski N, Kothlow S, Krohmann C, Ruggli N, Schusser B, Gohrbandt S, Hundt J, Veits J, Breithaupt A, Kochs G, Stech J, Summerfield A, Vahlenkamp T, Kaspers B, Staeheli P
PloS Pathogens in revision

Tagungsbeiträge

Poster

A live attenuated vaccine with elastase-dependent hemagglutinin cleavage site against HPAIV H5N1 in chicken

Hundt J, Gohrbandt S, Veits J, Pavlova SP, Blohm U, Breithaupt A, Stech O, Mettenleiter TC, Stech J

4th European Congress of Virology, Italien, 2010

Eine attenuierte Lebend-Vakzine mit Elastase-abhängiger Haemagglutinin-Spaltstelle gegen HPAIV H5N1 im Huhn

Hundt J, Gohrbandt S, Veits J, Pavlova SP, Blohm U, Breithaupt A, Stech O, Mettenleiter TC, Stech J

Nationales Symposium für Influenza Forschung, Berlin, 2009

Danksagung

Einen herzlichen Dank an alle, die mich während meiner Doktorarbeit vielseitig unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben:

Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. Mettenleiter

Dr. med. Jürgen Stech

Dr. med. vet. Jutta Veits

Dr. med. vet. Michael Eschbaumer

Elke und Carl von Hobe

Stefan Hundt und Dr. rer. med. Sophia Pavlova

meine Familie

Meine Freunde und Kollegen:

Moni und Rainer Bermann, Ulrike Blohm, Jessi Bogs, Anne Brandenburg, Gele Breithaupt, Geoffrey Chase, Dany Deckers, Pascal Eusemann, Bine Feistkorn, Stefan Finke, Walter Fuchs, Elisabeth Funke, Sandra Gohrbandt, Tobias Gohrbandt, Mareen Grawe, Herbert Gretz, Dajana Helke, Donata Kalthoff, Axel Karger, Christian Korthase, Barbara Klupp, Steffi Knöfel, Mirjam Krautwald, Anne Kreibich, Lydia Lux, Stefan Lux, Cindy Meinke, Frederik Müller, Kathrin Müller, Jeannette Orbanz, Barbara Riebe, Lissy Schmitt, Chrissy Schmitt, Martin Schwemmle, Martin Skiba, Jens Teifke, Siegfried Weber, Kerstin Wunderlich

die Tierpfleger

und natürlich an die Hühnchen!