

# **Die Bedeutung des Mx-Proteins in der Influenza-Abwehr beim Huhn**

Benjamin Michael Schusser

München 2010



**Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers  
am Lehrstuhl für Physiologie

# **Die Bedeutung des Mx-Proteins in der Influenza-Abwehr beim Huhn**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Benjamin Michael Schusser  
aus Aschaffenburg

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Koreferent/en : Univ. Prof. Dr. Sutter  
Univ. Prof. Dr. Korbel  
Univ. Prof. Dr. Wolf  
Univ. Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

**INHALTSVERZEICHNIS**

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS .....	X
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1 DAS INFLUENZA A VIRUS .....	3
2.1.1 Taxonomie Influenza A Virus .....	3
2.1.2 Struktur des Influenza A Virus .....	3
2.1.3 Die Replikation des Influenza A Virus .....	5
2.1.4 Hoch und niedrig pathogene Influenza A Viren .....	6
2.1.5 Influenza-Pandemien .....	6
2.1.5.1 Influenza-Pandemien beim Mensch .....	6
2.1.5.2 Infektion des Menschen mit aviären Influenza A Viren .....	7
2.1.5.3 Influenza-Pandemien beim Geflügel .....	8
2.2 DAS INTERFERONSYSTEM .....	10
2.2.1 Die Entdeckung des Interferons .....	10
2.2.2 Charakterisierung des Interferons .....	10
2.2.3 Die Induktion von Typ I Interferon .....	12
2.2.4 Typ I Interferon stimulierte Gene .....	13
2.2.5 Das Interferonsystem des Haushuhns .....	14
2.3 DAS <u>MYXOVIRUS RESISTANCE</u> (Mx) PROTEIN .....	16
2.3.1 Die Entdeckung von Mx in der Maus .....	16
2.3.2 Abhängigkeit des antiviralen Mx-Effektes von Interferon .....	17
2.3.3 Die Struktur des Mx-Proteins .....	19
2.3.4 Mechanismen des antiviralen Mx-Effektes .....	21
2.3.4.1 Mx GTPase-Aktivität und antivirale Wirkung .....	22
2.3.4.2 Die Bedeutung des Leuzin-Zippers für Mx .....	24
2.3.4.3 Die Bedeutung der Oligomerisierung .....	24
2.3.4.4 Interaktion von Mx mit viralen und zellulären Strukturen .....	25
2.3.5 Mx bei den verschiedenen Spezies .....	25
2.3.6 Mx beim Huhn .....	30
2.3.6.1 Vielfalt des Mx im Huhn .....	31
2.3.6.2 Antivirale Wirkung von Mx im Huhn .....	34
<b>3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>37</b>
4.1 TIERE UND TIERHALTUNG .....	37
4.1.1 Hühner .....	37
4.1.2 Kaninchen .....	37
4.2 GEWINNUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS GEGEN INFLUENZA A .....	38
4.2.1 Immunisierung .....	38
4.2.2 Gewinnung des Antiserums .....	39
4.3 ZELLEN UND ZELLKULTUR .....	39
4.3.1 Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF) .....	39
4.3.2 Zellkultur .....	40
4.3.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze .....	40
4.3.2.2 Verwendete Zelllinien .....	41
4.3.2.3 Kultivierung von Zellen .....	41
4.3.2.4 Einfrieren von Zellen .....	41
4.3.2.5 Auftauen von Zellen .....	42

4.4	VEKTOREN UND KLONIERUNG .....	43
4.4.1	Verwendete Konstrukte .....	43
4.4.2	Erzeugen von chemisch kompetenten Bakterien .....	45
4.4.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	46
4.4.4	Bakterien PCR .....	48
4.4.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	49
4.4.6	Zielgerichtete Mutagenese .....	50
4.4.7	Restriktionsenzymverdau von Vektor und Insert .....	51
4.4.8	Aufreinigung von DNA .....	52
4.4.9	Dephosphorylierung des Vektors .....	52
4.4.10	Ligation von Insert und Vektor .....	53
4.4.11	Transformation von Bakterien .....	54
4.4.12	Aufreinigung von Plasmid .....	55
4.5	RNA ISOLATION MITTELS TRIZOL .....	56
4.6	REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA .....	57
4.6.1	DNAse Verdau von RNA Proben .....	57
4.6.2	cDNA Synthese .....	58
4.7	REVERSE TRANSKRIPTASE PCR (RT-PCR) .....	59
4.8	QUANTITATIVE RT-PCR .....	61
4.9	TRANSFEKTION VON ZELLEN .....	62
4.9.1	Transfektion von Zelllinien .....	62
4.9.2	Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten .....	62
4.10	PROTEINEXPRESSION IN HEK293T ZELLEN .....	64
4.11	PROTEINAUFREINIGUNG AUS HEK293T ZELLEN .....	65
4.12	IMMUNPRÄZIPITATION VON FLAG-Mx KONSTRUKTEN .....	66
4.13	GTPASE-ASSAY .....	67
4.14	TRANSDUKTION VON HÜHNEREMBRYONEN .....	68
4.14.1	Vorbereitung der Zellen .....	68
4.14.2	Injektion in embryonierte Eier .....	68
4.15	VIRUSINFEKTION EMBRYONIRTER EIER .....	69
4.16	IN VITRO INFEKTIONSEXPERIMENTE .....	69
4.16.1	Erzeugen eines Virusstocks .....	70
4.16.2	Virusinfektion von Zellen .....	71
4.16.3	Plaque-Assay .....	72
4.16.4	Immunostaining von infizierten Zellen .....	73
4.16.5	Viruskinetik auf Zellen .....	75
4.16.6	Titration von Virus auf MDCK Zellen .....	75
4.17	INTERFERONNACHWEIS IM ANTIVIRALEN BIOASSAY .....	77
4.18	INTERFERON NACHWEIS IM CEC32#511 REPORTERASSAY .....	78
4.19	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG VON ZELLEN .....	79
4.20	HISTOLOGIE .....	80
4.21	NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) .....	82
4.22	COOMASSIE FÄRBUNG .....	84
4.23	WESTERN BLOT .....	85
4.24	RNA INTERFERENCE .....	87
4.24.1	Short interfering RNA (siRNA) Design .....	87

4.24.2	Transfektion von siRNA .....	88
4.25	HOMOGENISIEREN VON PROBEN .....	89
4.25.1	Homogenisation von Proben für die RNA Isolation.....	89
4.25.2	Herstellung von Organhomogenaten für den Western Blot.....	90
4.26	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	90
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>91</b>
5.1	SEQUENZANALYSE DES HÜHNER MX-GENS .....	91
5.2	DIE KINETIK DER CHMX-EXPRESSION.....	92
5.2.1	<i>In vitro</i> Stimulation von HEF mit Typ I Interferon .....	92
5.2.2	Stimulation von Hühnerembryonen mit Typ I Interferon.....	93
5.2.3	Induktion von Hühner Mx <i>in vivo</i> .....	94
5.3	TRANSFEKTION VON HEF NACH CHIFNA STIMULATION.....	95
5.4	<i>IN VITRO</i> INFEKTIONSEXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG POTENTIELL ANTIVIRALER AKTIVITÄT VON HÜHNER-MX .....	97
5.4.1	Erstellung der Mx-Konstrukte.....	97
5.4.2	Infektion von Vero Zellen mit WSN/33 (H1N1).....	98
5.4.3	Infektion von DF1 Zellen mit WSN/33 (H1N1).....	99
5.4.4	Infektion von HEF mit WSN/33 (H1N1) .....	100
5.4.4.1	Wachstumskinetik von WSN/33 (H1N1) auf Linie 0 HEF .....	103
5.4.5	Infektion von Linie 0 HEF mit Vesicular stomatitis Virus.....	105
5.4.6	Infektion von Linie 0 HEF mit niedrig pathogenen Influenza A Geflügelviren.....	106
5.4.7	Infektion von Linie 0 HEF mit hoch pathogenen Influenza A Viren .....	107
5.4.8	chIFN $\alpha$ Titration auf HEF und anschließende WSN/33 (H1N1) Infektion.....	108
5.5	<i>IN OVO</i> INFEKTIONSEXPERIMENTE MIT INFLUENZA A VIREN ZUR ANALYSE DER BEDEUTUNG VON CHMX IN DER VIRUSABWEHR .....	110
5.5.1	Kontrolle der RCAS(BP)A-Vektor basierten Mx-Überexpression .....	110
5.5.2	Infektion von LSL-Embryonen mit WSN/33 (H1N1).....	112
5.5.3	Infektion von LSL-Embryonen mit LPAI/84 (H8N4).....	114
5.6	PRÜFUNG DER GTPASE-AKTIVITÄT VON MX .....	118
5.6.1	Erstellen von Hühner Mx-Konstrukten zur rekombinanten Proteinexpression .....	118
5.6.2	Expression und Immunpräzipitation von Mx .....	118
5.6.3	Aufreinigung von chMx-Protein .....	119
5.6.4	Überprüfung der GTPase-Aktivität von chMx.....	120
5.7	KNOCKDOWN VON CHMX MITTELS RNA <i>INTERFERENCE</i> .....	122
5.7.1	Knockdown von chMx <i>in vitro</i> .....	122
5.7.2	Infektion von HEF mit WSN/33 (H1N1) nach einem chMx Knockdown .....	124
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>126</b>
6.1	UNTERSUCHUNG DER VERSCHIEDENEN MX-ISOFORMEN HINSICHTLICH IHRER ANTIVIRALEN AKTIVITÄT .....	127
6.1.1	Die antivirale Aktivität von chMx <i>in vitro</i> .....	127
6.1.2	Die antivirale Aktivität von chMx <i>in vivo</i> .....	131
6.2	DER KNOCKDOWN VON CHMX.....	135
6.3	HÜHNER MX ALS GROÙE GTPASE .....	136
6.4	WORIN LIEGT DIE BEDEUTUNG VON MX BEIM HUHN – AUSBLICK .....	139
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>145</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>147</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>171</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp	Ampicillin
AMP-PNP	Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bryan Polymerase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL	Biosicherheitslevel
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
ch	Huhn ( <i>chicken</i> )
chMx	Hühner Mx ( <i>chicken Mx</i> )
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CID	Zentrale-Interaktionsdomäne ( <i>central interaction domain</i> )
cpe	Zytopathischer Effekt ( <i>cytopathic effect</i> )
CT	<i>cycle treshold</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4'6'Diamidino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl-dextran
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiothreitol
duMx	Enten-Mx ( <i>duck Mx</i> )
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
FBS	Fetales Bovines Serum
FCA	Freund's komplettes Adjuvans
ffu	<i>focus forming unit</i>
FIA	Freund's inkomplettes Adjuvans
FPV	Geflügelpest Virus ( <i>fowl plague virus</i> )
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HA	Hämagglutinin
HCL	Chlorwasserstoff
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
huDyn	humane Dynamin



huMxA	human MxA
i.o.	<i>in ovo</i>
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha Rezeptor
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor
IFN $\alpha$	Interferon $\alpha$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISG	Interferon stimulierte Gen
ISRE	<i>interferon stimulated response elements</i>
Jak	Januskinase
Kan	Kanamycin
kb	Kilo Base
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LACV	La-Crosse Virus
LiCl	Lithiumchlorid
LPAI	<i>low pathogenic avian influenza</i>
LSL	<i>Lohmann's selected Leghorn</i>
LZ	Leuzin-Zipper
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MCS	<i>multi cloning side</i>
MDCK	Madin-Darby <i>canine kidney</i>
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MgCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Tetrahydrat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mMx1	murine Mx1
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
Mx	<i>Myxovirus resistance</i> Gen
N	Asparagin
NA	Neuraminidase
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid

---

NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	Nukleus-Zielsequenz ( <i>nucleus localisation signal</i> )
NP	Nukleoprotein
NPF	Neutral gepufferte Formalin
NS1/2	Nichtstrukturprotein 1/2
OAS	2',5' Oligoadenylat Synthetase
OD	Optische Dichte
p.i.	post infectionem
PA	<i>polymerase acid</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PB1	<i>polymerase basic 1</i>
PB2	<i>polymerase basic 2</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PFU	<i>proof reading polymerase</i>
PKR	Protein Kinase R
POD	Peroxidase
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RbCL	Rubidiumchlorid
RCAS	<i>replication competent ASLV – LTR with a splice acceptor</i>
rek	rekombinant
rek.chIFN α	rekombinante <i>chicken</i> Interferon α
RIPA	<i>Radio immuno precipitation assay</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RJF	<i>red jungle fowl</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RVFV	Rift-Valley-Fever Virus
S	Serin
SAD	Selbstzusammenlagerungsdomäne ( <i>self assembly domain</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SNP	Einzel Nukleotid Polymorphismen ( <i>single nucleotid polymorphism</i> )
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>

---

ssRNA	Einzelstrang RNA ( <i>single stranded RNA</i> )
Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	Simian Virus 40
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung ( <i>TRIS buffered saline</i> )
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TFB	<i>transformation buffer</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VPS1	<i>yeast vacuolar protein sorting</i> Protein
vRNP	viralen Ribonukleoproteinkomplex
VSV	Vesicular stomatitis Virus

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Schematische Darstellung der Struktur des Influenza A Virus.....	4
Abb. 2 Schematische Darstellung der Induktion von Interferon.....	13
Abb. 3 Struktur des Mx-Proteins .....	20
Abb. 4 Phylogenetischer Baum der Mx-Proteine .....	26
Abb. 5 Schematische Struktur des chMx-Gens mit positiv selektierten Codons.....	32
Abb. 6 Erstellung RCAS-transduzierter Embryonen.....	69
Abb. 7 Sequenzvergleich von chMx auf Aminosäurenbasis .....	91
Abb. 8 chIFN $\alpha$ induzierte Mx-Expression <i>in vitro</i> .....	92
Abb. 9 Interferon Reporterassay aus Allantoisflüssigkeit.....	93
Abb. 10 Stimulation von LSL-Embryonen mit rek.chIFN $\alpha$ .....	94
Abb. 11 Western Blot Lungenhomogenat nach Interferonstimulation von Hühnern ...	95
Abb. 12 Fehlende Interferon medierte Inhibition der RCAS(BP)A-Transfektion.....	96
Abb. 13 Zielgerichtete Mutagenese von chMx631S zu chMx631N.....	97
Abb. 14 Antivirale Wirkung der RCAS(BP)A basierten huMxA- und mMx1- Expression in Vero Zellen .....	98
Abb. 15 Antivirale Wirkung der RCAS(BP)A-basierten Mx-Expression in DF1 Zellen .....	99
Abb. 16 chIFN $\alpha$ vermittelte Mx-Induktion in DF1 Zellen .....	100
Abb. 17 Expression der RCAS(BP)A-Mx Konstrukte .....	101
Abb. 18 Infektion von Mx überexprimierenden HEF mit WSN/33 (H1N1).....	102
Abb. 19 Wachstumskinetik von WSN/33 (H1N1) auf primären Linie 0 HEF .....	104
Abb. 20 VSV Infektion primärer Linie 0 HEF .....	105
Abb. 21 Antivirale Wirkung der Mx-Expression gegen ein geflügelspezifisches niedrig pathogenes Influenza A Virus .....	106
Abb. 22 Antivirale Wirkung der Mx-Expression gegen hoch pathogene Influenza A Viren .....	108
Abb. 23 Antivirale Wirkung der Mx-Expression in Kombination mit Interferonstimulation gegen ein niedrig pathogenes Influenza A Virus .....	109
Abb. 24 RCAS(BP)A Expression an Embryonaltag 11.....	110
Abb. 25 Expressionskontrolle der RCAS(BP)A Konstrukte <i>in ovo</i> .....	111
Abb. 26 Wachstumskinetik WSN/33 (H1N1) <i>in ovo</i> .....	112
Abb. 27 Überlebenskurve Mx exprimierender LSL-Embryonen nach WSN/33 (H1N1) Infektion .....	113
Abb. 28 Virustiter in der Allantoisflüssigkeit von LSL-Eiern nach WSN/33 (H1N1)	

---

Infektion .....	114
Abb. 29 Wachstumskinetik LPAI/84 (H8N4) <i>in ovo</i> .....	115
Abb. 30 Überlebenskurve Mx exprimierender LSL-Embryonen nach LPAI/84 (H8N4) Infektion .....	116
Abb. 31 Virustiter von LSL-Embryonen nach LPAI/84 (H8N4) Infektion.....	117
Abb. 32 Struktur PCR3-Ha-Flag.....	118
Abb. 33 Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation von Flag-chMx631S .....	119
Abb. 34 Kontrolle des aufgereinigten chMx631S-Proteins .....	120
Abb. 35 Überprüfung der GTPase-Aktivität von chMx .....	121
Abb. 36 Knockdown von chMx mittels siRNA .....	123
Abb. 37 Interferon vermittelter Schutz von HEF gegenüber WSN/33 (H1N1) nach chMx Knockdown .....	124
Abb. 38 Bindungsstelle des $\alpha$ -huMxA Antikörpers.....	137

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Funktion der Influenza A Virusproteine .....	4
Tabelle 2: Lokalisation und antivirales Spektrum der Mx-Proteine .....	27
Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien.....	40
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.....	41
Tabelle 5: Verwendete Vektoren .....	43
Tabelle 6: Verwendete Konstrukte.....	44
Tabelle 7: In der Klonierung verwendete Primer.....	47
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die PFU Polymerase PCR.....	48
Tabelle 9: Primer zur Erfolgskontrolle der Ligation.....	49
Tabelle 10: Verwendete Mutageneseprimer .....	51
Tabelle 11: Verwendete Bakterien.....	54
Tabelle 12: Primer für RT-PCR .....	60
Tabelle 13: Primer für quantitative RT-PCR .....	61
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die quantitative RT-PCR.....	61
Tabelle 15: Verwendete Viren .....	70
Tabelle 16: Antikörper Western Blot.....	85
Tabelle 17: Kriterien für die Auswahl von siRNA Kandidaten.....	87
Tabelle 18: Synthetisierte siRNA.....	88

## 1 Einleitung

Bereits seit dem 19ten Jahrhundert werden unter der Bezeichnung „Geflügelpest“ verheerende Seuchenzüge beim Wirtschaftsgeflügel beschrieben. Diese von Influenza A Viren ausgelöste Krankheit führt auch heute noch zum Verlust von Millionen von Hühnern weltweit. Sie kann in den Geflügelbeständen aber auch mit milden Krankheitssymptomen oder klinisch unauffällig verlaufen. Hervorzuheben ist, dass alle großen Influenza A Pandemien der Menschheit 1918, 1957, 1968, 1977 und 2009 ihren Ursprung im Geflügel nahmen, weshalb der Erkennung und Kontrolle von Influenzainfektionen beim Geflügel eine besondere Bedeutung zukommt. Gerade die in der letzten Dekade immer wieder auftretenden H5N1 Ausbrüche beim Geflügel stellen nach übereinstimmender Meinung eine große Gefahr sowohl für das Geflügel als auch für den Menschen dar.

Umfassende Untersuchungen an Säugern haben gezeigt, dass dem Typ I Interferonsystem eine Schlüsselrolle in der antiviralen Abwehr gegen Influenza A Viren zukommt. Studien in Mäusen haben dabei die *protein kinase R* (PKR) und vor allem das *myxovirus resistance* (Mx) Protein als essenzielle Effektormoleküle der Interferonantwort identifiziert. Mx-Proteine sind in vielen Säugetierspezies bekannt und gehören zur Familie der großen Guanosintriphosphasen (GTPasen). Für Mäuse ist erwiesen, dass allein das Vorhandensein von Mx über den Ausgang einer Influenza A Virusinfektion entscheiden kann. Mx-Protein defiziente Mäuse weisen eine hohe Mortalität auch nach einer Infektion mit vergleichsweise niedrig pathogenen Influenzaviren auf. Während im Säuger und beim Menschen viel über die Bedeutung von Mx im Typ I Interferonsystem bekannt ist, ist das Wissen über die Bedeutung des Typ I Interferonsystems und insbesondere des Mx-Proteins beim Huhn und anderen Wirtschaftsgeflügelarten noch sehr begrenzt.

Im Huhn wurde Mx zunächst als zytoplasmatisches Protein ohne antivirale Aktivität beschrieben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von aviärem Mx-Protein nach Stimulation von Zellen mit Typ I Interferon induziert wird. Nachfolgende Studien ergaben, dass das Hühner-Mx (chMx) Gen hoch polymorph ist. Sie lieferten zudem Hinweise dafür, dass ein Polymorphismus an Aminosäureposition 631 über das Vorhandensein bzw.

Fehlen einer antiviralen Aktivität dieses Proteins entscheidet.

Interessanterweise wurden nahezu alle bisher publizierten Arbeiten zur Funktion des aviären Mx-Proteins in Säugerzellen durchgeführt, Untersuchungen in Vogelzellen oder im Geflügel selber gibt es dagegen kaum. Dies lässt Raum für Spekulationen, ob die fehlende antivirale Wirkung von chMx auf die Nutzung ungeeigneter Zellkultursysteme und damit möglicherweise auch auf das Fehlen geflügelspezifischer Kofaktoren für die Mx-Funktion zurückführbar ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Wirkung verschiedener chMx-Isoformen mithilfe eines retroviralen Gentransfersystems (RCAS) sowohl in Geflügelzellkulturen als auch im Tier untersucht werden. Die so erhaltenen Daten sollen Aufschluss über die Bedeutung von chMx im Typ I Interferonsystem des Huhns und in der frühen Immunantwort auf Influenzainfektionen geben.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Influenza A Virus

Erstmals in der Geschichte wurden Influenza A Virusinfektionen im Jahre 412 vor Christus durch Hippokrates und im Jahr 212 vor Christus durch den römischen Geschichtsschreiber Titus Livius beschrieben [1, 2].

#### 2.1.1 Taxonomie Influenza A Virus

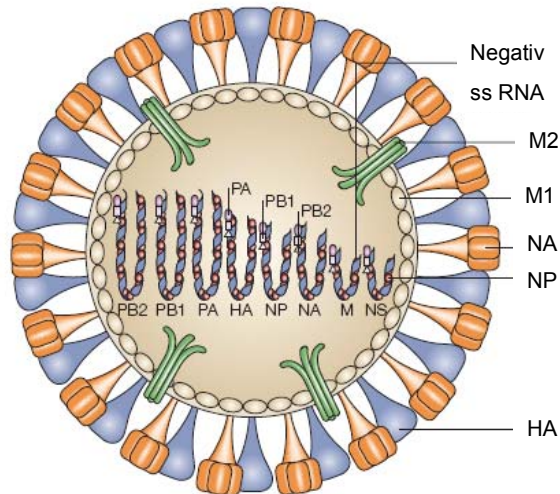
Das Influenza A Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae.

Ohne Zweifel handelt es sich bei Influenza A Viren um die bekanntesten Vertreter der Orthomyxoviridae. Die Benennung der Influenza A Viren erfolgt nach dem Schema: Genus, Spezies aus der das Isolat stammt, Land aus dem das Isolat stammt, Nummer des Isolates, Jahr der Isolierung und Hämagglutinin sowie Neuraminidase Subtyp z.B. A/Swan/Germany/R65/05 H5N1.

#### 2.1.2 Struktur des Influenza A Virus

Das Influenza A Virus besitzt ein segmentiertes, einzelsträngiges Ribonukleinsäure (RNA) Genom negativer Polarität [3-5]. Das Genom besteht aus 8 RNA-Segmenten welche insgesamt für 13.000 Nukleotide codieren. Diese Segmente enthalten hoch konservierte, nicht codierende Regionen am 3' und 5' Ende welche zu einer intramolekularen Aneinanderlagerung führen, wodurch die charakteristische pfannenstielartige Form der RNA-Segmente entsteht [6].

Wie in Abb. 1 zu sehen ist, sind Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und Matrixprotein 2 (M2) in der vom Wirt gebildeten Lipidhülle des Virus zu finden. HA liegt hier als Trimer, NA und M2 liegen als Tetramere vor. Das Matrixprotein 1 (M1) liegt unterhalb der Lipidhülle. Die viralen RNA-Segmente sind von Nukleoprotein umhüllt und der Polymerasekomplex an sie gebunden. Den durch die 8 RNA-Segmente codierten Proteinen des Influenza A Virus kommen unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Virusreplikation zu [7, 8].



**Abb. 1 Schematische Darstellung der Struktur des Influenza A Virus**

Influenza A setzt sich aus folgenden Proteinen zusammen: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrixprotein 1 (M1), Matrixprotein 2 (M2), Nichtstrukturprotein 1 und 2 (NS1/2), Nukleoprotein (NP), sowie dem Polymerasekomplex bestehend aus PB1 (*polymerase basic 1*), PB2 (*polymerase basic 2*) und PA (*polymerase acid*). Abbildung modifiziert nach Horimoto et al. [9].

RNA Segment	Protein	Größe in Aminosäuren	Funktion
1	PB2	759	cap Bindung der Wirts-RNA und Endonuklease [10]
2	PB1	757	Katalytische Untereinheit der Polymerase [11, 12]
3	PA	716	virale RNA Synthese [13]
4	HA	566	Rezeptor Bindung und Fusion [14, 15]
5	NP	498	Nukleokapsid [16]
6	NA	454	Neuraminidase [17-19]
7	M1	252	Matrixprotein [20]
7	M2	97	Ionen Kanal [21]
8	NS1	230	Hemmung der Interferon-Antwort [22-24]
8	NS2	121	Ribonukleokapsid-Komplex und Kern-Transport [22, 23, 25]

**Tabelle 1: Funktion der Influenza A Virusproteine**

### 2.1.3 Die Replikation des Influenza A Virus

Die Bindung von Influenza A Viren an Rezeptoren der Wirtszelle erfolgt durch das virale Oberflächen-Glycoprotein Hämagglutinin. Mittels Endozytose wird das Virus dann in die Zelle aufgenommen und der Ribonukleoproteinkomplex, bestehend aus viraler RNA, Polymerase und Nukleoprotein, in dem als *uncoating* bezeichneten Prozess durch Membranfusion freigesetzt. Zwei kritische Funktionen sind entscheidend für den Prozess des *uncoatings*. Zum einen muss das Innere des Virions, vermittelt durch die M2 Ionenkanäle, angesäuert werden, um das M1 vom Ribonukleoproteinkomplex zu lösen. Zum anderen muss die virale Membran mit der endosomalen Membran verschmelzen was durch eine, durch niedrigen pH Wert getriggerte, Konformationsänderung des Hämagglutinins geschieht.

Dies führt schließlich zur Freisetzung des Ribonukleoproteinkomplexes in das Zytoplasma [7, 9]. Das Hämagglutininvorläufermolekül wird hierbei durch Wirtsproteasen in die Hämagglutinin-Untereinheiten 1 und 2 gespalten. Der proteolytischen Aktivität der Zelle sowie dem HA-Molekül kommen somit eine Schlüsselrolle für die virale Infektion, Verteilung und die Pathogenität der Influenza A Viren zu [26-28]. Die Ribonukleoproteinkomplexe wandern nun durch Poren in den Zellkern. Hier dient die virale RNA sowohl als *messenger* RNA (mRNA) für die Proteinbiosynthese als auch als komplementär RNA (cRNA) für die Synthese neuer viraler RNA [8]. An den 5' und 3' Enden der viralen RNA finden sich komplementäre Sequenzen, welche die Ausbildung von Promotorstrukturen ermöglichen. Hier findet die Bindung der RNA-abhängigen zellulären RNA-Polymerase und im Anschluss die Replikation der viralen RNA statt [29, 30].

Eine Besonderheit im Replikationszyklus der Influenza A Viren ist die Erkennung und Transkription der viralen RNA durch die zelluläre Polymerase II. Dies wird dadurch ermöglicht, dass das PB2 Protein an 5' cap-Gruppen der zellulären mRNA bindet und durch Nukleaseaktivität freie 3' OH-Gruppen generiert, welche als Primer fungieren können. Dieser Prozess wird auch als *cap-stealing* bezeichnet [31]. Das NS1 wird in großen Mengen synthetisiert und dient unter anderem dazu, die Interferonantwort des Wirtes zu unterdrücken [32, 33].

Im weiteren Verlauf findet sich das M1 im Zellkern und bindet den Ribonukleoproteinkomplex, um so die Transkription zu beenden. Das NS2 bindet den Ribonukleoproteinkomplex und exportiert diesen in das Zytoplasma wo er sich an die Zytoplasmamembran anlagert. Hier findet der sogenannte *budding* Prozess und die Freisetzung neuer Viren statt [7, 34].

#### **2.1.4 Hoch und niedrig pathogene Influenza A Viren**

Bei den Influenza A Viren muss zwischen hoch und niedrig pathogenen Viren unterschieden werden. Niedrig pathogene Influenza A Viren besitzen ein einzelnes Arginin in ihrer HA-Spaltstelle und werden daher nur in einer kleinen Anzahl bestimmter Organe durch die sogenannten *trypsin-like* Enzyme gespalten [35-38]. Im Gegensatz dazu besitzen hoch pathogene Influenza A Viren eine Serie basischer Aminosäuren in ihrer Spaltstelle und können durch ubiquitär vorkommende Proteasen wie Furin und Proprotein Konvertase 6 gespalten werden [37, 39]. Eine Kohlenhydratkette nahe der Spaltstelle interferiert mit den Wirtsproteasen und macht ihnen die Spaltstelle des Influenza A Virus zugänglich. Die Spaltung des Hämagglutinins ist das wichtigste Kriterium für den Gewebetropismus von Influenza A Viren und Unterschiede in der Verfügbarkeit von Proteasen und der Spaltbarkeit des Hämagglutinins entscheiden über den Verlauf der Influenza A Virusinfektion [40-42].

#### **2.1.5 Influenza-Pandemien**

##### **2.1.5.1 Influenza-Pandemien beim Mensch**

Immer wieder kam es im Laufe des letzten Jahrhunderts und auch in diesem Jahrzehnt zu großen Influenza A Pandemien. Die wohl verheerendste Influenza A Pandemie war in den Jahren 1918 bis 1919 die so genannte „Spanische Grippe“. Das Influenza A Virus vom Typ H1N1 wird für über 40 Millionen Tote verantwortlich gemacht [43]. Die Symptome dieser fatalen Epidemie waren hauptsächlich auf den Respirationstrakt beschränkt und über 50% der Toten stammten aus einer ungewöhnlich jungen Bevölkerungsgruppe von 20 bis 40 jährigen [44, 45]. Anhand der Gensequenz des Spanischen Grippevirus von 1918 und der Kristallstruktur des Hämagglutinins, sowie in Rezeptorbindungsassays mit dem rekombinanten 1918 Virus konnte gezeigt werden, dass dieses tödliche

Virus seinen Ursprung in einem aviären Influenza A Virus hatte [15, 46-48].

Weitere Pandemien mit weniger schlimmem Verlauf traten in den Jahren 1957 („Asiatische Grippe“, H2/N2), 1968 („Hongkong Grippe“, H3/N2) und 1977 („Russische Grippe“, H1N1) auf [49]. Die jüngste Influenza A Pandemie brach im Jahr 2009 in Mexico aus („Neue Grippe“ oder auch „Schweine Grippe“ genannt, H1N1) [50].

Bei den beschriebenen Influenza A Pandemien handelt es sich jeweils um Ausbrüche die weltweit auftraten und bei denen das zirkulierende Influenza A Virus von Mensch zu Mensch übertragbar war. Interessanterweise hatten alle bisherigen pandemischen Influenza A Viren einen ihrer Vorläufer im Geflügel. 1957 stammten das Hämagglutinin (H2), die Neuraminidase und das PB1 Protein vom einem vogelspezifischen Virus ab.

Die verbleibenden Virusbestandteile hatten ihren Ursprung in einem menschlichen Grippevirus [51, 52]. Das Virus von 1968 fand ebenfalls teilweise seinen Ausgangspunkt im Geflügel. So stammten das Hämagglutinin (H3) und das PB1 Protein von aviären Influenza A Viren ab [51, 52]. Das Virus der „Russischen Grippe“ war identisch mit einem Influenza A H1N1 Virus aus den 50er Jahren, sodass nahezu die gesamte Bevölkerung in einem Alter über 27 Jahren Antikörper gegen dieses Virus besaß [53].

#### **2.1.5.2 Infektion des Menschen mit aviären Influenza A Viren**

Normalerweise sollte es zu keiner Übertragung aviärer Influenza A Viren auf den Menschen kommen und wenn doch, sind extrem hohe Virusdosen notwendig [54]. Dieser hohe Wirtstropismus resultiert aus der hohen Spezifität der Wirtszellerkennung durch das Hämagglutinin. Das Hämagglutinin menschlicher Influenza A Viren erkennt für gewöhnlich nur N-Sialinsäuren, welche über eine  $\alpha$ 2,6-Verbindung Galaktose gebunden haben. Diese  $\alpha$ 2,6-Verbindung findet sich vornehmlich beim Menschen. Aviäre Influenza A Viren erkennen hingegen  $\alpha$ 2,3 Galaktose-Verbindungen, welche sich beim Geflügel unter anderem im Epithel des Respirationstraktes finden [55-57]. Im Schwein finden sich sowohl  $\alpha$ 2,6- als auch  $\alpha$ 2,3-Verbindungen. Somit sind Schweine sowohl gegenüber menschlichen als auch aviären Influenza A Viren empfänglich.

Schweine werden daher auch als Mischgefäße (*mixing vessel*) für Influenza A Viren bezeichnet, da hier Reassortanten aus menschlichen, aviären und evtl. Schweine Influenza A Viren entstehen können [58]. Trotz dieser Rezeportspezifität kam es zu Infektionen von Menschen durch eine direkte Übertragung von Influenza A Viren vom Geflügel auf den Menschen. 1997 konnte ein H5N1 Virus aus einem dreijährigen Jungen in Hongkong isoliert werden, welcher aufgrund der Influenza A Infektion verstarb. Weiterhin erkrankten 1997 bereits 18 Menschen an H5N1 und sechs von ihnen starben [59-61]. Nachdem das 1997 isolierte H5N1 Virus eine Präferenz für die  $\alpha$ 2,3 Verbindung in Zellkultur zeigte, war klar dass es sich um ein aviäres Influenza A Virus handelte, welches direkt auf den Menschen übergegangen war [62]. Matrosovich et al. zeigten schließlich, dass sich auch im menschlichen Tracheobronchalepithel  $\alpha$ 2,3 Verbindungen finden, an welche das, aus aviären Grippeviren stammende Hämagglutinin binden kann [63].

### 2.1.5.3 Influenza-Pandemien beim Geflügel

Influenza ist auch beim Geflügel eine seit mehreren Jahrhunderten bekannte Erkrankung. Im 19. Jahrhundert wurden erstmals Ausbrüche beim Geflügel, damals noch unter dem Namen „Geflügelpest“ beschrieben [64]. Mitte des 20. Jahrhunderts entdeckte man bei Vergleichsstudien zwischen dem Erreger der „Geflügelpest“ und dem Influenza A Virus, dass es sich bei den zwei Erkrankungen um das gleiche Pathogen handelt [65]. Eine Ausnahmestellung kommt den Enten im Rahmen der Influenzaproblematik beim Geflügel zu. Während Infektionen mit hoch pathogenen Influenza A Viren beim Huhn immer tödlich verlaufen, erkranken Enten nicht, sondern scheiden lediglich das Virus aus [66, 67].

Neben den bereits unter 2.1.5.1 beschriebenen Influenza A Pandemien des Menschen kam es auch immer wieder beim Geflügel zu folgenschweren Influenza A Pandemien. In jüngster Zeit waren dies vor allem Ausbrüche verursacht durch Viren der Subtypen H5N1, H9N2 und H7N7. Ein Ausbruch von H7N7 in den Niederlanden im Jahr 2003 führte allein zum Verlust von 30 Millionen Vögeln innerhalb kürzester Zeit [68]. Unabhängig der hier genannten Influenza A Subtypen sind aus dem Geflügel 15 HA und 9 NA Subtypen in jeder möglichen

Kombination isoliert worden [69]. Zwar sind viele domestizierte und Wildvogel-Spezies empfänglich gegenüber Influenza A Virusinfektionen, doch gibt es immer wieder Virussubtypen welche in einer Vogelspezies hoch pathogen und in einer anderen apathogen sind, wie eine Studie mit verschiedenen H5 Subtypen zeigte [70]. Vor allem die H5N1 Ausbrüche die im Jahre 2006 ihren Höhepunkt auch in der Bundesrepublik Deutschland erreichten, führten zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden und stellten immer wieder eine große Gefahr für den Menschen dar [71-73]. Das 2006 unter anderem in Deutschland grassierende H5N1 war nicht nur auf die Hühnerpopulation limitiert, sondern infizierte auch immer wieder Schwäne, Singvögel und Säuger wie z.B. Katzen und Steinmarder [74, 75].

Aber nicht nur die Infektionen mit hoch pathogenen Influenza A Viren stellen ein Problem für die Geflügelpopulation dar, sondern auch Infektionen mit niedrig pathogenen Influenza Subtypen. So kommt es hier zu einer reduzierten Gewichtszunahme in der Mast und zu einer Reduktion der Legeleistung, was neben dem Aspekt der Tiergesundheit auch eine wirtschaftliche Bedeutung hat [76]. Bei diesen niedrig pathogenen Influenza A Virusinfektionen handelt es sich um die eigentlich natürlichen Infektionen beim Geflügel. Die Tiere zeigen hier nur moderate Krankheitserscheinungen, scheiden aber hohe Virusmengen mit dem Kot aus [67]. Nur selten kommt es zum Tod der Tiere. Das Huhn stellt im Bezug auf hoch pathogene Influenza A Virusinfektionen wohl eher einen „Fehlwirt“ dar, da es nicht Ziel des Virus sein kann seinen Wirt innerhalb kürzester Zeit (24-48 Stunden) zu töten [68].

Übertragen werden Influenza A Viren innerhalb der Geflügelpopulation über den faekal-oralen Weg, direkt von Tier zu Tier per Tröpfcheninfektion und über kontaminierte Gewässer [68]. Dies hatte zur Folge, dass im Jahr 2006 für sämtliches Geflügel die Aufstallung in geschlossenen Stallungen angeordnet wurde, um einen Eintrag der Virusinfektionen von der Wildvogelpopulation in Geflügelbestände zu verhindern [77].

## 2.2 Das Interferonsystem

Das Interferonsystem stellt einen der wichtigsten Teile des angeborenen Immunsystems dar. Typ I Interferon ist essentiell in der Abwehr von Influenza A Virusinfektionen beim Säuger.

### 2.2.1 Die Entdeckung des Interferons

Erstmals wurde das Phänomen der Interferenz im Jahr 1935 beschrieben. Hoskins et al. infizierten Rhesus Affen mit einem pantropen Gelbfieber Virus und im Anschluss in unterschiedlichen Zeitintervallen mit einem neurotrophen Gelbfieber Virus. Erfolgte die Infektion mit dem zweiten Virus innerhalb von 20 Stunden nach Infektion mit dem pantropen Gelbfieber Virus, waren die Affen gegenüber der Infektion mit dem neurotrophen Virus geschützt und überlebten die Infektion. Dieser Schutzeffekt war 48 Stunden nach Gabe des ersten Virus nicht mehr zu sehen [78, 79]. Bis in die 50er Jahre hinein wurde das Phänomen der Interferenz in über 60 Fachartikeln bei verschiedenen Spezies bis hin zum Menschen beschrieben, aber eine schlüssige Erklärung fehlte [80].

Erst im Jahr 1957 schließlich beschrieben Isaacs und Lindenmann das Phänomen der Interferenz erneut und machten einen löslichen Faktor für dieses Phänomen verantwortlich. In ihren Experimenten inkubierten sie Stücke der Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen mit hitzeinaktiviertem Influenza A Virus, infizierten diese Membranstücke zu verschiedenen Zeitpunkten mit Influenza A Virus und überprüften den Gehalt an neu synthetisiertem Virus nach der Infektion. Hierbei sahen sie eine deutliche Reduktion der Virustiter nach Vorinkubation der Membran mit hitzeinaktiviertem Influenza A Virus, sodass der Faktor Interferon benannt wurde [81]. In Folgeexperimenten zeigten sie weiterhin, das Interferon antivirale Aktivität gegenüber Influenza A, Sendai, Vaccinia und Newcastle Disease Virus (NDV) besitzt [82].

### 2.2.2 Charakterisierung des Interferons

Die Interferone übernehmen Aufgaben im Bereich der angeborenen Immunität, dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Apoptose [83, 84]. Sie lassen sich in Typ I, Typ II und Typ III Interferone einteilen.



Zu den Typ I Interferonen gehören Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$  und  $\tau$ . Einziger Vertreter der Typ II Interferone ist das Interferon  $\gamma$  [85]. Die jüngste Gruppe der Interferone stellen die Typ III Interferone mit ihren Vertretern Interferon  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ , und  $\lambda 3$  dar, welche auch als Interleukin (IL) 28a, 28b und 29 bezeichnet werden. Diese dem Typ I Interferon von der Induktion und Wirkung her gleichenden Interferone weisen aber nur eine geringe Homologie zu selbigem auf [86-88].

Die bekanntesten Vertreter der Typ I Interferone sind das Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ , welche eine wichtige Aufgabe in der Abwehr von Virusinfektionen übernehmen und bereits kurze Zeit nach der Infektion sezerniert werden [89]. Während Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) von mehreren hochgradig homologen Genen codiert wird, werden die übrigen Interferone lediglich durch ein einzelnes codiert. Typ I Interferone binden an den ubiquitär exprimierten Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR) bestehend aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 [90]. IFNAR2 hat sowohl eine lange als auch eine kurze Form, wobei die lange Form eine größere zytoplasmatische Domäne aufweist und die bedeutendere Rolle in der Signaltransduktion übernimmt. IFNAR1 ist alleine nicht in der Lage IFN $\alpha$  zu binden, jedoch in Kombination mit IFNAR2 entsteht eine hochaffine Bindung und eine effiziente Signaltransduktion [91]. Durch Typ I Interferone wird vor allem eine antivirale und antiproliferative Wirkung vermittelt. Aber auch die zytolytische Aktivität von Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und Makrophagen wird stimuliert. Typ I Interferon kann von allen Körperzellen exprimiert werden, wird jedoch in besonders großen Mengen durch plasmazytoide dendritische Zellen gebildet, welche vor allem im Blut und den peripheren lymphatischen Organen vorkommen [92].

Der einzige Vertreter der Typ II Interferone ist das Interferon  $\gamma$  welches von den Zellen des Immunsystems gebildet wird und vor allem immunmodulatorische Funktionen übernimmt [84, 93]. Interferon  $\gamma$  weist einen eigenen Rezeptor (IFNGR) auf, welcher ebenfalls aus zwei Ketten, ähnlich dem Typ I Interferonrezeptor, besteht. IFNGR1 wird für die Liganden-Bindung benötigt, wohingegen IFNGR2 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion übernimmt. Auch Interferon  $\gamma$  vermittelt eine antivirale Aktivität und beeinflusst die pro- und antiinflammatorische Immunantwort.

Aber auch immunmodulatorische Funktionen, wie zum Beispiel der Immunglobulin (Ig) G2a Klassenwechsel der B-Zelle und die Aktivierung Dendritischer Zellen wird durch Typ II Interferon vermittelt. Interferon  $\gamma$  wird unter anderem von Natürlichen Killerzellen,  $CD8^+$  T-Zellen und der Th1 Unterklasse der  $CD4^+$  T-Zellen produziert [94].

### 2.2.3 Die Induktion von Typ I Interferon

Die Induktion von Typ I Interferon findet primär über die *pattern recognition receptors* (PRR) statt, welche mit konservierten *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) interagieren [95, 96]. Bei den PRRs handelt es sich um eine Gruppe von Rezeptoren, welche in der Lage sind konservierte Strukturen bestimmter Pathogene, die sogenannten PAMPs zu erkennen. PRRs kommen sowohl frei löslich im Blut, z.B. Mannose-bindendes Lektin, an der Zelloberfläche, z.B. die *Scavenger*-Rezeptoren oder auch im Zytoplasma der Zelle, z.B. die *NOD-like* Rezeptoren, vor. Eine große Gruppe der PRRs stellen die *toll-like receptors* (TLR) dar. Diese TLRs lassen sich phylogenetisch in verwandte Familien unterteilen und nahezu alle Vertebraten weisen mindestens einen Vertreter jeder Gruppe auf [97]. Wichtigster Vertreter für die Erkennung von Einzelstrang (ss) RNA und damit von Orthomyxoviren ist TLR7. Neben TLR7 spielt TLR3 eine wichtige Rolle in der Erkennung von Influenza A Viren. TLR3 erkennt Doppelstrang (ds) RNA, welche sich im Laufe der Virusreplikation in der Zelle findet [98]. Im Unterschied zu TLR1, TLR2 und TLR4 welche auf der Zellmembran liegen finden sich TLR3, TLR7 und TLR9 in der Zelle und zwar in den Endosomen wieder [99].

Neben TLR7 und TLR3 kann virale RNA des Weiteren durch die zytoplasmatisch lokalisierten Rezeptoren *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) und *melanoma differentiation associated protein 5* (MDA-5) erkannt werden.

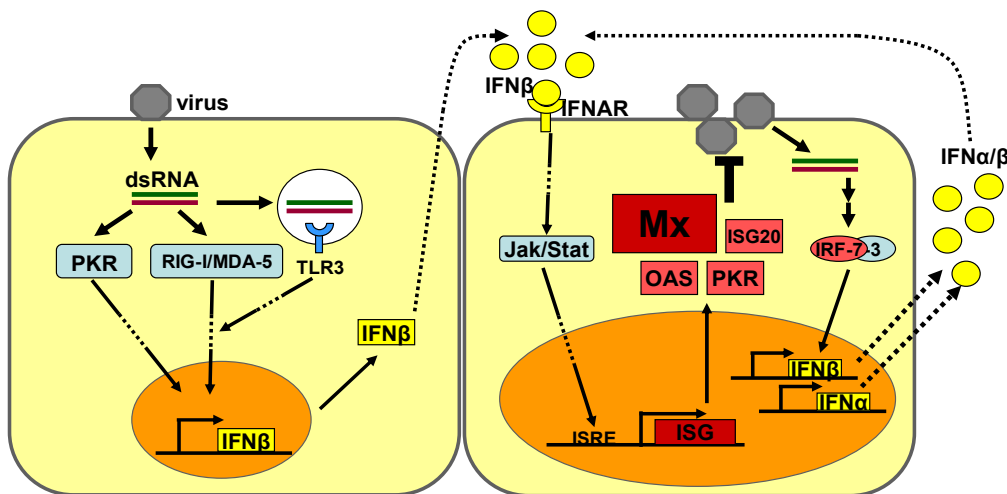
Abgesehen von den TLRs existieren vor allem in Zellen des Epithels, den Makrophagen und den dendritischen Zellen sogenannte *NOD-like* Rezeptoren, welche im Zytoplasma der Zellen liegen und hier PAMPs erkennen können [100].

Nach Erkennung der viralen RNA kommt es über eine Signalkaskade zur Aktivierung von *interferon regulatory factor 3* (IRF3) und *nuclear factor 'kappa*-

*light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) zur Produktion von Interferon  $\beta$  [101]. Das sezernierte Interferon  $\beta$  kann jetzt über die Typ I Interferon Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR 2 binden [102]. Nun erfolgt die Aktivierung des Januskinase (Jak) *signal transducers and activators of transcription* (Stat) kurz Jak-Stat Signaltransduktionsweg. Zusammen mit dem Protein p48 bildet sich nun der *Interferon alpha stimulated gene factor 3 complex* (ISGF3), welcher in den Zellkern wandert und dort an *interferon stimulated response elements* (ISRE) bindet. In Folge beginnt die Transkription der Interferon stimulierten Gene (ISG) [102-104].

### 2.2.4 Typ I Interferon stimulierte Gene

Es konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von murinen und humanen Zelllinien mit Interferon über 300 Gene reguliert werden [105]. Die regulierten Gene lassen sich in mehrere Gruppen teilen. Zum einen natürlich die Gruppe der antiviralen Gene und zum anderen z.B. Immunmodulatoren, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsaktivatoren, Apoptosemediatoren und Signaltransduktionsgene. Im Weiteren wird auf die Gruppe der interferonstimulierten antiviralen Gene näher eingegangen.



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Induktion von Interferon**

Kommt es zur Virusinfektion der Zelle findet sich im Zytoplasma der Zelle dsRNA. Diese dsRNA wird von den sogenannten *pattern recognition receptors* erkannt. Nun kommt es zur Produktion von Typ I Interferon, welches sezerniert wird und über den Typ I Interferon Rezeptor auf die Nachbarzelle wirken kann. Hier kommt es über den Jak/Stat-Signalweg zu einer Hochregulierung der interferonstimulierten Gene (ISG). Neben ISG20, 2',5' OAS und PKR ist eines dieser Gene Mx. Weiterhin kommt es zu einer erneuten Produktion von Typ I Interferon, welches wiederum auf die Zelle wirkt. Modifiziert nach Haller et al. [106]

Wie in Abb. 2 dargestellt, reguliert Typ I Interferon die sogenannten ISG zu welchen unter anderem das Mx-Gen (siehe 2.3), die 2',5' Oligoadenylat Synthetase (OAS) und die Protein Kinase R (PKR) gehören [107, 108]. Die OAS vernetzt Adenosintriphosphat (ATP) zu 2'-5' Oligomeren. Diese für Nukleotide in Nukleinsäuren untypische Verbindung führt zur Aktivierung der OAS abhängigen RNase L, welche virale RNA degradiert [109, 110]. Ebenfalls durch Typ I Interferon stimuliert wird die RNA abhängige PKR welche den eukaryotischen Protein Synthese Initiationsfaktor 2 phosphoryliert und damit die Translation und somit auch die Virusreplikation hemmt [111]. Außerdem induziert Typ I Interferon, vermittelt über *interferon regulatory factor 1*, eine erhöhte Expression von *major histocompatibility complex* (MHC) Molekülen [108, 112]. Hierdurch kann eine Vielzahl von Antigenen über MHC präsentiert werden und somit eine spezifische T-Zell-Antwort entstehen [108].

### 2.2.5 Das Interferonsystem des Haushuhns

Nachdem es 1993 gelungen war Interferon der Flunder und damit des ersten Nicht-Säugers zu klonieren, gab es Bemühungen auch das Interferon des Huhns zu klonieren [113]. Wie unter 2.2.1 beschrieben beruht die eigentliche Namensgebung des Interferons auf Experimenten, welche mithilfe von Hühnerembryonen stattgefunden haben. Hühnerinterferon war initial nach Stimulation aus gealterten Hühnerembryofibroblasten (HEF) aufgereinigt und charakterisiert worden [114-118]. Nach der Stimulation von Milzzellen fand sich eine säurestabile und eine säurelabile Form von antiviral wirksamem Interferon in Hühnern [119]. Ebenso wurde ein löslicher antiviraler Faktor nach Stimulation von Hühnerleukozyten entdeckt [120]. Dies alles deutete daraufhin, dass es auch im Huhn mehrere Interferonformen gibt. Auch in anderen Geflügelspezies fanden sich Faktoren mit interferonartiger Aktivität [121, 122]. 1994 gelang es schließlich aus gealterten HEF nach Virusstimulation Hühnerinterferon zu klonieren und im Anschluss in Mauszellen zu exprimieren [123]. Dieses Polypeptid, welches für Hühnerinterferon gehalten wurde, zeigte nur 20-25% Homologie zum Säuger Typ I Interferon [124]. Allerdings zeigte es ein konserviertes Cystein Muster und fünf  $\alpha$ -Helices, was typisch für Typ I Interferon ist.

Auch zeigte in *Escherichia coli* (*E.coli*) rekombinant (rek) hergestelltes Hühnerinterferon starke antivirale Aktivität, was alles daraufhin deutete, dass es sich wirklich um Typ I Interferon des Huhns handelte [125, 126]. Nachdem weiterhin Ähnlichkeiten in der Promotorstruktur zwischen Säuger- und Hühnerinterferon gezeigt worden waren, wurde schließlich die gleiche Nomenklatur für die Interferone wie beim Säuger eingeführt [127, 128]. Inzwischen wurde neben Typ I Interferon auch Typ II Interferon, das Interferon  $\gamma$  und Typ III Interferon, das Interferon  $\lambda$ , in Hühnern nachgewiesen und kloniert [129, 130]. TLR3 und TLR7 stellen unter den PRRs zusammen die wichtigsten Rezeptoren zur Erkennung von Orthomyxoviren dar. Im Huhn wurde TLR3 beschrieben und die Induktion von Typ I Interferon nach Stimulation von TLR3 mit poly(I):poly(C) gezeigt [131]. Genauso wurde TLR7 zur Erkennung von ssRNA im Huhn beschrieben [132]. Weitere PRRs, welche in der Lage sind Doppel- bzw. Einzelstrang RNA im Zytoplasma der Zelle zu erkennen sind RIG-I und MDA-5. Jedoch wurde RIG-I bisher lediglich in der Ente nachgewiesen [133, 134]. Ebenso wurde der Typ I Interferon Rezeptor für das Huhn kloniert [135]. Weiterhin ist auch im Geflügel von einem funktionierenden Jak-Stat Signalweg auszugehen [136-138].

Aus dem Huhn wurde PKR im Jahr 2004 kloniert [139]. Die Kinase-Domäne der Hühner PKR zeigte bis zu 82% Homologie zur Säuger PKR und die c-terminale Hälfte der PKR ist bis zu 48% konserviert gegenüber dem Protein aus Mensch, Maus und Ratte. Beim Vergleich der PKR verschiedener Hühnerlinien hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität gegenüber Vesicular stomatitis virus (VSV) zeigten alle getesteten Mutanten gute antivirale Aktivität. Eine Ausnahme war die Mutation von Arginin zu Glutamin an Aminosäureposition 507 der Hühner-PKR, welche in zwei von drei Versuchsansätzen anfällig gegenüber der VSV-Infektion war [139]. Im Huhn konnten zwei mRNAs identifiziert und kloniert werden, welche für OAS codieren [140, 141]. Diese als OAS\*A und OAS\*B beschriebene Hühner OAS kommt in unterschiedlicher Frequenz in den Hühnerlinien vor. Das OAS\*B-Allel konnte in 14 getesteten Hühnerlinien nur in Leghorn-Linien gefunden werden. Jedoch korrelierte das Fehlen von OAS\*B nicht mit einer höheren Anfälligkeit gegenüber Virusinfektionen [140].

### 2.3 Das Myxovirus resistance (Mx) Protein

Influenza A Virusinfektionen stellen sowohl im Tierreich als auch beim Menschen Jahr für Jahr eine große Bedrohung dar. Die Hauptabwehr dieser Viren findet durch das angeborene Immunsystem statt. Eine Schlüsselrolle kommt hier dem Interferonsystem zu und hier im speziellen den Interferon stimulierten Genen. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Mx-Gen.

#### 2.3.1 Die Entdeckung von Mx in der Maus

Im Jahr 1962 machte Lindenmann durch Zufall die Entdeckung, dass Mäuse des Inzuchtstammes A2G nach intrazerebraler Infektion mit einem, an die Maus adaptierten neurotrophen Influenza A Stamm resistent gegenüber dieser Infektion waren [142]. Zwar kam es zur Infektion der Mäuse, die Tiere überlebten die Infektion jedoch und zeigten durchweg niedrigere Virustiter als andere infizierte Mäuselinien [143]. Zurückführen ließ sich die Resistenz auf ein autosomal dominant vererbtes Gen, welches spezifisch Resistenz gegen Orthomyxoviren verleiht und deshalb *Myxovirus resistance (Mx) Gen* genannt wurde [144]. Nachfolgende Infektionsexperimente mit 16 verschiedenen Mäuselinien zeigten, dass nur Mäuse der Linie A2G resistent gegenüber Influenza A Virusinfektionen waren. Die Resistenz erstreckte sich ausschließlich auf Influenza A Viren und nicht auf z.B. Vesicular stomatitis virus, Newcastle Disease Virus oder das Tollwut Virus [145]. Haller et al. stellten die Vermutung an, dass Mäuse, welche eine Störung ihres Immunsystems aufweisen, keinen antiviralen Mx-Effekt zeigen. Aus diesem Grund kreuzten sie das Mx-Gen in Nacktmäuse ein, welche eine bekannte Immundefizienz vor allem im T-Zell-System besitzen. Es zeigte sich, dass Mx<sup>+</sup> Mäuse die Infektion mit Influenza A Viren überlebten, obwohl sie aufgrund der fehlenden T-Zell-Hilfe nicht in der Lage waren effizient Hämagglutination inhibierende Antikörper zu bilden. Die Resistenz gegenüber Influenza A schien also alleinig auf das Vorhandensein von Mx zurückführbar [146]. Da die bisherigen Versuche ausschließlich mit neuro- und pneumotropen Viren durchgeführt wurden, testeten Haller et al., ob Mx auch in der Leber der Mäuse exprimiert wird, indem sie für die Infektion der Mx<sup>+</sup> Mäuse ein hepatotropes Influenza A Virus wählten. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Mx<sup>+</sup> Mäuse auch vor einer Infektion mit einem hepatotropen Influenza A Virus

geschützt waren und zum anderen gelang es nicht das Virus an  $Mx^+$  Mäuse zu adaptieren. Die pathologische Untersuchung der Leber von  $Mx^-$  Mäusen im Vergleich zu  $Mx^+$  Mäusen wies gravierende Unterschiede auf.  $Mx^+$  Mäuse zeigten zwar auch Leberzellnekrosen, jedoch waren diese auf Areale von 15 bis 20 Zellen begrenzt und verheilten spontan.  $Mx^-$  Mäuse hingegen wiesen deutlich geschwollene Lebern und Zeichen einer akuten degenerativen Hepatitis auf, welche nicht mehr spontan verheilte [147]. All diese Experimente zeigten, dass Mx alleine für den antiviralen Effekt gegenüber Influenza A Virusinfektionen in der Maus verantwortlich ist.

Experimente von Horisberger et al. zeigten schließlich, dass es sich bei dem initial in der Maus entdeckten Mx um ein ungefähr 72,5 kDa schweres Protein handelt [148]. In der Wildtierpopulation kommen  $Mx^+$  und  $Mx^-$  Mäuse in annähernd gleicher Frequenz vor [149].

### 2.3.2 Abhängigkeit des antiviralen Mx-Effektes von Interferon

Nachdem der antivirale Effekt von Mx also nicht organspezifisch zu sein schien, sollte mit nachfolgenden Experimenten herausgefunden werden, welche Regionen des Körpers diesen Mx abhängigen antiviralen Effekt vermitteln.

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass es möglich ist, Peritoneal-Makrophagen von Mäusen *in vitro* zu infizieren. Auch hier wurden bereits Unterschiede in der Empfänglichkeit der Makrophagen verschiedener Mäuselinien gegenüber Hepatitis und Arbor B Viren festgestellt [150, 151].

Aus diesem Grund versuchten Lindenmann et al. mithilfe von *in vitro* Infektionsexperimenten den antiviralen Effekt von  $Mx^+$  Mäusen zu klären. Hierfür wurden Peritoneal-Makrophagen verschiedener  $Mx^+$  und  $Mx^-$  Mäuse gewonnen und mit einem aviären Influenza A Virus infiziert. Lindenmann et al. kamen im Rahmen ihrer Experimente zu dem Rückschluss, dass womöglich die Makrophagen von  $Mx^+$  Tieren für den antiviralen Effekt gegenüber Influenza A verantwortlich sein könnten, da es sich um Zellen handelt, welche in nahezu allen Regionen des Körpers vorkommen [152]. Infektionsexperimente mit Knochenmarks-Chimeren zeigten jedoch, dass  $Mx^+$  Makrophagen nicht alleine ausreichen um ansonsten  $Mx^-$  Mäuse vor Influenza A Infektionen zu schützen [153].

Erste Untersuchungen des Interferonsystems der A2G Mäuse führten Fiske et al. durch [154]. Als sie bei Infektionsexperimenten feststellten, dass  $Mx^+$  Mäuse 3 bis 5mal niedrigere Interferonserumspiegel aufwiesen als  $Mx^-$  Mäuse schlossen sie daraus, dass die Mx abhängige Resistenz gegenüber Influenza A Viren nichts mit der primären Immunantwort des Körpers auf die Infektion zu tun haben könnte [154]. Die Verfügbarkeit eines Schaf-anti-Maus-Interferon-Serums ermöglichte es, die Bedeutung von Interferon im Zusammenhang mit dem in  $Mx^+$  Mäusen beobachteten antiviralen Effekt genauer zu untersuchen [155]. Haller et al. behandelten sowohl  $Mx^+$  und  $Mx^-$  Mäuse, als auch Makrophagen dieser Mäuse, mit Schaf-anti-Maus-Interferon-Serum. Hierbei stellten sie fest, dass durch Blockierung des Interferons im Vorfeld der Infektion, der Mx vermittelte antivirale Effekt aufgehoben werden konnte, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die Expression von Mx Interferon abhängig sein könnte und damit Interferon zusammen mit Mx ein entscheidender Faktor in der angeborenen antiviralen Abwehr sein könnte [156].

Durch die Infektion von interferonstimulierten  $Mx^+$  Mäusen mit nicht Influenza verwandten Viren zeigten Haller et al., dass der interferonvermittelte Mx-Effekt Influenza A spezifisch ist [157]. Bei der Untersuchung des Proteinmusters interferonstimulierter, infizierter  $Mx^+$  Makrophagen fiel auf, dass die influenzaspezifischen Proteine fehlten, woraus geschlossen werden konnte, dass Influenza nicht mehr dazu in der Lage war, seinen Replikationszyklus aufrecht zu erhalten [158]. Durch die Arbeit mit primären Hepatozyten Kulturen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der antivirale Effekt, welcher in  $Mx^+$  Zellen vermittelt wird, zum einen auf Influenza A Viren limitiert und zum anderen streng interferonabhängig ist [159].

Zu diesem Zeitpunkt ließ sich also sicher sagen, dass Mx bei der Maus nach Interferonstimulation einen antiviralen Status der Zelle gegenüber Influenza A Viren erzeugt. Weiterhin wurde deutlich, dass  $Mx^+$  Mäuse gegenüber jeglichen Influenza A Virus Infektionen geschützt sind und dass dieser Mx-Effekt streng auf Influenza A Viren limitiert und nicht auf andere Virusgruppen übertragbar ist.



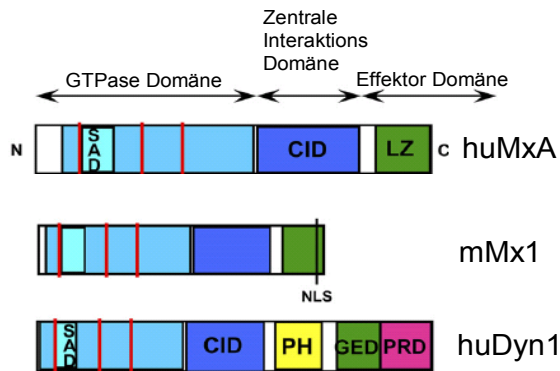
Um zu zeigen, dass der Mx-Effekt wirklich interferonabhängig ist untersuchten Bazzigher et al. Mx in Vero Zellen ohne intaktes Interferonsystem bzw. nach Blockierung der Proteinsynthese. Hierbei zeigte sich, dass Mx des Menschen keine direkte Antwort auf eine NDV-Infektion zeigte, wohingegen andere ISGs alleine durch die Virusinfektion reguliert wurden [160]. Diese Daten bestätigten nochmals, dass Mx ausschließlich durch Interferon reguliert wird [161-164].

Staheli et al. gelang es als erster Gruppe zu zeigen, dass die Expression von Mx spezifisch von Typ I Interferon abhängig ist. Sie zeigten, dass ein Schutz gegenüber Influenza A Virusinfektionen in Mx<sup>+</sup> MEF nur durch Typ I Interferon ausgelöst werden konnte [165].

Auf Proteinebene war, das im Kern Mx<sup>+</sup> Zellen exprimierte murine Mx1 (mMx1), bereits 3-4 Stunden nach Stimulation mit Typ I Interferon in Form feiner Granula zu erkennen, welche bei Stimulation mit Typ II Interferon genauso wenig zu detektieren waren wie bei der Verwendung von Makrophagen aus Mx<sup>-</sup> Mäuselinien [166]. Auf mRNA-Ebene wurde in den ersten 5 Stunden nach Stimulation die höchsten mMx1 Mengen detektiert. Die Konzentration der Mx mRNA nahm in der Zeit 8 bis 16 Stunden nach Interferonstimulation um die Hälfte ab [167].

### 2.3.3 Die Struktur des Mx-Proteins

Durch Southern Blot Analysen auf Maus-Hamster Hybrid Zellen konnte das Mx-Gen auf Maus Chromosom 16 lokalisiert werden und dies durch klassische Rückkreuzungsstudien von Mx<sup>+</sup> Mäusen mit Mx<sup>-</sup> Mäusen mit dem Fellfarben-Marker md, welcher auf Chromosom 16 lokalisiert ist, bewiesen werden [168]. Ebenfalls auf Chromosom 16 ist das Gen Ifrc, welches für den Maus Typ I Interferon Zelloberflächenrezeptor codiert, gelegen [169, 170]. Nachdem immer mehr Informationen über Mx vorlagen, gelang es mithilfe von Southern Blots das Homolog des mMx1 beim Menschen auf Chromosom 21 zu identifizieren und eine Verbindung mit dem proto-onkogen ETS-2 zu zeigen [171, 172].



**Abb. 3 Struktur des Mx-Proteins**

Zentrale-Interaktionsdomäne (CID), Leuzin-Zipper (LZ), Selbstzusammenlagerungsdomäne (SAD), Plekstrinhomologiedomäne (PH), GTPase-Effektordomäne (GED), Prolinreiche-Domäne (PRD), Nukleus-Zielsequenz (NLS), Die senkrechten roten Linien stehen für die drei GTP-Bindungsselemente. Modifiziert nach Haller et al. [173].

Mx-Proteine mit einer Größe von ca. 72 kDa gehören zur Familie der großen GTPasen [174]. Wie in Abb. 3 zu sehen ist, findet sich n-terminal gelegen eine GTPase-Domäne, in welcher drei hoch konservierte GTP-Bindungsselemente liegen. Hierauf folgt eine Zentrale-Interaktionsdomäne und schließlich c-terminal ein Leuzin-Zipper. Im mMx1-Protein findet sich als Besonderheit, c-terminal gelegen, eine Nukleus-Zielsequenz, welche für die Kernlokalisierung von mMx1 verantwortlich ist.

Ähnlich zum humanen Dynamin (huDyn) haben Mx-Proteine eine niedrige Affinität zu GTP aber weisen eine hohe GTP-Hydrolyserate auf [175]. Ebenfalls in Abb. 3 ist zu erkennen, dass Mx keine Plekstrinhomologiedomäne und keine Prolinreiche-Domäne aufweist, welche im klassischen Dynamin für die Membranbindung von Bedeutung sind [173]. Die Zentrale-Interaktionsdomäne (CID) ist über eine flexible Verbindung mit der Effektordomäne verknüpft. Anhand von Sequenzanalysen zeigte sich, dass Mx typische Merkmale eines Leuzin-Zippers an seinem c-terminalen Ende besitzt [176]. Durch Rückfaltung des Leuzin-Zippers auf die CID kommt es zu einer Steigerung der GTPase-Aktivität [177].

Betrachtet man die Struktur von mMx1 sieht man, dass es zur Selbstzusammenlagerung von mMx1 kommt. Verantwortlich hierfür sind die Aminosäuren zwischen Position 51 bis 99 [178]. Unter dem Mikroskop stellte sich das mMx1 in Form von Hufeisen dar. Nach Inkubation mit GTP änderten sich die Hufeisenstrukturen hin zu schraubenförmigen Stapeln.

### 2.3.4 Mechanismen des antiviralen Mx-Effektes

Wie in Tabelle 2 dargestellt weist Mx verteilt über alle Spezies ein sehr breites Wirkungsspektrum auf. Die molekularen Mechanismen der antiviralen Aktivität von Mx sind vielfältig und bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Nicht nur die *in vitro* Expression von human MxA (huMxA), sondern auch die Expression von huMxA in transgenen Mäusen vermittelt einen Schutz gegenüber einer ganzen Serie von Viren [179, 180]. Das Fehlen von Virusproteinen in IFN $\alpha$  stimulierten Mx<sup>+</sup> Zellen gab einen Hinweis darauf, dass Mx bereits in die frühen Replikationsschritte des Virus eingreift [165, 181]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das *uncoating* der Influenza Viren in der Zelle nicht durch mMx1 beeinflusst wird [182]. Krug et al. konnten zeigen, dass mMx1 bereits auf mRNA-Ebene zur Inhibition der Virusreplikation führt. Sie zeigten, dass lediglich kleine Mengen mRNA für NS1 und M1 vorhanden waren [183]. Da die Synthese der Influenza Virus-mRNA im Zellkern stattfindet [184, 185], wurde postuliert, dass mMx1 den Transport der Virione in den Zellkern verhindert. Ebenso war denkbar, dass Mx *cap binding* Aktivität aufweist und somit zellulär *gecappte* RNA von der viralen RNA-Transkriptase fernhält. Diese Theorie konnte inzwischen widerlegt werden [186].

Eine Analyse der einzelnen Influenza A Proteine sollte Aufschluss darüber geben worin genau die antivirale Wirkung von murinem und humanem Mx besteht. Hierbei zeigte sich, dass die längeren primären Transkripte PB1, PB2 und PA welche zum viralen Polymerasekomplex gehören, am effektivsten durch mMx1 gehemmt werden, wohingegen kürzere Transkripte wie NS1 und M1 kaum durch mMx1 beeinträchtigt werden. Im Kontrast zu mMx1 war huMxA nicht in der Lage die primäre Transkription des Influenza A Virus zu hemmen. In huMxA exprimierenden Zellen fand sich polyadenylierte Virus-mRNA, welche in mMx1<sup>+</sup> Zellen fehlte [187].

Stacheli et al. konnten zeigen, dass huMxA in der Lage war, VSV auf einer ähnlichen Ebene wie mMx1 Influenza zu hemmen [188]. Einen weiteren Hinweis darauf, dass der virale Polymerasekomplex ein Ziel der antiviralen mMx1 Wirkung ist, lieferte die Überexpression der Polymerasekomplexproteine bzw. von PB2 in Mx1<sup>+</sup> Zellen. Hierbei zeigte sich, dass der antivirale mMx1 Effekt

durch die Überexpression von PB2 alleine aufzuheben war [189, 190]. Während es möglich war in interferonstimulierten mMx<sup>+</sup> Zellen durch Mikroinjektion eines anti-Maus-Mx Antikörpers den antiviralen Status der Zellen aufzuheben, gelang dies nicht bei MxA<sup>+</sup> Zellen [191, 192]. Dies war ein weiterer Hinweis auf die unterschiedliche Bedeutung von MxA beim Menschen und Mx1 bei der Maus.

Besonders interessant wurde huMxA durch seine Fähigkeit Viren völlig verschiedener Familien und vor allem völlig verschiedenere Replikationsart zu hemmen. Während Influenza A Replikation im Zellkern stattfindet und von der Wirts-RNA-Synthese abhängig ist, findet die VSV-Transkription und -Replikation ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen statt [193, 194]. Für mMx1 konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation im Kern essenziell für dessen antivirale Wirkung ist [195, 196]. Aus diesem Grund versuchten Zürcher et al. eine huMxA-Mutante zu generieren, welche im Zellkern lokalisiert ist [197]. Sie erzeugten einen Aminosäureaustausch an Position 645 von Glutamat zu Arginin welcher die Nukleus-Zielsequenz von mMx1 nachempfinden sollte [198]. Zwar fand sich das veränderte huMxA nach Expression in Maus 3T3 Zellen noch immer im Zytoplasma der Zellen wieder, aber die antivirale Wirkung gegenüber VSV fehlte, was daraufhin deutete, dass die antivirale Wirkung von huMxA gegenüber VSV in der c-terminalen Region des huMxA vermittelt wird. Durch Anfügen einer Sequenz aus dem Simian Virus 40 (SV40) gelang es huMxA in den Zellkern zu bringen. Wurde huMxA im Zellkern exprimiert, war es genau wie mMx1 in der Lage das Entstehen von primären viralen Transkripten zu hemmen [197].

#### **2.3.4.1 Mx GTPase-Aktivität und antivirale Wirkung**

GTPasen haben eine konservierte Rolle im Immunsystem der Vertebraten und Cephalochordata [199]. Für mMx1 konnte gezeigt werden, dass es sich um eine GTPase handelt und das dreiteilige GTP-Bindungsmotiv mit für die intrinsische GTPase-Aktivität des mMx1 verantwortlich ist. Ebenso wurde die Bindung von GTP an mMx1 mithilfe von rekombinantem mMx1 Protein gezeigt [174]. Bei der vermutlich für die GTPase-Aktivität verantwortlichen Region handelt es sich um eine hoch konservierte Region zwischen den Mx-Isoformen der verschiedenen Spezies [161]. Aber nicht nur zur Mx Familie, sondern auch zu anderen Proteinen zeigt mMx1 Homologien. Zum einen zum *yeast vacuolar protein sorting* Protein

(VPS1) und zum anderen zum Dynamin finden sich Ähnlichkeiten [200, 201]. Weiterhin fanden sich Homologien zu einem Dynamin ähnlichen Protein der Fruchtfliege und einem weiteren Protein der Hefen, welches ein GTP-Bindungsmotiv enthält [202-205]. Die n-terminale Region mit einer Länge von ungefähr 300 Aminosäuren ist hoch konserviert zwischen VPS1, Dynamin und Mx. Auch für Dynamin konnte eine schwache GTPase-Aktivität gezeigt werden [206].

Neben mMx1 wurde auch das huMxA als GTPase identifiziert [207]. Nachdem in anderen GTPasen gezeigt werden konnte, dass das Motiv GXXXXGKS eine wichtige Rolle für die GTPase-Aktivität spielt, konnte durch Einfügen von Mutationen in dieser Region gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität essenziell für die antivirale Wirkung von Mx ist [208-214]. Um hohe Proteinkonzentrationen für GTPase-Assays und GTP-Bindungskapazitäts-Assays zur Verfügung zu haben wurden die verschiedenen Mx-Mutanten rekombinant in *E.coli* exprimiert und über ein His-Tag aufgereinigt. Hierbei fiel auf, dass diese Mx-Isoformen, mit Mutation in der GTPase-Domäne, deutlich schlechter aufzureinigen waren und nur 20-80% Vollängen-Mx-Protein enthielten.

Im GTPase-Assay zeigte sich, dass diese Mx-Mutanten ihre Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse nahezu vollständig verloren hatten. Ebenso konnte dargestellt werden, dass diese huMxA-Mutanten nicht mehr in der Lage waren GTP effizient zu binden [211]. Sowohl für huMxA als auch für mMx1 lässt sich zeigen, dass die GTPase-Aktivität essenziell für die antivirale Wirkung ist [215-217]. Es stellte sich heraus, dass für die Bindung und Hydrolyse von GTP sowohl ein intaktes GTP-Bindungsmotiv am NH<sub>2</sub>-Terminus, als auch ein intakter COOH-Terminus von Nöten sind [177]. Es wurde klar, dass nicht die Hydrolyse, sondern die Bindung von GTP entscheidend für die Wirkung von huMxA ist [218, 219].

Wie die Daten von Varne et al. zeigen, führt die Bindung von GTP mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Konformationsänderung von huMxA, wohingegen kein Unterschied in der Konformation von huMxA mit gebundenem GDP und Wildtyp huMxA zu sehen ist [220]. Kochs et al. zeigten, dass bereits unter natürlichen Bedingungen eine Selbstzusammenlagerung von rek.huMxA zu sehen ist [221]. Flohr et al. konnten schließlich zeigen, dass auch die Zentrale-

Interaktionsdomäne des huMxA für die GTPase-Aktivität und die antivirale Wirkung von Bedeutung ist [222]. Eine Mutation von Threonin zu Alanin an Aminosäureposition 103 des huMxA zwischen dem ersten und zweiten GTP-Bindungsmotiv schuf eine Mutante, welche keine GTPase-Aktivität mehr innehatte und des Weiteren nicht mehr in der Lage war GTP zu binden. Hier zeigte sich erneut, dass der COOH-Terminus wichtig für Oligomerisierung und antivirale Aktivität des huMxA-Proteins ist [223].

#### **2.3.4.2 Die Bedeutung des Leuzin-Zippers für Mx**

Melen et al. fanden heraus, dass Mx zum einen als Monomer, Dimer, Trimer und Oligomer vorliegt und zum anderen, dass der Leuzin-Zipper der entscheidende Faktor für diese Protein-Protein Interaktion ist [176]. Durch die Interaktion zwischen dem Leuzin-Zipper und der zentralen Interaktionsdomäne kommt es zur Zusammenlagerung des Mx-Moleküls [224, 225]. Dass ein intakter Leuzin-Zipper für die antivirale Wirkung von Mx ausschlaggebend ist konnten Johannes et al. beweisen, indem sie Ratten Mx2 und Mx3 miteinander verglichen und durch Mutation veränderten. Ratten Mx2 zeigt in natürlicher Form eine antivirale Wirkung gegenüber VSV, welche Ratten Mx3 fehlt.

Mutiert man jedoch zwei Aminosäuren am c-terminalen Ende des Ratten Mx3, sodass es dem Mx2 der Ratte gleicht, zeigt es antivirale Aktivität gegenüber VSV [226].

#### **2.3.4.3 Die Bedeutung der Oligomerisierung**

Schumacher et al. identifizierten zwei Domänen im Mx-Protein, welche eine wichtige Rolle bei der Zusammenlagerung des Moleküls spielen. Die erste Domäne, welche im Bereich der ersten 99 Aminosäuren am C-Terminus des huMxA liegt, kontaktiert eine zweite Domäne im Bereich der Aminosäuren 372 bis 540 und führt zur Zusammenlagerung von huMxA. Es zeigte sich, dass eine intakte c-terminale Region im Bereich des Leuzin-Zippers von Nöten ist, damit es zur Zusammenlagerung von Mx kommen kann [225]. Janzen et al. schließlich fanden heraus, dass eine Mutante des huMxA noch immer antivirale Aktivität gegenüber Thogoto Viren und VSV besaß, obwohl sie nur als Monomer vorlag und vor allem keine GTPase-Aktivität zeigte [227]. Weiterhin zeigte sich, dass die

monomere Form des huMxA deutlich instabiler ist, als seine oligomerisierte Form. Auch Schwemmle et al. konnten zeigen, dass nicht allein die GTPase-Aktivität für die antivirale Wirkung von huMxA verantwortlich gemacht werden kann [228].

#### **2.3.4.4 Interaktion von Mx mit viralen und zellulären Strukturen**

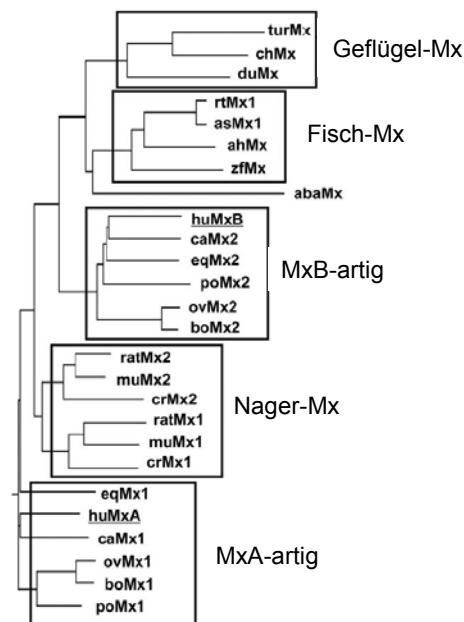
Thogoto Virus, welches durch Zecken übertragen wird und zur Familie der Orthomyxoviren gehört, stellt bisher eines der huMxA sensitivsten Viren dar [229]. Mithilfe des Thogoto Virus und einem Kosedimentations-Assays gelang es Kochs et al. einen möglichen antiviralen Wirkmechanismus von huMxA zu entschlüsseln. Sie zeigten, dass huMxA an den viralen Ribonukleoproteinkomplex (vRNP) binden kann [218, 219]. Auch in lebenden Zellen ließ sich zeigen, dass huMxA und der vRNP zusammengelagert im Zytoplasma der Zellen zu finden waren, wohingegen der vRNP in huMxA<sup>-</sup> Zellen im Zellkern zu finden war [230].

Weitere Studien zu den Wirkmechanismen wurden mit interferonsensitiven Viren der Familie der Bunyaviridae zu denen das La-Crosse Virus (LACV), das Rift-Valley-Fever Virus (RVFV) und das Hantavirus gehören durchgeführt [231-234]. Es zeigte sich, dass huMxA in Vero und Moskito Zellen in der Lage war, das im Zytoplasma der Zelle replizierende LACV zu hemmen. Vor allem die Elongation langer Virustranskripte wurde inhibiert, wohingegen kurze virale Segmente ungehindert replizieren konnten [235, 236]. Ebenso war es möglich huMxA transgene Mäuse ohne intaktes Interferonsystem gegenüber LACV zu schützen [237]. huMxA kolokalisiert mit dem Nukleokapsid des LACV im perinukleären Raum und bildet hochkomplexe fibrilläre Strukturen, dies scheint essenziell für die antivirale Wirkung des huMxA zu sein [238].

Eine Theorie der antiviralen Wirkung des huMxA ist, dass huMxA an virales GTP bindet und es im Rahmen der sich anschließenden Konformationsänderungen im huMxA-Protein, zur Abkapselung des Virus kommt [239].

#### **2.3.5 Mx bei den verschiedenen Spezies**

Neben den initial bei Maus und Mensch beschriebenen Mx-Proteinen wurden Mx-Proteine mittlerweile bei einer Vielzahl von Spezies nachgewiesen [173, 240].



**Abb. 4 Phylogenetischer Baum der Mx-Proteine**

Die folgenden Sequenzen wurden für das Alignment verwendet: human MxA (huMxA, A33481), human MxB (huMxB, P20592), dog Mx1 (caMx1, AAF44684), dog Mx2 (caMx2, AF239824), pig Mx1 (poMx1, P27594), pig Mx2 (poMx2, A7VK00), bovine Mx1 (boMx1, P79135), bovine Mx2 (boMx2, AF355147), sheep Mx1 (ovMx1, P33237), sheep Mx2 (ovMx2, Q5I2P5), horse Mx1 (eqMx1, Q28379), horse Mx2 (eqMx2, XP\_001491517), mouse Mx1 (muMx1, NP\_034976), mouse Mx2 (muMx2, NP\_038634), rat Mx1 (ratMx1, NP\_775119), rat Mx2 (ratMx2, NP\_599177), cotton rat Mx1 (crMx1, DQ218274), cotton rat Mx2 (crMx2, DQ218273), chicken Mx (chMx, Q90597), duck Mx (duMx, P33238), turkey Mx (turMx, ABQ43205), rainbow trout (rtMx1, AAA87839), Atlantic salmon Mx1 (asMx1, NP\_001117165), Atlantic halibut Mx (ahMx, AAF66055), zebra fish Mx (zfMx, NP\_891987), und disk abalone shell Mx (abaMx, ABI53802); Modifiziert nach Haller et al. [241].

Die bei den verschiedenen Wirbeltieren beschriebenen Mx-Formen lassen sich phylogenetisch in die folgenden fünf Gruppen einordnen, wie in Abb. 4 zu sehen ist: Nager- Fisch- Geflügel-Mx, MxA- und MxB-artige. Interessanterweise ist das antivirale MxA des Menschen näher mit Mx des Hundes, Schweines, Schafes, Rindes und Pferdes verwandt, als mit dem humanen MxB welches in einem Cluster mit Mx2 Proteinen verschiedener Spezies liegt [241].

Die bekannten Mx-Isoformen unterscheiden sich zum einen im Ort ihrer zellulären Lokalisation und zum anderen in ihrer antiviralen Aktivität.



Protein	Spezies	Lokalisation	Antivirale Spezifität
huMxA	Mensch	Zytoplasma	Bunyaviren, CoxB Virus, Influenza A, THOV, HPIV-3, Masern, VSV, SFV, HBV, IBDV, ASFV
huMxB	Mensch	Kern/Zytoplasma	keine bekannt
boMx1	Rind	Zytoplasma	VSV, Tollwut
poMx1	Schwein	Zytoplasma	Influenza A, VSV
muMx1	Maus	Kern	Influenza A, THOV
muMx2	Maus	Zytoplasma	VSV, Hanta Virus
ratMx1	Ratte	Kern	Influenza A, THOV
ratMx2	Ratte	Zytoplasma	VSV, Bunyaviren
crMx1	Baumwollratte	Kern	Influenza A
crMx2	Baumwollratte	Zytoplasma	VSV, RVFV
chMx	Huhn	Zytoplasma	keine bekannt
duMx	Ente	Kern/Zytoplasma	keine bekannt
asMx1	Seelachs	Zytoplasma	ISAV, IPNV

**Tabelle 2: Lokalisation und antivirales Spektrum der Mx-Proteine**

ASF (Afrikanische Schweinepest), CoxB Virus (Coxsackie B Virus), HBV (Hepatitis B Virus), HPIV-3 (Humane Parainfluenza Virus 3), IBDV (Infektiöse Bursitis Virus), IPNV (Infektiöse Pankreasnekrose Virus), ISAV (Infektiöse Lachs Anämie Virus), RVFV (Rift Valley Fieber Virus), SFV (Semiliki Forest virus), THOV (Thogoto Virus), VSV (Vesicular stomatitis virus); Modifiziert nach Haller et al. [241].

Wie Tabelle 2 zeigt, wurde Mx mittlerweile auch bei Fischen nachgewiesen und kloniert [242-250]. Hier finden sich Arten, die bis zu drei verschiedene Mx-Isoformen tragen, wie zum Beispiel die Regenbogenforelle [243]. Auch wurde für das Fisch-Protein gezeigt, dass es antivirale Eigenschaften besitzt. Die Mx1-Expression des Seelachs ist an dessen Schutz gegenüber dem Infektiösen Pankreasnekrose Virus beteiligt [251]. Für das Mx der Japanischen Flunder wurde eine antivirale Aktivität gegenüber dem Viralen Hämorrhagischen Septikämie Virus und dem Hirame Rhabdovirus beschrieben [252].

Noch erstaunlicher ist der Fund eines Mx-Proteins in *Haliotis discus discus*, dem Seeohr, einem Vertreter der Schnecken. Dies ist somit der erste Invertebrat in dem Mx nachgewiesen und kloniert werden konnte. Dieses dem huMxA zu 41% homologe Protein besitzt alle unter 2.3.3 genannten Charakteristika der Mx-Proteine [253].

Eine weitere Säuger-Spezies in der Mx nachgewiesen wurde ist das Schaf. Schaf-Mx, das im Endometrium exprimiert wird, besitzt eine Homologie von 80% zu huMxA und 73% Homologie zu mMx1. Es wurde gezeigt, dass seine Expression mit dem Vorhandensein von Interferon  $\tau$  einhergeht [254]. Ebenso aus dem Endometrium und zwar hier aus einer endometrialen Phagen Bibliothek konnte das bovine Mx isoliert und charakterisiert werden. Es wies mit 93% die höchste Homologie zu Schaf-Mx auf [255, 256].

Müller et al. konnten in Blut-Leukozyten des Schweines ein 75 kDa schweres Protein nachweisen, welches sich mit einem mMx1 Antikörper immunpräzipitieren ließ [257]. Es zeigte sich, dass Schweine-Mx Typ I Interferon abhängig, 663 Aminosäuren lang und 75,59 kDa schwer ist. Schweine-Mx1 weist eine Homologie von 66,2% zu huMxA und 67,4% zu mMx1 auf [258]. Im Schwein selbst wurde Mx im Rahmen eines Infektionsexperimentes mit einem H1/N2 Schweineinfluenza Virus sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene nachgewiesen [259]. Mx1 des Schweines konnte schließlich auf Chromosom 13 lokalisiert werden [260]. Schweine-Nierenzellen konnten durch IFN $\alpha$ -Stimulation vor VSV und Influenza A Virusinfektionen geschützt werden. Dieser Effekt war nur nach Typ I Interferonstimulation zu beobachten [261]. Mx1 des Schweines wurde des Weiteren im Rahmen von *porcine reproductive and respiratory syndrom* Virusinfektionen auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Die genaue Bedeutung von Mx im Rahmen dieser Infektion ist allerdings unklar [262]. Morozumi et al. entdeckten im Rahmen von Sequenzanalysen 14 verschiedener Schweinerassen insgesamt 3 verschiedene Schweine-Mx-Isoformen [263]. Asano et al. klonierten diese Schweine-Mx-Isoformen und untersuchten ihre antivirale Aktivität gegenüber VSV. Hierbei war kein Unterschied zwischen den Isoformen zu erkennen [264]. Untersuchungen in Vero Zellen zeigten, dass die längere Schweine-Mx-Isoform instabiler war und die kürzere Schweine-Mx-Isoform eine

höhere antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Virusinfektionen zeigte. Die Sequenzierung verschiedener Schweinerassen ergab, dass in der Wildschweinpopulation ausschließlich die kürzere Mx-Isoform mit der höheren antiviralen Aktivität homozygot vorkommt [265].

Für Mäuse konnte gezeigt werden, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei Mx<sup>+</sup> Mäusen um den Wildtyp handelt und es durch eine Deletion im Genom zu Mx<sup>-</sup> Mäuselinien kam [266]. Staeheli et al. teilten das mMx1 schließlich anhand von Southern Blot Analysen in drei Gruppen ein, von denen nur eine dem antiviralen mMx1 entsprach [267]. Bei der Maus weiß man, dass sie zwar experimentell mit Influenza A zu infizieren ist, aber natürlicherweise keine Influenza A Viren in der Mäusepopulation zirkulieren. Zum einen gibt es keine Isolate von Influenza A Viren aus Wildtyp Mäusen und zum anderen ließe sich sonst das Vorkommen von Mx<sup>-</sup> Tieren in der Mäusepopulation nicht erklären.

Ein entscheidendes Charakteristikum des Mx bei der Maus ist die Lokalisation im Kern der Zelle. Am Carboxy Terminus des mMx1 Proteins findet sich ein Aminosäureabschnitt, welcher der *SV40 large T antigen* Nukleus-Zielsequenz ähnelt [268]. Noteborn et al. konnten zeigen, dass das c-terminale Ende des mMx1-Proteins für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich ist und eine entscheidende Rolle für die antivirale Wirkung von mMx1 spielt [198]. Mithilfe eines replikationskompetenten retroviralen Vektorsystems konnten Garber et al. mMx1 in primären HEF exprimieren und diese vor einer WSN/33 (H1N1) Infektion schützen [269]. Neben dem ursprünglich isolierten Mx der Maus gelang es, ein weiteres Mx-Gen, welches mit dem bereits bekannten Mx der Maus nahe verwandt ist, zu isolieren. Dieses mMx2 zeigte 90% Homologie auf Proteinebene zum antiviralen Mx1 der Maus [270]. Sequenzanalysen zeigten, dass es durch ein zusätzliches Cytosin zu einer Verschiebung des Leserahmens beim mMx2 kommt und dieses nicht vollständig exprimiert wird. Mutiert man dieses Cytosin, wirkt auch mMx2 wieder antiviral [271]. In der Wildpopulation der Mäuse wurde ein mMx2 nachgewiesen, welches keine Unterbrechung des Leserahmens aufwies, durch Interferon in den Mäusen induzierbar war und eine geringe antivirale Aktivität gegenüber VSV zeigte [272]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das mMx2 der Wildpopulation in der Lage war die Akkumulation

viraler Transkripte und Proteine des Hantavirus zu hemmen. Die Influenza A Virus Replikation wurde jedoch nicht beeinflusst [273].

Das 78 kDa schwere MxA-Protein des Menschen wurde nach Stimulation von Leukozyten mit Typ I Interferon entdeckt [274, 275]. Etwas später isolierten Staeheli et al. huMxA aus humanen peripheren Blutleukozyten und wiesen das Protein in fetalen Lungenzellen, nach 4-stündiger Typ I Interferonstimulation, nach [276]. Des Weiteren wurde die Aminosäurezusammensetzung von mMx1 und huMxA im Vergleich analysiert. Hier stellte man fest, dass das Verhältnis der einzelnen Aminosäuren zwischen murinem und humanem Mx identisch war [277].

Erste Hinweise auf die Existenz von Hühner- und Enten-Mx fanden Bazzigher et al. und Bernasconi et al. [278]. Influenza A Viren replizieren sehr gut im Gastrointestinaltrakt junger Enten [67, 279]. Mithilfe von Primern, die anhand einer hoch konservierten Mx-Region der Säuger erstellt worden waren, gelang es aus genomischer Enten-DNA ein 147 Basenpaar großes Stück DNA zu amplifizieren. Dieses Stück wiederum hybridisierte an virusinduzierte mRNA aus embryonalen Entenzellen und codierte für ein Peptid, welches zu 80% identisch zum Säuger-Mx-Protein war. Western Blot Analysen virusinfizierter Entenzellen identifizierten vier unterschiedliche Formen von Mx-Protein. Dies resultierte mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Translation der Mx-mRNA von zwei unterschiedlichen Startcodons. Enten-Mx wird sowohl im Zytoplasma als auch im Kern der Zellen exprimiert. Das zytoplasmatische Enten-Mx scheint sich an Vesikel anzulagern. *In vitro* Infektionsexperimente zeigten jedoch keine antivirale Aktivität von Enten-Mx [280]. Enten-Mx wies die charakteristischen Strukturmerkmale des interferoninduzierten Säuger-Mx-Protein auf. Genau wie beim Säuger waren ein GTP-Bindungsmotiv und ein Leuzin-Zipper zu finden.

### 2.3.6 Mx beim Huhn

Nach der Ente wurde Mx im Huhn nachgewiesen. Schumacher et al. klonierten Hühner-DNA, welche mit der 147 Basenpaar großen Mx DNA-Sonde der Ente hybridisierte und Homologien zu den mMx1 Exons 3 und 4 aufwies [281].

Analysen zeigten, dass chMx aus 705 Aminosäuren besteht und ein errechnetes

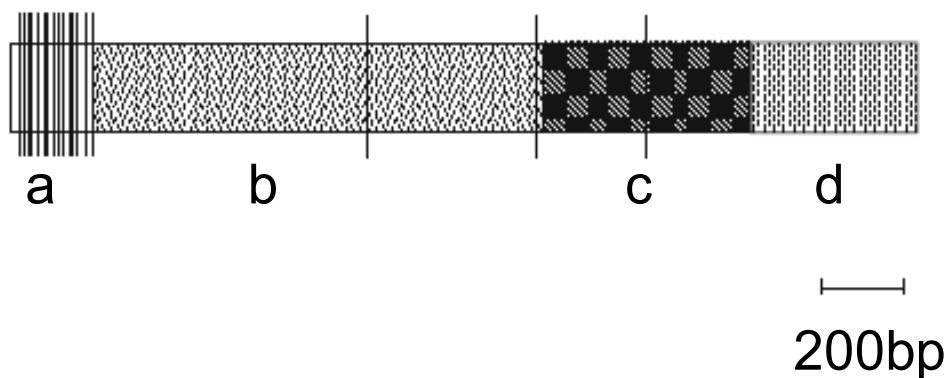
Gewicht von 79 kDa aufweist. Die ersten 84 n-terminalen Aminosäuren weisen keine signifikante Homologie zu anderen Mx-Proteinen auf. Eine höhere Homologie zum Enten- und Säuger-Mx zeigte sich ab einem Leuzin an Aminosäurenposition 85, welches in allen bisher bekannten Mx-Isoformen konserviert ist. Die folgenden 514 Aminosäuren zeigten 70% Sequenzidentität zum Enten-Mx und 50% Sequenz-Homologie zum Säuger-Mx-Protein. Konserviert zwischen den Spezies ist das dreiteilige GTP-Bindungsmotiv und eine c-terminal gelegene Region von 88 Aminosäuren. Somit ist auch der Leuzin-Zipper, welcher bei allen Spezies in dieser Region liegt, konserviert. Es zeigte sich, dass chMx im Zytoplasma der Zellen exprimiert wird, jedoch in stimulierten Zellen chMx kaum nachweisbar ist, im Vergleich zu transient mit chMx transfizierten Zellen [282]. Bei der Infektion von Maus 3T3 Zellen oder von Wachtel CEC32 Zellen, welche transient mit chMx transfiziert waren, zeigte sich keine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Virus bzw. VSV. Die Stimulation mit Interferon schützte 3T3 und CEC32 Zellen gegen VSV. Durch Interferon waren aber nur die Maus 3T3 Zellen gegen die Influenza A Infektion geschützt, wohingegen die CEC32 Zellen empfänglich blieben [282].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass chMx auch bei der Infektion mit anderen Viren als Influenza A im Huhn nach oben reguliert wird. So zeigten Wang et al., dass die Infektion mit Infektiösem Bronchitis Virus zu einer 6,5 fachen hochregulation von Mx auf Microarraybasis im Trachealepithel führt [283]. Nach diesen ersten Versuchen blieb jedoch unklar ob Mx im Huhn eine Rolle im antiviralen Status der Zelle nach Typ I Interferonstimulation gegenüber Influenza A Viren spielt oder nicht.

### 2.3.6.1 Vielfalt des Mx im Huhn

Vergleicht man die Sequenzen von drei domestizierten Hühnerlinien mit deren Vorfahren dem *Red Jungle Fowl* (RJF), finden sich 2,8 Millionen Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotid polymorphism* = SNP). Im Mittel ergibt sich hieraus eine Nukleotid-Diversität von 5 SNP/kb für jede Kombinationsmöglichkeit zwischen RJF und domestizierten Linien, zwischen zwei domestizierten Linien und innerhalb einer domestizierten Linie [284].

Auch beim chMx handelt es sich um ein hochpolymorphes Gen. Berlin et al. konnten zeigen, dass sich 11 bis 18 Codons unter positivem Selektionsdruck entwickelt haben. Der Großteil dieser Codons liegt in einer dem Vogel vorbehaltenen n-terminal gelegenen Mx-Region, sodass sich zeigte, dass es viele Unterschiede auf Aminosäurenbasis zwischen den verglichenen Hühnerlinien gab [285, 286].



**Abb. 5 Schematische Struktur des chMx-Gens mit positiv selektierten Codons**

a) Geflügel spezifische n-terminale Region von 100 Aminosäuren Länge b) GTPase-Domäne c) Zentrale-Interaktionsdomäne d) GTPase-Effektordomäne mit Leuzin-Zipper; senkrechte Linien markieren Codons welche der positiven Selektion unterliegen. Zwei Codons welche der Selektion unterliegen finden sich in der GTPase-Domäne wohingegen eines in der zentralen Interaktionsdomäne und der Rest in der Geflügel spezifischen n-terminalen Region liegt. Modifiziert nach Berlin et al. [285].

In einer Studie wurde versucht, chMx-Isoformen zu detektieren, welche eine antivirale Aktivität innehaben. Hierfür wurde die Mx-cDNA 15 verschiedener Hühnerlinien isoliert, sequenziert und verglichen. Dabei fanden sich 14 Nukleotidaustausche, welche auch zu einem Austausch auf Aminosäurenbasis führten. Ko et al. exprimierten diese Mx-Isoformen in Maus 3T3 Zellen und untersuchten hier die antivirale Aktivität der Mx-Isoformen gegenüber VSV und Influenza A Viren. Hier zeigte sich, dass ein Polymorphismus an Aminosäureposition 631 von Serin zu Asparagin dem chMx antivirale Aktivität zu verleihen scheint. In Zellen, welche ein chMx mit Asparagin an Aminosäureposition 631 exprimierten, fanden sie deutlich weniger infizierte Zellen bzw. signifikant niedrigere Virustiter [287].

Balkissoon et al. sequenzierten 28 verschiedene Hühnerlinien im Bereich des Mx-Exons 14 auf welchem der SNP für den 631 Polymorphismus lokalisiert ist [288].

Hierbei wurden 1 kommerzielle Linie, 8 Vorläuferlinien, 11 kommerzielle Broilerlinien, 4 Broilervorläuferlinien und 4 Mehrzwecklinien verwendet. Die Multifunktionslinien, welche sich über ein Jahrhundert unter verschiedenem Selektionsdruck entwickelt haben, weisen beide Mx-Allele in gleicher Frequenz auf, wohingegen die Fleischlinien das als resistent beschriebene 631N-Allel weitgehend verloren haben. Legehennen zeigen vornehmlich das 631N-Allel für Mx. Untersucht man die Häufigkeit des 631N- bzw. 631S-Allels in Broilerlinien findet sich fast ausschließlich das Allel, welches ein Serin an Aminosäurenposition 631 trägt [289].

Es wurden Bereiche auf Chromosom 1 entschlüsselt, welche eine entscheidende Rolle für das Wachstum der Broiler spielen und nahe mit dem Mx-Gen zusammen liegen, sodass hier ein Austausch bestimmter Mx-Allele aufgrund der Zucht denkbar ist, was die hohe Frequenz des 631S Mx-Allels innerhalb der Broiler Linien erklären könnte [290-292]. Um die sehr breite Verteilung der verschiedenen Mx-Allele zu erforschen, wurde eine Hühnerlinie auf den Polymorphismus an Aminosäurenposition 631 hin untersucht, deren weibliche Vorfahren der *Plymouth Rock Bird*, eine schnell wachsende Rasse und deren männlicher Vorfahre der *White Cornish Bird* war [293]. Alle Vögel dieser Vorfahren waren homozygot für ein Serin an Aminosäurenposition 631 und somit potenziell anfällig gegenüber Influenza A Virusinfektionen, was daraufhin deutet, dass die Ahnen der heutigen Hühnerlinien eine hohe Frequenz für das 631S Mx-Allel aufwiesen [288]. Geht man davon aus, dass Broiler 80% der Population der rund 40 Billionen Hühner weltweit ausmachen und die Vielzahl dieser Broiler das 631S Mx-Allel trägt, würde eine Selektion hin auf das 631N Mx-Allel in diesen Tieren Sinn machen und wäre ein in kurzer Zeit zu erreichendes Ziel. Hierfür wurde von Seyama et al. eine PCR etabliert mit deren Hilfe es sehr einfach möglich ist Individuen auf den Polymorphismus an Aminosäureposition 631 zu untersuchen. In dieser Studie wurden erneut 35 Hühnerlinien untersucht und es zeigte sich, dass 40,8% der untersuchten Hühnerlinien das 631N Mx-Allel trugen wohingegen 59,2% das 631S Mx-Allel trugen. Weiß Leger zeigten hier erneut eine hohe Frequenz des 631N Mx-Allels. Weiterhin wurden drei verschiedene *Jungle Fowl* Tiere untersucht. Hier wies nur ein Individuum das 631N Mx-Allel auf [294].

Um abzuklären ob die Zucht von Hühnern auf das 631N Mx-Allel womöglich Auswirkungen auf andere Merkmale außer einer Resistenz gegenüber Influenza A Viren haben könnte wurden 100 Vatertiere von drei kommerziellen Broilerlinien auf 3 SNP's im Mx-Gen hin genotypisiert und Assoziationen zwischen diesen SNP's und kommerziell bedeutsamen Charaktereigenschaften gesucht. Es zeigte sich, dass das 631N Mx-Allel mit der Zunahme der Körpermasse ab Tag 40 unter schlechten Hygienebedingungen und mit höheren Antikörpertitern gegen Infektiöse Bursitis Disease in Betrieben mit hohem Hygienestandard einherging. Weiterhin wurde eine signifikant erhöhte frühe Mortalitätsrate unter beiden Hygienebedingungen und eine signifikant erniedrigte spät Mortalitätsrate unter hohen Hygienestandards beobachtet. Ebenso schien das 631N-Allel mit einer höheren Inzidenz an subklinischer Tibia Dyschondroplasia einherzugehen [295].

### **2.3.6.2 Antivirale Wirkung von Mx im Huhn**

In ersten Untersuchungen mit rekombinantem chMx konnte keine antivirale Aktivität von chMx gegenüber Influenza A Viren und VSV nachgewiesen werden [282]. Nachfolgende Arbeiten postulierten, dass ein Polymorphismus an Aminosäureposition 631 von Serin zu Asparagin dem chMx antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren und VSV verleihe [287].

Ko et al. transfizierten Maus 3T3 Zellen mit den zwei chMx-Isoformen und infizierten diese mit VSV-eGFP. Hierbei waren die chMx631N-3T3 Zellen signifikant weniger VSV-eGFP positiv, als die 631S-3T3 Zellen [296]. Die Nähe der Mutation zum Leuzin-Zipper ließ Raum für Spekulationen, ob dieser eine entscheidende Rolle in der antiviralen Abwehr durch das Mx-Protein spielt. Alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Daten ließen vermuten, dass die Selektion auf Asparagin an Aminosäureposition 631 im chMx-Protein zur Erzeugung von Influenza A Virus resistenten Hühnern führen würde.

Bei der Generierung von Zellkulturtestsystemen, welche in der Lage sein sollten antivirale Mx-Allele in kommerziellen Hühnerlinien zu identifizieren und die funktionelle Bedeutung weiterer Polymorphismen neben dem an Position 631 zu untersuchen, bemerkten Benfield et al. jedoch, dass Hühnerembryofibroblasten mit endogenem Serin oder Asparagin an Aminosäureposition 631 im chMx



gleich anfällig gegenüber Influenza A Virusinfektionen sind [297]. Benfield et al. untersuchten die beiden chMx-Isoformen nun sowohl in primären HEF, als auch in HEK293T Zellen hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität gegenüber Influenza A und VSV. Hierbei war kein antiviraler Effekt der beiden chMx-Isoformen zu beobachten, was die Ergebnisse von Ko et al. deutlich infrage stellte [287, 296].

Auch in *in vivo* Hühnermodellen wurde nach der Infektion mit einem hoch pathogenen Influenza A Virus die Induktion von Mx auf mRNA-Ebene gemessen. Hier zeigte sich zwar eine deutliche Mx-Induktion, jedoch starben alle Tiere in den ersten 48 Stunden nach der Infektion [298].

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle des chMx-Proteins umfassend zu analysieren und dabei insbesondere aviäre Zellkultursysteme und *in vivo* Modelle zu nutzen.

Dazu sollten zunächst Expressionssysteme für die verschiedenen chMx-Isoformen erstellt werden, um durch Überexpression der Gene in Hühnerzellen deren antivirale Aktivität quantifizieren zu können. Zusätzlich sollte eine *in vitro* Knockdown-Methode auf der Basis der RNA *interference* etabliert werden, welche die funktionelle Analyse des endogenen chMx ermöglicht. Diese Untersuchungen sollten sowohl mit niedrig als auch mit hoch pathogenen geflügelspezifischen Influenza A Viren durchgeführt werden.

Ergänzend hierzu sollten die verschiedenen chMx-Isoformen mithilfe des retroviralen Gentransfersystems RCAS in Hühnerembryonen überexprimiert werden, um deren antivirale Aktivität gegenüber niedrig pathogenen Influenza A Viren untersuchen zu können.

Alle *in vitro* und *in vivo* Studien sollten zudem vergleichend mit murinem und humanem Mx-Protein durchgeführt werden, welche als Positivkontrollen in den Versuchsansätzen dienen sollten.

Nachdem für huMxA gezeigt werden konnte, dass es sich um ein Protein mit GTPase-Aktivität handelt und diese maßgeblich an der Oligomerisierung und damit an der Stabilität des Proteins und an dessen antiviraler Wirkung beteiligt ist, sollte in dieser Arbeit auch das chMx als rekombinantes Protein gewonnen und für die Analyse der GTPase-Aktivität in gereinigter Form eingesetzt werden.

## 4 Material und Methoden

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang aufgeführten Bezugsquellen. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

### 4.1 Tiere und Tierhaltung

#### 4.1.1 Hühner

Die Eier der Hühnerlinien LSL (*Lohmann's selected Leghorn*) stammten von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven.

Die Eier der Linie 0 (*Compton subline*) wurden vom *Institute for Animal Health* in Compton, UK geliefert.

Die Eier der Linie M11 (*B<sup>2/2</sup>-Haplotyp*) stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee.

Alle Eier wurden im Institut für Tierphysiologie unter Standardbedingungen bebrütet.

Die *in vivo*-Versuche mit Hühnern der Linie M11 wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.2-1-2531-121-09 genehmigt. Die Hühner wurden in Gruppen in Gitterrostkäfigen und Volieren gehalten. Es wurde handelsübliches Alleinfutter gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

#### 4.1.2 Kaninchen

Zur Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurde ein Kaninchen der Rasse New Zealand White<sup>1</sup> immunisiert. Das Tier wurde einzeln im Käfig gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Genehmigung der Immunisierungen erfolgte unter der Nummer 55.2-1-54-2531.6-12-09 durch die Regierung von Oberbayern.

## 4.2 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Influenza A

### 4.2.1 Immunisierung

#### Material

##### Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0g Natriumchlorid (NaCl)<sup>2</sup>  
1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)<sup>2</sup>  
0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>2</sup>  
0,2g Kaliumchlorid (KCl)<sup>2</sup>  
ad 1000ml Aqua dest., Einstellung des pH-Werts mit HCl bzw. NaOH;  
Lagerung bei 4°C

##### Freund's komplettes Adjuvans<sup>3</sup> (FCA)

Lagerung bei 4°C

##### Freund's inkomplettes Adjuvans<sup>3</sup> (FIA)

Lagerung bei 4°C

##### gereinigtes PR8 Influenza A Virus (H1N1)

Lagerung bei -20°C

#### Durchführung

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Influenza A wurde ein Kaninchen mit gereinigtem PR8 (H1N1), welches zuvor mit 0,5% Triton X-100 inaktiviert worden war, immunisiert. Für die Erstimmunisierung wurden 200µl einer Lösung mit 1,5mg/ml PR8 (H1N1), 300µl PBS und 0,5ml Freund's komplettem Adjuvans (FCA) gemischt. Nach Emulgation durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine Kanüle (0,4mm Durchmesser) wurden dem Kaninchen 0,5ml der Lösung an der seitlichen Brustwand subcutan und 0,5ml in den Musculus biceps femoris injiziert. Für die Booster-Immunisterungen im Abstand von vier Wochen wurde Freund's inkomplettes Adjuvans (FIA) verwendet.

Das gereinigte PR8 (H1N1) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg, zur Verfügung gestellt.

## 4.2.2 Gewinnung des Antiserums

### Material

#### Röhren mit Serum Gerinnungsaktivator<sup>4</sup>

### Durchführung

In dreiwöchigem Abstand wurde dem Kaninchen ca. 20 bis 30ml Blut aus der Arteria auricularis media entnommen und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 400xg für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und nochmals unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert.

## 4.3 Zellen und Zellkultur

### 4.3.1 Gewinnung von primären Hühnerembryofibroblasten (HEF)

### Material

#### Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

#### Trypanblau-Lösung<sup>5</sup>

#### HEF-Medium

460ml	Basal ISCOVE <sup>5</sup>
25ml	FBS <sup>5</sup>
10ml	Hühnerserum <sup>3</sup>
5ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>5</sup>

#### 1x Trypsin-EDTA<sup>5</sup>

10ml	10x Trypsin-EDTA Lösung <sup>5</sup>
ad 100ml Aqua bidest.	

### Durchführung

HEF wurden aus Linie 0 sowie LSL-Embryonen gewonnen. Hühnerembryonen wurden am 10. Tag der Bebrütung durch Dekapitation getötet. Die Torsi wurden nach Abtrennen der Gliedmaßen in ein Becherglas mit ca. 2ml PBS gegeben und mechanisch zerkleinert. Bei der Herstellung größerer Chargen von Zellen wurden mehrere Embryonen zusammen mit 20ml 1x Trypsinlösung in einem größeren Kolben in einem Wasserbad bei 37°C unter rühren für 20 Minuten inkubiert.

Der Überstand wurde in 50ml Rörchen überführt, die restlichen Gewebeteile nach erneuter Zugabe von Trypsin bei 37°C weiter verdaut. Nach Sedimentation für 10 Minuten wurde der gewonnene Überstand abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C). Die pelletierten Zellen wurden mit HEF Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt und in Kultur genommen.

### 4.3.2 Zellkultur

#### 4.3.2.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellen	Medium	FBS	Hühnerserum	Antibiotikum
HEF	Basal ISCOVE <sup>5</sup>	25ml	10ml	5ml
DF1	DMEM mit 0,532g/l stabilem Glutamin, 4% Glucose <sup>5</sup>	50ml	0ml	5ml
CEC32#511	Basal ISCOVE <sup>5</sup>	40ml	10ml	5ml
Vero	DMEM mit 0,532g/l stabilem Glutamin, 4% Glucose <sup>5</sup>	50ml	0ml	5ml
MDCK/HEK293T	RPMI 1640 <sup>5</sup>	50ml	0ml	5ml

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien

#### G418-Stammlösung 50mg/ml

250mg G418<sup>5</sup>  
ad 5ml PBS

#### Accutase<sup>5</sup>

#### Standard-Einfriermedium

45ml FBS<sup>5</sup>  
5ml Dimethylsulfoxid (DMSO)<sup>2</sup>  
Lagerung bei -20°C

#### HEF-Einfriermedium

35ml RPMI 1640<sup>5</sup>  
10ml FBS<sup>5</sup>  
5ml DMSO<sup>2</sup>  
Lagerung bei -20°C

#### 4.3.2.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
HEK293T	Nierenfibroblasten	Mensch	HEK293T Medium	[299-301]
MDCK	Nierenepithelzellen	Hund	MDCK Medium	[302]
Vero	Nierenepithelzellen	Meerkatze	Vero Medium	[303-305]
CEC32#511	Wachtelfibroblasten	Wachtel	CEC32#511 Medium	[306]
DF1	Hühnerfibroblasten	Huhn	DF1 Medium	[307, 308]

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

#### 4.3.2.3 Kultivierung von Zellen

Bei adhären wachsenden HEK293T, CEC32#511, DF1 und primären HEF Zellen wurde zur Teilung das Medium vollständig abgenommen und der Zell-Monolayer zur Entfernung von FBS-Resten einmal kurz mit 37°C warmem PBS gespült und anschließend bei 37°C bzw. 40°C mit 1x Trypsin-Lösung inkubiert. Nach ca. 5 Minuten wurde das Trypsin mit Medium neutralisiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in der gewünschten Dichte in entsprechendem Medium aufgenommen und bei 37°C bzw. 40°C weiterkultiviert. Die MDCK Zellen wurden anstatt mit 1x Trypsin-Lösung mit 1x Accutase-Lösung inkubiert. Nach ca. 10 Minuten wurde die Accutase mit Standardmedium neutralisiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in der gewünschten Dichte in Standardmedium aufgenommen und bei 37°C weiterkultiviert.

#### 4.3.2.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert und in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Je 1,8ml der Zellsuspension wurden in entsprechende Gefriereröhrchen überführt und über Nacht in einer isopropanolhaltigen<sup>2</sup> Einfrierbox (Abkühlung 1°C/Minute) bei -80°C eingefroren.

Für eine vorübergehende Lagerung von einigen Monaten verblieben die Zellen bei -80°C, für eine längere Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

**4.3.2.5 Auftauen von Zellen**

Die gefrorene Zellsuspension wurde möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in ein 50ml Röhrchen überführt. Dann wurde 50ml kaltes RPMI möglichst langsam zugegeben, um zellschädliches DMSO langsam auszuwaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (225xg, 10 Minuten, 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in Medium resuspendiert und in Kultur genommen.



## 4.4 Vektoren und Klonierung

### 4.4.1 Verwendete Konstrukte

Laborinterne Konstrukte-Nr.	Vektor	Resistenz
K020	Cla12	Amp
K023	RCAS(BP)A	Amp
K036	pCAGGS.MCS(XmaI-)	Amp
K046	pBSKSII(+)	Amp
K050	PCR3-Ha-Flag	Amp/Neo

**Tabelle 5: Verwendete Vektoren**

Die Vektoren K020 und K023 wurden von Stephen H. Hughes, Ph.D, National Cancer Institute, Frederick USA dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Die Vektoren K036 und K046 wurden von Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Der Vektor K050 wurde von Prof. Dr. Pascal Schneider, Department für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz, hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Laborinterne Konstrukte-Nr.	Vektor	Insert	Ausgangskonstrukt	Klonierungsschnittstellen	Bakterien
K017	pEGFP-N1			NcoI/BsrGI	E.coli Top10
K032	pTZ18/U	chMx631S	pCL642-chMx	EcoRI/BamHI	E.coli Top10
K033	pBSKSII(+)	chMx631N	K032	NotI/XhoI	E.coli Top10
K037	pCAGGS.MCS(XMAI-)	chMx631S	K033	NotI/XhoI	E.coli Top10
K038	pCAGGS.MCS(XMAI-)	chMx631N	K033	NotI/XhoI	E.coli Top10
K051	RCAS(BP)A	eGFP	K017	Clal	E.coli JM109
K052	RCAS(BP)A	chMx631S	K033	Clal	E.coli JM109
K053	RCAS(BP)A	chMx61N	K034	Clal	E.coli JM109
K055	pCDNA3.1	mMx1		BamHI/EcoRI	E.coli Top10
K059	pCDNA3.1	huMxA		BamHI/EcoRI	E.coli Top10
K057	RCAS(BP)A	mMx1	K055	Clal	E.coli JM109
K062	RCAS(BP)A	huMxA	K059	Clal	E.coli JM109
K090	PCR3-Ha-Flag	chMx631S	K052	Sall	E.coli Sure
K100	pCDNA3.1	Flag-huMxA	pSP64-Flag-MxA		E.coli JM109

Tabelle 6: Verwendete Konstrukte

Die Konstrukte K032, K055, K059 und K100 wurden von den Arbeitsgruppen Prof. Dr. Georg Kochs und Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg, hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt K017 wurde von der Firma Clontech Laboratories, Kalifornien, USA erworben.

Das Konstrukt K051 wurden in voran gegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Kaspers erstellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte K032, K033, K034, K037, K038, K052, K053, K057, K062 und K090 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Der Ablauf der Klonierungen und die genauen Methoden folgen in den nächsten Punkten dieses Kapitels.

#### 4.4.2 Erzeugen von chemisch kompetenten Bakterien

Für die Klonierung der Konstrukte wurden verschiedene Bakterienstämme (siehe Tabelle 11) chemisch kompetent gemacht.

##### Material

###### Bakterienglycerinstock

Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$

###### Lysogeny Broth (LB)-Medium

25g LB-Medium<sup>2</sup>

ad 1000ml Aqua dest.

Einstellung auf pH 7,2, sofort nach Herstellung autoklavieren

Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$

###### LB-Agar-Platten

###### 0,2M Essigsäure

2,4g Essigsäure<sup>2</sup>

ad 200ml Aqua dest.

###### 10M Kaliumhydroxid (KOH)

56,11g KOH<sup>2</sup>

ad 100ml Aqua dest.

###### Transformation Buffer (TFB) 1

0,11g Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )<sup>2</sup>

1,21g Rubidiumchlorid ( $\text{RbCl}$ )<sup>2</sup>

0,29g Kaliumacetat<sup>2</sup>

0,99g Magnesiumchlorid-Tetrahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ )<sup>2</sup>

15ml Glycerin<sup>2</sup>

ad 100ml Aqua dest. , durch  $0,22\mu\text{m}$  Filter steril filtrieren

Mit 0,2M Essigsäure vorsichtig auf pH 5,8 einstellen

###### TFB 2

0,83g  $\text{CaCl}_2$ <sup>2</sup>

0,12g  $\text{RbCl}$ <sup>2</sup>

0,21g 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)<sup>2</sup>

15ml Glycerin<sup>2</sup>

ad 100ml Aqua dest. , mit 10M KOH auf pH 6,8 einstellen

Alle aufgeführten Reagenzien wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Mit einer Plastik-Öse wurden Kristalle des entsprechenden Bakterienstocks abgekratzt, auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am Folgetag wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 10ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C und 200rpm geschüttelt. Diese Bakteriensuspension wurde nach 12 Stunden in 100ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und erneut bei 37°C und 200rpm inkubiert. Alle 30 Minuten wurde die OD<sub>600</sub> photometrisch gemessen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde jetzt in 50ml Falcon Röhren überführt und 5 Minuten auf Eis gestellt, danach erfolgte die Zentrifugation bei 4000xg, 4°C für 5 Minuten. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 30ml eiskaltem TFB 1 gelöst und für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000xg und 4°C für 5 Minuten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 4ml eiskaltem TFB 2 resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde nun zu Portionen von 100µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

#### 4.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Klonierung wurde eine Polymerase mit sog. *proof reading* Aktivität (PFU-Polymerase) verwendet, was die Fehlerhäufigkeit bei der Amplifizierung der DNA-Stücke vermindert.

##### Material

**10x Puffer mit Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)<sup>8</sup>**

**PFU Polymerase<sup>8</sup>**

**dNTPs<sup>8</sup>**

**Aqua bidest. (nucleasefrei)**

##### Primer

Die Primer wurden mithilfe des Programms *Perl Primer* erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Zielsequenz	Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
chMx	1243	gacagaGCGGCCGCATCGATatgaacaatccatggtccaac (sense)	Anfügen der Schnittstelle <i>NotI/ClaI</i> Klonierung in pCAGGS/MCS(XMAI-)
chMx	1244	gacagaCTCGAGATCGATctacagagactaaagtctaccagg (antisense)	Anfügen der Schnittstelle <i>ClaI/XhoI</i> Klonierung in pCAGGS/MCS(XMAI-)
mMx1	1258	ATCGATatggattctgtgaataac (sense)	Anfügen der Schnittstelle <i>ClaI</i> Klonierung in RCAS(BP)A
mMx1	1259	ATCGATtaatcggagaatttgca (antisense)	Anfügen der Schnittstelle <i>ClaI</i> Klonierung in RCAS(BP)A
huMxA	07049	cgtcATCGATatggtgtttccgaag (sense)	Anfügen der Schnittstelle <i>ClaI</i> Klonierung in RCAS(BP)A
huMxA	07052	caacATCGATtaaccggggaactgggcaag (antisense)	Anfügen der Schnittstelle <i>ClaI</i> Klonierung in RCAS(BP)A
chMx	08075	gtctGTCGACctacagagactaaagtc (sense)	Anfügen der Schnittstelle <i>Sall</i> Klonierung in PCR3-HA-Flag
chMx	08076	gacgaGTCGACaacaatccatggtccaac (antisense)	Anfügen der Schnittstelle <i>Sall</i> Klonierung in PCR3-HA-Flag

**Tabelle 7: In der Klonierung verwendete Primer**

Die Sequenzen der Enzymschnittstellen sind in Großbuchstaben dargestellt.

## Durchführung

### Ansatz für eine PCR-Reaktion

10x Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	5µl
dNTPs (jeweils 200µm)	5µl
Primer sense (10pm)	10µl
Primer antisense (10pm)	10µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	variabel
DNA Probe (1ng)	variabel
PFU Polymerase (1,25U)	0,5µl
Gesamt	50µl

Für die PCR wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Bedingungen gewählt. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	3min	1
Denaturierung	95°C	30sec	1 bis 35
Annealing	primerspezifisch	30sec	1 bis 35
Elongation	70-75°C	2-4min, je nach Länge des Amplifikats	1 bis 35
Finale Elongation	70-75°C	5min	35

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die PFU Polymerase PCR

#### 4.4.4 Bakterien PCR

##### Material

**Puffer B<sup>11</sup>**

**MgCl<sub>2</sub><sup>11</sup>**

**Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)<sup>8</sup>**

**Aqua bidest. (nucleasefrei)**

**Hot Start Taq Polymerase (5U/µl)<sup>11</sup>**

##### Primer

Die Primer wurden mithilfe des Programms *Perl Primer* erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Zielsequenz	Primer.-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
chMx	1237	tggggctcctactaaaccag	Erfolgskontrolle der Klonierung von chMx in PCR3-Ha-Flagc
chMx	1238	cctccagcttcgtaatttc	
RCAS(BP)A	07019 sense	gagcaaggcaggaaagacag	Erfolgskontrolle der Klonierung von chMx, huMxA und mMX1 in RCAS(BP)A
RCAS(BP)A	07020 antisense	ctaaccgctacaaccgaag	

Tabelle 9: Primer zur Erfolgskontrolle der Ligation

## Durchführung

### Ansatz für eine PCR-Reaktion

10x Puffer B	2,5µl
dNTPs (jeweils 200µM)	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2µl
Primer sense (10pM)	5µl
Primer antisense (10pM)	5µl
H <sub>2</sub> O (nucleasefrei)	6,8µl
Bakteriensuspension	1µl
HotStart Taq Polymerase (1 Unit)	0,2µl
Gesamt	25µl

Zur Erfolgskontrolle von Ligationen wurden von den bebrüteten Agarplatten mit einer Pipettenspitze Einzelkolonien gepickt und in 200µl LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) für zwei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 1 µl dieser Suspension wurde als PCR-Template eingesetzt. Für die PCR wurden entweder insertspezifische Primer oder 5' und 3' des Inserts im Vektor bindende Primer verwendet.

### 4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

#### Material

##### Probe

##### 5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

54g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) <sup>2</sup>
27,5g	Borsäure <sup>2</sup>
20ml	0,5M EDTA <sup>2</sup> , pH 8
ad 1000ml Aqua dest.	

**0,5x TBE-Puffer**

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

**6x Loading Dye (Ladepuffer)<sup>8</sup>****DNA-Ladder-Mix (Marker)<sup>8</sup>****Ethidiumbromid Stammlösung**

10 mg Ethidiumbromid<sup>2</sup>

ad 1 ml Aqua dest., Lagerung bei 4°C

Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 mit Aqua dest. verdünnt.

**Durchführung**

Die in 0,5x TBE-Puffer in einer Konzentration von 1% angesetzte Agarose wurde im Mikrowellenherd erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in die Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach ca. 30 Minuten konnte das Gel in die Gelkammer überführt und dort mit dem Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet werden. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer gemischt (5 Teile Probe + 1 Teil Puffer) und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Referenz wurde in eine Tasche Marker (DNA-Ladder-Mix) gegeben, der verschiedene DNA-Fragmente definierter Längen enthält. Nach Anlegen einer konstanten Spannung von 100 bis 120 V wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel in Richtung der Kathode. Nach 25 bis 30 Minuten wurde das Gel für 30min in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die aufgetrennten Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Bei einem präparativen Gel zur Aufreinigung von DNA wurden die entsprechenden Banden auf einem UV-Schirm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

**4.4.6 Zielgerichtete Mutagenese**

Um ungewollte Polymorphismen im chMx-Gen auszuschließen wurde der benötigte Basenaustausch, welcher zu einem Aminosäureaustausch führte, per zielgerichteter Mutagenese erzeugt. Hierfür wurde zunächst das chMx631S in den Mutagenese-Vektor pBSKSII(+) kloniert. Da pBSKSII(+) nur 2920bp groß ist und sich damit genauer und schneller als andere Vektoren amplifizieren lässt, ist er damit gut für die Mutagenese geeignet.



Zielsequenz	Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
chMx	1254	cactggagcaaAtaaacgcctgagcaatcagattc	Mutagenese chMx S631N
chMx	1255	gctcaggcgttTatttgctccagtgaaataggcc	

**Tabelle 10: Verwendete Mutageneseprimer**  
Nukleotid für Mutagenese in Großbuchstaben

Die Punkt-Mutagenese wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenese Kit<sup>10</sup> nach Herstellerangaben durchgeführt. Da die Ausgangs-DNA aus E.coli Top10 Bakterien aufgereinigt wurde, sind hier alle *DpnI* Erkennungssequenzen *dam* methyliert. Nach der PCR mit den Mutageneseprimern wurde das Restriktionsenzym *DpnI* der PCR-Reaktion zugegeben. *DpnI* schneidet nur *dam* methylierte Sequenzen daher wird die Ausgangs-DNA vollständig *DpnI* verdaut und nur die im Rahmen der Mutagenese erzeugte DNA bleibt erhalten, da die *DpnI*-Erkennungssequenzen im Rahmen der PCR-Reaktion nicht methyliert wurden. Nach der Inaktivierung des Restriktionsenzym *DpnI* wurde 1µl der Reaktion in die, im Kit enthaltenen superkompetenten XL1-Blue Bakterien transformiert und auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausplattiert. Die hier erhaltenen Klone wurden gepickt, in LB-Medium hochgeschüttelt, die DNA aufgereinigt und per Sequenzierung durch die Firma GATC, Konstanz auf die korrekte Sequenz überprüft.

#### 4.4.7 Restriktionsenzymverdau von Vektor und Insert

Nachdem die Inserts in der PCR amplifiziert und mit den passenden Schnittstellen versehen worden waren, wurden sie ebenso wie die Vektoren mit Restriktionsenzymen verdaut. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Enzyme zu gewährleisten, wurde der vom Hersteller für das gewählte Enzym oder die gewünschte Enzymkombination empfohlene Puffer verwendet. Für diagnostische Verdaus wurden 300ng DNA und für präparative Verdaus 4µg DNA eingesetzt.

### Material

DNA

Restriktionsenzyme<sup>8</sup>

### **Puffer zu Restriktionsenzymen<sup>8</sup>**

#### **Aqua dest., nucleasefrei**

Die angegebenen Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

### **Durchführung**

#### **Ansatz für eine Reaktion**

Plasmid (0,3 - 4µg)	variabel
Puffer (10x)	2µl
Enzym 1	variabel
Evtl. Enzym 2	variabel
ad 20ml Aqua dest. (nucleasefrei)	

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Ansätze für diagnostische Verdaus 1 Stunde und für präparative Verdaus 3 Stunden in einem Thermoschüttler bei 37°C und 250rpm inkubiert und die Enzyme danach bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. PCR amplifizierte Inserts wurden nach dem Verdau mithilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II<sup>7</sup> Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Vektoren wurden aufgrund ihrer Größe über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

#### **4.4.8 Aufreinigung von DNA**

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsenzymverdau, aus ausgeschnittenen Banden sowie die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mithilfe des Kits NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II<sup>7</sup> nach Herstellerangaben.

#### **4.4.9 Dephosphorylierung des Vektors**

Um freie DNA-Enden für eine Ligation zu erhalten, wurde der verdaute und aufgereinigte Vektor mit einer Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

### **Material**

#### **Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)<sup>8</sup>**

#### **CIAP Puffer<sup>8</sup>**

#### **Aqua dest., nucleasefrei**

Die angegebenen Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

## Durchführung

### Ansatz

Vektor (verdaut und aufgereinigt)	10-40µl
10x CIAP Puffer	5µl
ad 49µl Aqua dest., nucleasefrei	
CIAP	1µl

Zunächst wurden Vektor-DNA, Puffer und Wasser vermischt und danach die Phosphatase zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C und 250rpm für 30 Minuten auf einem Thermoblock wurde das Enzym für 15 Minuten bei 85°C inaktiviert.

### 4.4.10 Ligation von Insert und Vektor

Bei der Ligationsreaktion werden Vektor und Insert entsprechend ihres Molekulargewichts und in einem bestimmten Verhältnis zueinander (siehe unten) mit der Ligase inkubiert. Diese verbindet die dephosphorylierten DNA-Enden des Vektors mit dem Insert.

### Material

**T4 Ligase<sup>8</sup>**

**10x T4 Ligasepuffer<sup>8</sup>**

**Aqua dest., nucleasefrei**

Alle aufgeführten Reagenzien wurden bei -20°C gelagert.

### Durchführung

Die Ligationsreaktion wurde mittels einer vereinfachten Gleichung wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Eingesetzte Menge an Vektor}}{\text{bp Vektor}} = \frac{x}{\text{bp Insert}}$$

Hierbei entspricht x der einfachen eingesetzten Menge an Insert. Bei der Klonierung wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 (Menge an Insert = 3x), 1:5 (Menge an Insert = 5x) und 1:8 (Menge an Insert = 8x) verwendet. Für die Ligation in RCAS(BP)A haben sich die Verhältnisse 1:5 und 1:8 bewährt.

**Ansatz**

Vektor (100ng)	variabel
Insert	variabel
10x Ligasepuffer ad 20µl Aqua dest.	2 µl
T4 Ligase	0,4 µl

Zusätzlich zur eigentlichen Ligationsreaktion wurde ein Kontrollansatz durchgeführt, in den nur Vektor-DNA gegeben wurde. Bei erfolgreicher Dephosphorylierung ist eine Verbindung der Vektorenden nicht möglich. Die Reaktionsgemische wurden bei Ligation in PCR3-HA-Flag, pCAGGS/MCS(XMAI-) und pBSKSII(+) für eine Stunde, bei Ligation in RCAS(BP)A für 8 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde das Reaktionsgemisch anschließend für 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

**4.4.11 Transformation von Bakterien**

Die neu erstellten Plasmide wurden unter Berücksichtigung der in Tabelle 11 aufgeführten Parameter in chemisch kompetente Bakterien transformiert.

Bakterienstamm	Bakteriensubtyp	Inkubation auf Eis	Hitzeschock	S.O.C:
E.coli	Top 10	30min	30sec	250µl
E.coli	JM109	10min	50sec	900µl
E.coli	KRX	5min	15sec	450µl
E.coli	SURE	30min	45sec	900µl

Tabelle 11: Verwendete Bakterien

**Material****Chemisch kompetente Bakterien**

Lagerung bei -80°C

***super optimal broth with catabolite repression-Medium (SOC Medium)***

5,1g SOB Pulvermedium<sup>2</sup>  
 150ml Aqua bidest.  
 2ml 250mM KCl<sup>2</sup> zugeben  
 Mit 1M HCL auf pH 7,0 einstellen  
 ad 200ml Aqua bidest., Autoklavieren der Lösung  
 1ml MgCl<sub>2</sub><sup>2</sup>-Lösung (2M, steril filtriert)  
 4ml Glucose<sup>2</sup>-Lösung (1M, steril filtriert)

### **LB-Amp-Agar-Platten**

Soweit nicht anders vermerkt, wurde dem noch flüssigen Agar (Temperatur < 60°C) Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

### **Durchführung der Transformation**

Die Bakterien wurden für 5 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden bei E.coli Top10 Bakterien 5µl ansonsten 10µl der Ligationsreaktion zugegeben. Da die Zellwand der Bakterien aufgrund chemischer Behandlung äußerst instabil ist, wurde die Suspension nicht durch auf und ab Pipettieren, sondern durch vorsichtiges Rühren vermischt. Nach einer Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien in einem, auf 42°C erwärmtem Wasserbad für eine Zeit von 15-50 Sekunden je nach Bakterienstamm hitzegeschockt und sofort danach wieder auf Eis gestellt. Zur Bakteriensuspension wurde nun SOC-Medium gegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation im Bakterienrührer bei 37°C und 200rpm. Danach wurden die Bakterien bei 1000xg für 10 Minuten abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200µl SOC Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde nun vollständig auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platte verteilt, welche über Nacht bei 37°C bebrütet wurde.

#### **4.4.12 Aufreinigung von Plasmid**

Das Plasmid wurde mittels Wizard<sup>®</sup> Plus Miniprep Kit<sup>9</sup> nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Überprüfung der Sequenz von der Fa. GATC, Konstanz sequenziert. Bei korrekter Sequenz wurde nochmals eine größere Menge an Plasmid mittels PureYield<sup>™</sup> Miniprep Kit<sup>9</sup> nach Herstellerangaben präpariert.

### **Material**

**LB-Amp-Medium**

**Wizard<sup>®</sup> Plus Miniprep Kit<sup>9</sup>**

**PureYield<sup>™</sup> Plasmid Midiprep System<sup>9</sup>**

### **Durchführung**

Es wurden mit einer Plastik-Öse Kristalle des entsprechenden Bakterienstocks abgekratzt und damit 10ml LB-Amp Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) beimpft.

Die Erlenmeyerkolben mit der Bakteriensuspension wurden für ca. 8 Stunden bei 37°C und 200rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Kultur über Nacht in ein größeres Volumen LB-Ampicillin-Medium umgesetzt. Für *high copy* Plasmide, die in größerer Anzahl in den Bakterien vorkommen, wurden 150ml kultiviert. Bakterien, welche das *low copy* Plasmid RCAS(BP)A tragen, wurden in 300ml inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System nach Herstellerangaben präpariert und die Konzentration mithilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 4.5 RNA Isolation mittels Trizol

Alle Arbeiten wurden mit RNase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Wiederverwendbare Geräte und Gegenstände wurden nach Benutzung für mindestens eine Stunde mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gespült oder nach Eintauchen in 96% Ethanol abgeflammt.

#### Material

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lagerung der Reagenzien bei RT.

##### **Trifast® Reagenz<sup>23</sup>**

Lagerung bei 4°C

##### **Chloroform pro analysis<sup>2</sup>**

##### **Aqua bidest., nucleasefrei**

Lagerung bei -20°C

##### **Isopropanol<sup>2</sup>**

##### **70% Ethanol**

70ml Ethanol absolut<sup>2</sup>  
30ml nukleasefreies Aqua bidest.

#### Durchführung

Für die Isolation von RNA aus Zelllinien und primären HEF wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und dann 1 ml kaltes Trifast® Reagenz pro 1x10<sup>7</sup> Zellen zugegeben.

Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber gelöst und im Trifast<sup>®</sup> Reagenz resuspendiert. Danach konnte direkt mit der RNA-Isolation fortgefahren werden. Organproben wurden, wie unter 4.25.1 beschrieben homogenisiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sekunden geschüttelt, 5 Minuten bei RT inkubiert und 15 Minuten bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert, wodurch die organische von der RNA-haltigen wässrigen Phase getrennt wurde. Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Probengefäß transferiert, mit 500µl Isopropanol versetzt und nach kurzem Schütteln für 10 Minuten bei RT inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der RNA. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12.000xg) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals 5 Minuten bei 4°C mit 7500xg zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 20 bis 400µl je nach Größe des Pellets nukleasefreiem-Wasser aufgenommen, für 10 Minuten auf 58°C erwärmt und nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration (OD<sub>260</sub>) bei -80°C gelagert.

## 4.6 Reverse Transkription von RNA

### 4.6.1 DNase Verdau von RNA Proben

#### Material

##### RNA Proben

Lagerung bei -80°C

##### DNase<sup>8</sup> (1U/µl)

Lagerung bei -20°C

##### Puffer DNase<sup>8</sup>

Lagerung bei -20°C

##### Aqua bidest. (nucleasefrei)

Lagerung bei -20°C

##### 25mM EDTA Lösung<sup>8</sup>

Lagerung bei -20°C

## Durchführung

### Ansatz für einen DNase Verdau

RNA	1 µg
Puffer DNase	1 µl
DNase	1 µl (1U/µl)
RNAse freies Wasser	ad 10 µl

Nach Ansetzen der Reaktion wird diese vorsichtig gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNase durch Zugabe von 1 µl 25mM EDTA Lösung und 10 Minuten Erwärmen auf 65°C gestoppt.

### 4.6.2 cDNA Synthese

Nach dem Verdau der genomischen DNA wurde die verbleibende RNA dazu genutzt von einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase zu synthetisieren.

## Material

### RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit<sup>8</sup>

Lagerung bei -20°C

### DNase Verdau

#### Aqua bidest. (nucleasefrei)

Lagerung bei -20°C

## Durchführung

Der gesamte Ansatz aus dem DNase-Verdau wurde für die Reverse Transkriptionsreaktion verwendet. Die Reaktion wurde streng nach Herstellerangaben angesetzt und durchgeführt.

### Ansatz für Reverse Transkription

DNase Verdau	10 µl
Nucleasefreie Aqua bidest.	1,5 µl
Random Hexamer Primer (100pmol)	1 µl
5 Minuten bei 65°C	
RiboLock <sup>TM</sup> RNase Inhibitor	0,5 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl
dNTP Mix, 10mM je	2 µl
5 Minuten bei RT	
RevertAid <sup>TM</sup> H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	



**Reaktionsbedingungen Reverse Transkription**

10 Minuten bei	+25°C
60 Minuten bei	+42°C
10 Minuten bei	+70°C

Im Anschluss wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**4.7 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)**

Die Reverse Transkriptase PCR dient dazu, bestimmte Bereiche der, aus der mRNA synthetisierten cDNA, mit genspezifischen Primern zu amplifizieren. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen als Nachweismethode für die Überexpression der RCAS-Konstrukte in Hühnerembryonen und zum anderen zur Amplifikation der chMx Sequenz aus primären Linie 0 HEF genutzt.

**Material**

**Puffer B<sup>11</sup>**

**MgCl<sub>2</sub><sup>11</sup>**

**dNTPs<sup>8</sup>**

**Aqua bidest. (nukleasefrei)**

**Hot Start Taq Polymerase (5U/μl)<sup>11</sup>**

**Primer**

Die Primer wurden mithilfe des Programms *Perl Primer* erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Zielsequenz	Primer.-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
chMx	08023	ttggatgtcccattcagat	Amplifikation chMx aus Linie 0 HEF
chMx	09047	ccacaatgattgtctctttgc	
chMx	09048	ccagaatgcatcagagggtga	Amplifikation chMx aus Linie 0 HEF
chMx	09049	tccttccatgcattgtctg	
chMx	09050	atgcactgcaacaagcaaag	Amplifikation chMx aus Linie 0 HEF
chMx	09051	tccttgcaagagatgcaaca	
chMx	09052	ggagcaagtaaacgcctgag	Amplifikation chMx aus Linie 0 HEF

Zielsequenz	Primer.-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
chMx	09053	aggttgctgctaattggagga	Amplifikation chMx aus Linie 0 HEF
mMx1	09054	ctcctatgatgacatcgaag	Kontrolle der mMx1 Überexpression
mMx1	09055	gatccttgaagaagactg	
huMxA	09056	ggcttgcttcacagatgttc	Kontrolle der huMxA Überexpression
huMxA	09057	tggccttctgaagctgctg	
p19	09058	gtctctccccagggtccg	Kontrolle der p19 Überexpression
p19	09059	tctcgctgcacactgtttctc	

Tabelle 12: Primer für RT-PCR

## Durchführung

### Ansatz für eine PCR-Reaktion

10x Puffer B	2,5µl
dNTPs (je 200µM)	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2µl
Primer sense (10pM)	5µl
Primer antisense (10pM)	5µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	6,8µl
cDNA	1µl
HotStart Taq Polymerase (1Unit)	0,2µl
Gesamt	25 µl

Die RT-PCR Reaktion wurde wie beschrieben angesetzt, vorsichtig gemischt und dann in einem Thermocycler inkubiert.

Die Annealing Temperatur richtete sich nach den jeweils verwendeten Primerpaaren. Als Extensionszeit wurde bei allen Primerpaaren 1 Minute gewählt. Im Anschluss an die jeweilige RT-PCR Reaktion wurde der Erfolg im Rahmen einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

## 4.8 Quantitative RT-PCR

### Material

cDNA

QuantiTect SYBR Green PCR Kit<sup>12</sup>

### Primer

Die Primer wurden mithilfe des Programms *PrimerExpress* erstellt. Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Zielsequenz	Primer.-Nr.	Sequenz (5' → 3')
chMx	08077	gcgacaagccatagaacaag
chMx	08049	ggcaccaccaaaaactcctaca
18S rRNA	07023	catgtctaagtacacacggcggtta
18S rRNA	07024	ggcgctcgtcggcatgtatta

Tabelle 13: Primer für quantitative RT-PCR

Aqua bidest. (nukleasefrei)

### Durchführung

#### Ansatz für eine quantitative RT-PCR-Reaktion

QuantiTect SYBR Green Mix	12,5µl
Primer sense (300nM)	1,5µl
Primer antisense (300nM)	1,5µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	8,5µl
cDNA	1µl

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95°C	15min	1
Denaturierung	94°C	15sec	1 bis 40
Annealing	59°C	30sec	1 bis 40
Elongation	72°C	30sec	1 bis 40

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die quantitative RT-PCR

Die quantitative-RT-PCR Reaktion wurde, wie beschrieben angesetzt, vorsichtig gemischt und dann in einem 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), wie in Tabelle 14 angegeben, inkubiert. Jede quantitative-RT-PCR wurde als Duplikat durchgeführt. Die Spezifität der quantitativen-RT-PCR Produkte wurde anhand der Schmelzkurven analysiert. Zur Normalisierung der Daten wurde der *cycle threshold* (CT) Wert des *housekeeping* Gens (18S rRNA) von dem CT-Wert des Zielgens subtrahiert (=dCT).

## 4.9 Transfektion von Zellen

### 4.9.1 Transfektion von Zelllinien

#### Material

Zellen

RPMI 1640<sup>5</sup>

Fugene HD<sup>®13</sup>

#### Durchführung

Am Tag vor der Transfektion wurden zu 90% konfluente Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Delle einer 24-Loch Platte ausgesät. Die Transfektionslösung wurde hergestellt, indem zunächst 2µg Plasmid in 100µl RPMI 1640, sowie 6µl Fugene HD<sup>®13</sup> in Polypropylenröhrchen vermischt wurden. Diese Lösung wurde dann zur Bildung eines DNA-Lipid-Komplexes für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden Zellen oder Zellkulturüberstand analysiert.

Für die Transfektion in 6-Loch Platten bzw. Petrischalen (10cm Ø) wurden die Volumina entsprechend angepasst.

### 4.9.2 Transfektion von primären Hühnerembryofibroblasten

Für die Transfektion von primären HEF mit den auf RCAS(BP)A basierenden Plasmiden wurde die Methode der CaCl<sub>2</sub> Präzipitation verwendet.

**Material****0,1x Tris EDTA-Puffer (TE)**

1,21g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)<sup>2</sup>  
200µl 0,5M EDTA-dinatriumhydrat (pH 8,0)<sup>2</sup>  
ad 1000ml Aqua dest., Einstellung auf pH 8,0

**2x HEPES buffered saline (HBS)**

1,6g NaCl<sup>2</sup>  
74mg KCl<sup>2</sup>  
27mg Di-Natriumhydrogenphosphat<sup>2</sup>  
0,2g Glucose<sup>2</sup>  
ad 80ml Aqua dest.  
5ml HEPES (1M)<sup>2</sup>  
Einstellung auf pH 7,05

**2M Calciumchlorid-Lösung**

2,94 ml CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O<sup>2</sup>  
ad 10 ml Aqua dest.

Die oben genannten Lösungen wurden nach dem Ansetzen durch einen 0,22µm Filter steril filtriert und zu 500µl aliquotiert bei -20°C gelagert.

**HEF-Medium + 15% Glycerin**

1,5ml Glycerin (steril)<sup>2</sup>  
ad. 15ml HEF Medium, Herstellung steril, Lagerung bei 4°C

**Durchführung**

Primäre Hühnerembryofibroblasten (HEF) der Linien „0“ oder LSL wurden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und über Nacht bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurde zunächst das Plasmid für die Transfektion vorbereitet. Hierfür wurde es mit sterilem 0,1x TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 230µl pro Zellkulturschale in einer Konzentration von 40µg/ml eingestellt und anschließend für 10 Minuten bei 16000xg zentrifugiert.

Dies erfolgte, um eventuelle Verunreinigungen abzuzentrifugieren. 220µl des Überstands wurden in ein 5ml Röhrchen mit 250µl HBS pipettiert und damit gemischt. Für die Transfektion ist die Bildung eines Komplexes aus Plasmid und Calciumchlorid notwendig. Da diese Komplexbildung begünstigt unter Luftzufuhr stattfindet, wurde mit einer automatischen Pipettierhilfe Luft in das Röhrchen geblasen und gleichzeitig 31µl der Calciumchlorid-Lösung tropfenweise dazu pipettiert.

Das so hergestellte Plasmidgemisch wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Tags zuvor ausgesäten Zellen getropft. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei 40°C wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit warmem PBS gespült und mit 2ml eines auf 37°C erwärmten Gemisches von HEF-Medium mit 15% Glycerin bedeckt. Da der hohe Glycingehalt einen „Membranschock“ verursacht, wird die Zellmembran für den Komplex aus Calciumchlorid und Plasmid durchlässig. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wurde die Medium-Glycerin-Mischung abgenommen, die Schale gründlich mit PBS gespült und mit frischem HEF-Medium gefüllt. Nach weiteren 48 Stunden in Kultur konnte der Erfolg der Transfektion überprüft werden.

#### **4.10 Proteinexpression in HEK293T Zellen**

##### **Material**

**RPMI 1640<sup>5</sup>**

**Fugene HD<sup>®13</sup>**

**HEK293T Zellen**

**CellLytic<sup>™</sup> M Puffer<sup>3</sup>**

**PBS**

##### **Durchführung**

Für die Expression von chMx631S wurden 10 Petrischalen HEK293T Zellen mit dem Konstrukt transient transfiziert (siehe 4.9.1). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5ml PBS je Petrischale gewaschen, und nach Zugabe von 1ml CellLytic<sup>™</sup> M Puffer und für 15 Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Zellsuspension in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei 4°C und 15.000xg abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen, durch einen 0,22µm Filter filtriert und dann zur Aufreinigung des Flag-markierten Proteins verwendet.

## 4.11 Proteinaufreinigung aus HEK293T Zellen

### Material

#### Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel<sup>3</sup>

Lagerung bei -20°C

Im Folgenden aufgeführte Puffer wurden autoklaviert bzw. filtriert und bei 4°C gelagert.

#### Tris gepufferte Salzlösung (TBS) pH 7,4

5,8g NaCl<sup>2</sup>  
12,1g TRIS<sup>2</sup>  
ad 1000ml Aqua dest  
Einstellung des pH-Werts mit HCl bzw. NaOH auf 7,4

#### Elutions Puffer (Glycin-HCl 0,1M, pH 3,5)

0,75g Glycin<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua dest  
Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 3,5

#### Neutralisationspuffer (Tris-HCl 1M, pH 8,0)

12,11g Tris<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua dest  
Einstellen des pH-Wertes mit HCL auf 8,0

#### TBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub>

0,2g Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)<sup>2</sup>  
ad 1Liter TBS, pH 7,4

#### TBS mit 0,02% NaN<sub>3</sub> und 50% Glycerol

0,2g NaN<sub>3</sub><sup>2</sup>  
50ml Glycerin<sup>2</sup>, für Molekularbiologie  
ad 100ml TBS, pH 7,4

#### GTPase-Assay Puffer (20mM HEPES, 100mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT)

4,76g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)<sup>2</sup>  
5,84g NaCl<sup>2</sup>  
0,19g MgCl<sub>2</sub><sup>2</sup>  
0,15g Dithiothreitol (DTT)<sup>2</sup>  
ad 1Liter Aqua dest  
Einstellung des pH-Werts mit HCl bzw. NaOH auf 7,5

## Durchführung

Um das zuvor, durch lysieren der Zellen, freigesetzte Flag markierte chMx631S Protein aufzureinigen, wurde eine Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel Matrix verwendet. Die Aufreinigung erfolgte im Batch-Verfahren streng nach Herstellerangaben. Für das Lysat von 10 Petrischalen (10cm Ø) wurde 1ml Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel Matrix gebraucht. Nach Equilibrierung der Matrix mit TBS wurde das Zelllysate zugegeben und der Ansatz in einem 15ml Falcon Röhrchen bei 4°C für 2 Stunden in einem Überkopffrotator inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Gelmatrix in eine Chromatographiesäule überführt. Nach einem mindestens 30-minütigen Waschen der Säule mit TBS folgte die Elution des gebundenen Proteins. Hierfür wurden 8ml Elutionspuffer auf die Säule aufgebracht, das Eluat in 16x500µl Fraktionen aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung neutralisiert. Zum Re-Equilibrieren der Säule wurde diese nach der Elution mindestens 30 Minuten mit TBS gespült. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurde anschließend TBS-NaN<sub>3</sub> auf die Säule aufgebracht, zur Langzeitlagerung dagegen TBS-NaN<sub>3</sub> mit 50% Glycerol. Die Lagerung der Säule erfolgte bei 4°C. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde je Eluat eine Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und der Erfolg der Aufreinigung überprüft. Bei erfolgreicher Aufreinigung wurden die Eluate gepoolt, in einen gewässerten Dialyseschlauch (*Cut-off* 30 kDa) überführt und über Nacht bei 4°C unter Rühren in 5 Litern GTPase-Assay Puffer umgepuffert. Nach der Dialyse wurde das Eluat in speziellen Zentrifugenröhrchen auf 100µl eingengt. Abschließend wurde nochmals der Proteingehalt über ein SDS-Gel abgeschätzt und die Probe im Western Blot kontrolliert.

## 4.12 Immunpräzipitation von Flag-Mx Konstrukten

### Material

**Zelllysate**

**Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel<sup>2</sup>**

**Tris gepufferte Salzlösung (TBS) pH 7,4**

**6x Probenpuffer reduzierend (Lämmli-puffer)**



## Durchführung

Um das zuvor, durch lysieren der Zellen, freigesetzte Flag markierte chMx631S Protein zu immunpräzipitieren, wurde eine Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel Matrix verwendet. Die Immunpräzipitation erfolgte im Batch-Verfahren streng nach Herstellerangaben. Für das Lysat von einer Kavität einer 24-Loch Platte wurden 20µl Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel Matrix gebraucht. Nach Equilibrierung der Matrix mit TBS wurde das Zellysate zugegeben und der Ansatz in einem 1,5ml Eppendorf Röhrchen bei 4°C für 2 Stunden in einem Überkopffrotator inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Gelmatrix dreimal mit 500µl TBS gewaschen. Die Gelmatrix wurde nun in 20µl 1xLämmli resuspendiert und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Eine Probe des Immunpräzipitates wurde nun im Western Blot analysiert.

## 4.13 GTPase-Assay

### Material

#### Mx-Protein in GTPase-Assay Puffer (siehe 4.11)

Lagerung bei -80°C

#### GTPase-Assay Puffer + 1mM GTP, 13nM GTP( $\alpha$ -P32), 100nM AMP-PNP

0,5µl GTP<sup>14</sup> 100nM  
0,2µl 13nM GTP ( $\alpha$ -P32)<sup>14</sup>  
0,5µl 10nM Adenosin-5'-( $\beta$ , $\gamma$ -imido)triphosphat (AMP-PNP)<sup>14</sup>  
ad 50µl GTPase-Assay Puffer  
Frisch vor der Reaktion ansetzen

#### Stop-Puffer (2mM EDTA, 0,5% SDS)

0,58g EDTA<sup>2</sup>  
5g Natriumdodecylsulfat (SDS)<sup>2</sup>  
ad 1Liter Aqua dest.  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### Laufpuffer (1M Essigsäure, 1M Lithiumchlorid (LiCl))

60,05g Essigsäure<sup>2</sup>  
42,39g LiCl<sup>2</sup>  
ad 1Liter Aqua dest.  
Lagerung bei Raumtemperatur

#### Polyethylenimin-Zellulose Dünnschichtchromatographieplatte<sup>7</sup>

## **Euromed Plus 18x24 (Röntgenfilm)<sup>22</sup>**

### **Durchführung**

0,1mg/ml Mx-Protein wurden in 50µl 37°C warmen GTPase-Assay Puffer + 1mM GTP, 13nM GTP( $\alpha$ -P32), 100nM AMP-PNP verdünnt und für 0, 15, 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Stop-Puffer gestoppt. Die Proben wurden nun auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und für 3 Stunden in Laufpuffer inkubiert. Im Anschluss an die Dünnschichtchromatographie wurde ein Röntgenfilm für 12 Stunden auf der Dünnschichtchromatographieplatte inkubiert. Daraufhin erfolgte die densitometrische Auswertung der Spots.

## **4.14 Transduktion von Hühnerembryonen**

### **4.14.1 Vorbereitung der Zellen**

Transfizierte Zellen wurden über mehrere Passagen hinweg vermehrt, bis für eine Injektion genügend Zellen zur Verfügung standen. Je Embryo werden  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt. Zur Injektion wurden die Zellen in sterile 1 ml Spritzen aufgezogen, wobei hier zum Schutz der Zellen keine Kanüle verwendet wurde.

### **4.14.2 Injektion in embryonierte Eier**

Die infizierten Zellen wurden nun in drei Tage bebrütete Eier injiziert. Hierzu wurde die Kalkschale am stumpfen Pol mit 70% Ethanol desinfiziert und mit einem Schleifwerkzeug angeschliffen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Eihaut nicht verletzt wurde.

Nun wurden die Zellen in der Spritze durch vorsichtiges Schwenken nochmals suspendiert und 100µl der Suspension (entspricht  $1 \times 10^6$  Zellen) in die Eier injiziert. Für die Injektion wurden Kanülen der Größe 0,7 x 30mm verwendet, welche bei der Injektion zu ca. zwei Dritteln in das Ei eingeführt wurden. Anschließend wurde die Kalkschale mit erwärmtem Paraffin versiegelt und der Embryo weiter bebrütet.

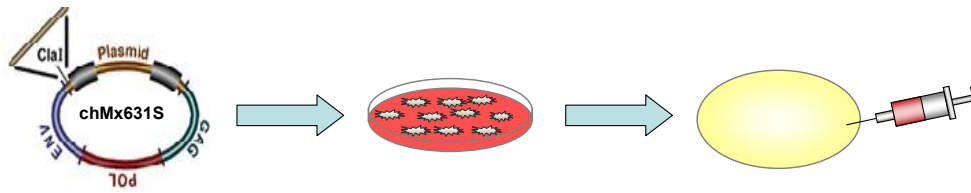


Abb. 6 Erstellung RCAS-transduzierter Embryonen

#### 4.15 Virusinfektion embryonierter Eier

An Bruttag 11 wurden die Eier geschiert und lebende Embryonen für die Infektion ausgewählt. Weiterhin wurde die Luftblase auf dem Ei angezeichnet, um bei der späteren Infektion sicher in die Allantoishöhle zu injizieren. Die Eier wurden nun am stumpfen Pol mit 70% Ethanol desinfiziert und die Kalkschale mit einem Schleifwerkzeug vorsichtig angeschliffen. Waren die Eier, bei der Transduktion mit RCAS(BP)A-Konstrukten, bereits an Tag 3 angeschliffen worden, wurde nach der Desinfektion mit einer Kanüle das Paraffin entfernt und die bereits bestehende Öffnung für die Infektion verwendet. Für die Injektion der 100µl Virussuspension wurden Kanülen der Größe 0,7 x 30mm verwendet, welche bei der Injektion bis in die Allantoishöhle des Eis eingeführt wurden. Anschließend wurde die Kalkschale mit erwärmtem Paraffin versiegelt und der Embryo weiter bebrütet

#### 4.16 In vitro Infektionsexperimente

Um im Rahmen dieser Arbeit die Funktion des chMx-Proteins genau untersuchen zu können, wurden verschiedene Virusstämme für Infektionsexperimente eingesetzt.

Name	Virusfamilie	Serotyp	Isoliert aus	Klassifizierung
Vesicular stomatitis Virus	Rhabdoviridae	Indiana	Säugetiere	BSL 2
WSN/33	Orthomyxoviridae	H1N1	Mensch	BSL 2
LPAI/84	Orthomyxoviridae	H8N4	Truthahn	BSL 2
LPAI 1	Orthomyxoviridae	H6N2	Truthahn	BSL 2
SC35	Orthomyxoviridae	H7N7	Seehund	BSL 3
FPV Bratislava	Orthomyxoviridae	H7N7	Maus	BSL 3
FPV Rostock	Orthomyxoviridae	H7N1	Huhn	BSL 3
R65	Orthomyxoviridae	H5N1	Schwan	BSL 3

Tabelle 15: Verwendete Viren

Die Arbeiten unter Biosicherheitslevel (BSL) 3 Bedingungen fanden im Labor von Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg statt.

#### 4.16.1 Erzeugen eines Virusstocks

##### Material

**LSL-Bruteier**

**Virus**

**MDCK Zellen**

**PBS-0,5% BSA**

0,5g BSA<sup>2</sup>

ad 100ml PBS, mit 0,22µm Filter steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

##### Durchführung

Um die vorliegenden Influenza A Viren zu vermehren und möglichst hohe Virustiter zu erhalten, wurden die Viren in bebrüteten Hühnereiern herangezogen. Hierzu wurden LSL-Eier unter Standardbrutbedingungen bebrütet und an Tag 11 durch Schieren überprüft. War ein lebender Embryo vorhanden, wurde der stumpfe Pol der Eier mit 70% Ethanol desinfiziert und mit 1000 focus forming units (ffu) in 100µl PBS mit 0,5% BSA pro Ei mit einer Kanüle der Größe 0,7 x 30mm in die Allantoishöhle injiziert. Anschließend wurden die Eier mit Paraffin

verschlossen und weiter bebrütet. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Eier am stumpfen Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und ein Schnitt durch die Eihaut vorgenommen, sodass die Allantoisflüssigkeit frei zugänglich war. Nun wurde die Allantoisflüssigkeit vorsichtig abgenommen bei 16.000xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für die Erzeugung der VSV-Virusstocks wurden MDCK Zellen mit einer m.o.i. von 1 infiziert und solange bei 37°C bebrütet bis ein deutlicher zytopathischer Effekt zu sehen war. Nun wurde das Zellkulturmedium abgenommen, bei 16.000xg für 10min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Bestimmung des Virustiters diente die Allantoisflüssigkeit bzw. der Zellkulturüberstand als neuer Virusstock. Alle Virusstocks wurden bei -80°C unter BSL 2- bzw. BSL 3- Bedingungen gelagert.

#### **4.16.2 Virusinfektion von Zellen**

##### **Material**

###### **Virusstock**

Lagerung bei -80°C

###### **PBS-0,5% BSA**

##### **Durchführung**

Um primäre HEF, MDCK Zellen, DF1 Zellen oder Vero Zellen zu infizieren, wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion etwas zu 90% konfluent waren. Für primäre HEF und DF1 Zellen stellte sich hier eine Zellzahl von  $6 \times 10^5$  Zellen pro Delle einer 6-Loch Platte als optimal heraus. Für die Virustitration auf MDCK Zellen wurde eine dicht gewachsene 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche mit MDCK Zellen im Verhältnis 1:4 auf 96-Loch Platten geteilt. Am Tag nach dem Aussäen erfolgte die Infektion mit Allantoisflüssigkeit, Organhomogenaten oder direkt aus dem Virusstock.

Das Virus wurde zuvor in der gewünschten Konzentration in PBS mit 0,5% BSA vorverdünnt. Im Anschluss wurde das Medium von den Zellen abgenommen, diese mit warmem PBS gewaschen und 1ml, pro Delle einer 6-Loch Platte, bzw. 50µl, pro Delle einer 96-Loch Platte, Virusverdünnung hinzugegeben. Die Zellen wurden nun bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Danach wurde die Virussuspension abgenommen und es folgten drei Waschschr itte mit warmem PBS. Für Plaque-Assay und Immunostaining wurden die Zellen nun mit AviCel<sup>®</sup>-Medium-BSA-Lösung überschichtet wohingegen für die Virustitration- und kinetik nur Medium auf die Zellen gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte nun für 12 bis 48 Stunden bei 37°C bzw. 40°C.

### 4.16.3 Plaque-Assay

#### Material

##### Infizierte Zellen (siehe 4.16.2)

##### 1% Diethylaminoethyl-dextran Lösung (DEAE-Dextran Lösung)

1g DEAE-Dextran<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua bidest., durch 0,22µm Filter steril filtrieren

##### 5% Natriumhydrogenkarbonat Lösung (NaHCO<sub>3</sub> Lösung)

5g NaHCO<sub>3</sub><sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua bidest., autoklavieren

##### 1M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES Lösung)

120g HEPES<sup>2</sup>  
ad 500ml Aqua bidest, autoklavieren

##### PBS-10% BSA

10g BSA<sup>2</sup>  
ad 100ml PBS, durch 0,22µm Filter steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

##### Penicillin-Streptomycin-Lösung<sup>5</sup>

##### Fetales Bovinenserum (FBS)<sup>5</sup>

##### 2x DMEM

1,38g DMEM, Powder, High glucose<sup>15</sup>  
ad 50ml Aqua bidest., autoklavieren, Lagerung bei 4°C

##### Plaque-Assay Medium

15ml 2x DMEM  
300µl 1% DEAE-Dextran Lösung  
600µl 1M HEPES Lösung  
600µl FBS  
600µl Penicillin-Streptomycin-Lösung  
600µl 5% NaHCO<sub>3</sub> Lösung  
ad 20ml Aqua bidest. , Lagerung bei 4°C

**AviCel<sup>®</sup> Lösung**

3g AviCel<sup>®16</sup>  
ad 100ml Aqua bidest. , autoklavieren, Lagerung bei RT

**4% Formaldehyd Lösung**

10,81ml 37% Formaldehyd Lösung<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua dest., Lagerung bei RT

**Kristallviolett Lösung**

1g Kristallviolett<sup>2</sup>  
20ml Ethanol<sup>2</sup>  
Ad 100ml Aqua dest.

**Durchführung**

Der Plaque-Assay diente als Nachweisverfahren für infektiöse Viruspartikel. Zunächst wurden primäre HEF bzw. MDCK Zellen mit Virus infiziert (siehe 4.16.2). Kurz vor Ende der einstündigen Inkubationszeit bei der Infektion der Zellen wurde die 3% AviCel<sup>®</sup> Lösung und das Plaque-Assay Medium auf 42°C erwärmt und im Verhältnis 1:1 gemischt. Zu diesem Gemisch wurden noch pro ml, 5µl PBS-10% BSA zugegeben. Nun wurden 2,5ml AviCel<sup>®</sup>-Medium Gemisch vorsichtig am Rand in die Delle laufen lassen, sodass keine Luftblasen entstanden. Die Inkubation erfolgte nun bei 37°C für 24 bis 48 Stunden je nach verwendetem Virus.

Nach der Inkubation wurde das AviCel<sup>®</sup>-Medium Gemisch abgesaugt und die Zellen mit 2ml 4% Formaldehyd Lösung je Delle für 30 Minuten fixiert. Nach Absaugen der Formaldehyd Lösung erfolgte die Zugabe von 2ml 1% Kristallviolett Lösung pro Delle und 20 Minuten Inkubation bei RT. Im Anschluss an das Färben mit Kristallviolett wurde dieses abgegossen und die Platte vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen. Nun konnte die Plaque Zahl pro Delle bestimmt und die *plaque forming units* (pfu) pro ml berechnet werden.

**4.16.4 Immunostaining von infizierten Zellen**

Da WSN/33 (H1N1) auf primären Hühnerembryofibroblasten keinen zytopathischen Effekt (cpe) zeigte, wurde bei diesem Virus im Anschluss an den Plaque-Assay, anstatt der Färbung mit Kristallviolett, ein Immunostaining zur Anfärbung des Virus durchgeführt.

**Material**

**Infizierte Zellen (siehe 4.16.2)**

**1% Diethylaminoethyl-dextran Lösung (DEAE-Dextran Lösung)**

**5% Natriumhydrogencarbonat Lösung (NaHCO<sub>3</sub> Lösung)**

**1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES Lösung)**

**PBS-10% BSA**

**Penicillin-Streptomycin-Lösung<sup>5</sup>**

**Fetales Bovinesserum (FBS)<sup>5</sup>**

**2x DMEM**

**Plaque-Assay Medium**

**AviCel<sup>®</sup> Lösung**

**4% Paraformaldehyd Lösung**

20g Paraformaldehyd<sup>2</sup>

50ml 10 x PBS

ad 500ml Aqua dest., 1 Stunde bei 60°C unter Rühren erhitzen, wenn die Lösung nach 1 Stunde nicht klar geworden ist dann 1 bis 2 Tropfen 1M NaOH Lösung zugeben

Lagerung bei -20°C

**Pemeabilisierungslösung**

0,5ml 10% Triton<sup>®</sup> X-100<sup>3</sup> Lösung

ad 10ml PBS

**PBS-1% BSA**

1g BSA<sup>2</sup>

ad 100ml PBS

**Kaninchen-anti-PR8 (polyklonales Serum)**

**Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) POD<sup>18</sup>**

**Vector<sup>®</sup> ImmPACT<sup>™</sup> NovaRED<sup>™</sup>, Peroxidase Substrate<sup>17</sup>**

**Durchführung**

Zunächst wurde ein normaler Plaque-Assay (siehe 4.16.3) bis zum Entfernen des Avicel-Medium-Gemisches durchgeführt. Im Anschluß wurde anstelle der 4% Formaldehyd Lösung 4% Paraformaldehyd Lösung bei 4°C verwendet.



Nach 30 Minuten Inkubation wurde das 4% Paraformaldehyd abgesaugt, die fixierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 0,5ml Permeabilisierungslösung je Delle zugegeben und für 10 Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS mit 1% BSA wurden 0,5ml primäre Antikörper-Lösung zugegeben (Kaninchen-anti-PR8 1:10.000 in PBS-1% BSA) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend erfolgten erneut drei fünfminütige Waschschriffe mit PBS-1% BSA und dann die Inkubation mit 0,5ml des sekundären Antikörpers (Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) POD 1:500) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper dreimal 5 Minuten mit PBS heruntergewaschen und das nach Herstellerangaben frisch angesetzte Vector® ImmPACT™ NovaRED™ Peroxidase-Substrat zugegeben. Nach ungefähr 15 Minuten Inkubation auf dem Plattenschüttler wurde die Reaktion durch entfernen des Peroxidasesubstrates gestoppt und die, durch charakteristische Rotfärbung gekennzeichneten, *focus forming units* (ffu) pro Delle konnten gezählt werden.

#### 4.16.5 Viruskinetik auf Zellen

Um das Viruswachstum von WSN/33 (H1N1) *in vitro* beurteilen zu können, wurde für WSN/33 (H1N1) eine Viruskinetik auf primären Linie 0 HEF erstellt.

#### Durchführung

Hierzu wurden primäre HEF in 6-Loch Platten ausgesät und am folgenden Tag mit WSN/33 (H1N1) mit einer *multiplicity of infection* (m.o.i) von 0,001 infiziert (siehe 4.16.2), d.h. pro Zelle werden 0,001 infektiöse Viruspartikel zugegeben. Nach der Infektion mit WSN/33 (H1N1) wurde nach 4, 8, 12, 24, 36 und 48 Stunden 50µl Überstand von den infizierten Zellen abgenommen und auf MDCK Zellen auf den Gehalt an Viruspartikeln titriert (siehe 4.16.6).

#### 4.16.6 Titration von Virus auf MDCK Zellen

Um die Virustiter in Zellkulturüberständen, Allantoisflüssigkeit oder Organhomogenaten bestimmen zu können, wurden die Proben auf MDCK Zellen titriert und das Virus per Immunfluoreszenz-Färbung sichtbar gemacht.

**Material****MDCK Zellen****Proben (Zellkulturüberstand, Organhomogenate, Allantoisflüssigkeit)****4% Paraformaldehyd Lösung**

Lagerung bei -20°C

**0,5% Triton<sup>®</sup> X-100<sup>3</sup> Lösung****PBS-1% BSA**

1g BSA<sup>2</sup>  
ad 100ml PBS

**PBS-0,5% BSA**

0,5g BSA<sup>2</sup>  
ad 100ml PBS

**Kaninchen-anti-PR8****Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa<sup>®</sup> Fluor 488<sup>15</sup>****Durchführung**

Die MDCK Zellen wurden in 96-Loch Platten so ausgesät, dass sie am Folgetag zum Zeitpunkt der Infektion zu 90% konfluent waren. Die Proben wurden 1:10 in PBS-0,5% BSA vorverdünnt und dann in PBS-0,5% BSA  $\log_{10}$  titriert. Diese Virusverdünnungen wurden für die Infektion von MDCK Zellen verwendet (siehe 4.16.2). 12 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung mittels 0,5% Triton<sup>®</sup> X-100 Lösung für 10 Minuten und im Anschluss die Inkubation mit dem primären Antikörper (Kaninchen-anti-PR8 1:10.000 in PBS-1% BSA) für 1 Stunde bei RT. Nach drei Waschschritten mit PBS-1% BSA wurden die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert (Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa<sup>®</sup> Fluor 488 1:500 in PBS-1% BSA).

Danach wurden die Proben noch dreimal mit PBS gewaschen und mit 100µl PBS überschichtet um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nun konnten die infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden und die Virustiter für die einzelnen Proben nach folgender Formel berechnet werden:

gezählte Zellen x **Verdünnungsstufe** x 20 = ffu/ml

#### 4.17 Interferonnachweis im antiviralen BioAssay

Dieser Test diente zur Bestimmung der induzierten antiviralen Aktivität in primären HEF durch Typ I Interferon bzw. durch Überexpression verschiedener Mx-Gene.

##### Material

###### Neutralrot<sup>3</sup> Lösung

Lagerung bei 4°C

###### Vesicular stomatitis virus (VSV)

Virusstock bei -80°C gelagert

###### Lysepuffer (3M Guanidin HCL)

17,72g Guanidinhydrochlorid<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua dest.

##### Durchführung

$5 \times 10^4$  primäre HEF wurden pro Kavität einer 96-Loch-Platte ausgesät und solange bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis ein dichter Zellrasen gewachsen war. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Zellen für 12 Stunden mit Interferonlösungen inkubiert. Nach erneutem Entfernen der Überstände wurden die Zellen mit VSV infiziert. Als Negativkontrolle dienten vier Kavitäten, in denen die Zellen in Medium ohne VSV kultiviert wurden und als Positivkontrolle vier weitere Kavitäten, die ohne vorherige Interferonstimulation mit VSV infiziert wurden. Sobald die Positivkontrolle durch den VSV induzierten zytopathischen Effekt (nach ca. 24 Stunden) vollständig lysiert war, wurden die lebenden Zellen nach der Methode von Dijkmans et al. mit Neutralrot quantifiziert [309]. Dazu wurden je 200µl einer Neutralrotlösung (1:33 verdünnt in HEF Medium) zu jeder Kavität gegeben, nach zweistündiger Inkubation bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Platte fünfmal mit PBS gewaschen und getrocknet.

Um die Extinktion, des von den noch lebenden Zellen aufgenommenen Neutralrots zu messen, wurden die Platten mit einer 3M Guanidin-HCl-Lösung für fünf Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die

Extinktion bei 540nm im Plattenphotometer bestimmt.

#### 4.18 Interferon Nachweis im CEC32#511 Reporterassay

Zur Bestimmung von biologisch aktivem Hühner Typ I Interferon wurde ein Firefly-Luciferase Reporterassay basierend auf einer, mit einem Reporterkonstrukt stabil transfizierten CEC32#511 Zelllinie durchgeführt [310]. Das Reporterkonstrukt enthielt die Sequenz der Firefly-Luciferase, welcher der durch Typ I Interferon induzierbare Mx-Promoter vorgeschaltet wurde, sodass bei Kontakt der Zellen mit Interferon eine starke Expression der Firefly-Luciferase ausgelöst wurde.

#### Material

##### Proben

##### CEC32#511 Zellen

##### Rekombinantes Hühner Interferon alpha (rek.chIFN $\alpha$ )

Eingestellt auf 1000Units/ml

Lagerung bei -20°C

##### Luciferase-Assay Substrat<sup>9</sup>

Lagerung bei -80°C

##### Cell Culture Lysis Reagent 5x<sup>9</sup>

Vor Gebrauch auf RT erwärmen und mit Aqua bidest. auf 1 x verdünnen

Lagerung bei -20°C

#### Durchführung

Am Vortag wurden die CEC32#511 Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kavität einer 48-Loch Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die zu testenden Proben in CEC32#511 Medium vorverdünnt. Die Verdünnungsstufen wurden je nach zu erwartender Interferonmenge gewählt. Weiterhin wurde ein Interferon-Standard mit den Konzentrationen von 3, 1,5, 0,75, 0,375 und 0,1875Units/ml rek.chIFN $\alpha$  in einem Volumen von 125 $\mu$ l CEC32#511 Medium aufgetragen. Als Negativkontrolle diente CEC32#511 Medium ohne Zusatz von Interferon.

Nach Auftragen der Proben wurden die Zellen für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Daran schloss sich ein Waschschrift mit warmen PBS an bevor 50µl 1x Lysepuffer pro Delle den Zellen zugegeben und diese bei RT auf einem Plattenschüttler für 10 Minuten lysiert wurden. Die lysierten Zellen wurden in eine 96-Loch Platte überführt und bei 300xg für 10 Minuten abzentrifugiert um den Zelldetritus zu entfernen. Nun wurden 10µl des Überstandes in eine 96-Loch Messplatte des GloMax<sup>®</sup> Luminometers überführt und die Proben dort unter automatischer Zugabe von 25µl Luciferase-Assay Substrates gemessen. Der Interferongehalt der Proben konnte nun anhand der Messwerte des Standards berechnet werden.

#### **4.19 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen**

Um die Expression von Mx-Protein bzw. die Infektion mit Influenza A Viren optisch darzustellen wurden Zellen immunfluoreszenzgefärbt.

##### **Material**

**PBS-1% BSA**

**4% Paraformaldehyd Lösung**

**0,5% Triton<sup>®</sup> X-100<sup>3</sup> Lösung**

**Maus-anti-huMxA IgG2a**

**Kaninchen-anti-PR8 (polyklonales Serum)**

**Ziege-anti-Maus IgG (H+L)Alexa Fluor<sup>®</sup> 488<sup>15</sup>**

**Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)Alexa Fluor<sup>®</sup> 488<sup>15</sup>**

**4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Lösung 50µg/ml<sup>2</sup>**

1:500 in der sekundär Antikörper Lösung verdünnen

**Superfrost<sup>®</sup> Plus Objektträger<sup>19</sup>**

**Runde Deckglässchen (Durchmesser 13 mm)<sup>19</sup>**

Autoklaviert

**Vectashield<sup>®</sup> Hard-Set<sup>™</sup> Mounting Medium<sup>17</sup>**

## Durchführung

Für die Färbung von Zellen wurden autoklavierte, runde Deckgläser auf den Boden einer Delle einer 24-Loch Platte gelegt. Die zu färbenden Zellen wurden in einer Dichte von  $2,4 \times 10^5$  Zellen pro Deckglas ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd Lösung auf dem Deckglas fixiert. Nach der 10 minütigen Permeabilisierung mit 200µl 0,5% Triton<sup>®</sup> X-100 Lösung erfolgten drei Waschschrte mit PBS-1% BSA. Als primärer Antikörper wurde Maus-anti-huMxA (1:500) bzw. Kaninchen-anti PR8 (1:10.000) verdünnt in PBS-1% BSA verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei RT schlossen sich drei Waschschrte mit PBS-1% BSA an. Nun folgte die Inkubation mit dem Sekundäantikörper, Ziege-anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 mit DAPI oder Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 mit DAPI (beide 1:500 in PBS-1% BSA) für 1 Stunde bei RT. Nach weiteren drei Waschgängen mit PBS wurden 15µl Eindeckelmedium auf die Objektträger vorgelegt und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf die Objektträger aufgelegt. Zum Aushärten des Eindeckelmediums wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

## 4.20 Histologie

### Material

#### Proben

Macrosetten<sup>26</sup>

Einbetttschälchen<sup>27</sup>

Superfrost<sup>®</sup> Plus Objektträger<sup>19</sup>

24x40mm Deckgläser<sup>27</sup>

PBS

PBS-1%BSA

Pferdeserum<sup>3</sup>

**Neutral gepufferte Formalin Lösung(NPF)**

100ml 37%tiges Formalin<sup>2</sup>  
4g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O)<sup>2</sup>  
6,5g Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)<sup>2</sup>  
ad 1Liter Aqua dest.  
Lagerung bei RT

**Ethanol-Lösung (40%, 50%, 60%, 70%, 96%)**

Entsprechend 99% Ethanol<sup>2</sup>  
ad 1Liter Aqua dest.  
Lagerung bei RT

**99%ige Ethanol-Lösung<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT

**Isopropanol<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT

**Xylol<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT

**Paraffin 1, 3, 6 und 9<sup>20</sup>**

Lagerung bei 60°

**Blockierlösung (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 40% Methanol)**

1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%<sup>2</sup>  
40ml Methanol reinst.<sup>20</sup>  
ad 100ml Aqua dest.

**Maus-anti-p19-IgG1 Antikörper (AMV-3C2)<sup>28</sup>****Vectastain<sup>®</sup> ABC:HRP Mouse IgG Kit<sup>17</sup>****Vector<sup>®</sup> DAB Kit<sup>17</sup>****Mayer's Hematoxilin Solution (Hämalaun)<sup>3</sup>****Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium<sup>3</sup>****Durchführung**

Die für die Fixierung und Paraffineinbettung vorgesehenen Embryonen wurden direkt nach der Entnahme in NPF-Lösung für 24 Stunden fixiert und im Anschluss die NPF-Lösung für 2x 12 Stunden mit PBS ausgewaschen. Es folgte die Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (40%ig, 50%ig, 60%ig, 70%ig, 96%ig, Isopropanol, Xylol).

Danach schloss sich die „Paraffinierung“ bei 60°C an (Paraffin 1, Paraffin 3, Paraffin 6, Paraffin 9 je 24 Stunden). Im Anschluss an die Paraffineinbettung wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert.

Nach der Entparaffinierung wurde die endogene Peroxidase mit Blockierlösung für 30 Minuten geblockt. Die Schnitte wurden nun für 1 Stunde mit 2,5% Pferdeserum in PBS-1%BSA inkubiert. Es schloss sich die Detektion des p19 Proteins mithilfe eines Maus-anti-p19-IgG1 Antikörpers (AMV-3C2)<sup>28</sup> an, welcher mittels Vectastain ABC:HRP Mouse IgG Kit<sup>14</sup> gefolgt von einem Vector DAB Kit<sup>14</sup> nach Herstellerangaben detektiert wurde.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für 35 Sekunden mittels Hämalaun und anschließendem Bläuen unter fließendem Wasser.

Zur dauerhaften Haltbarmachung der Schnitte, wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Eukitt<sup>®</sup> Eindeckelmedium und Deckgläsern eingedeckelt.

#### **4.21 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

##### **Material**

##### **4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8**

91g Tris<sup>2</sup>  
2g SDS<sup>2</sup>  
ad 500ml Aqua dest.,  
pH mit HCl auf 8,8 einstellen, Lagerung bei 4°C

##### **4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8**

6,05g Tris<sup>2</sup>  
0,4g SDS<sup>2</sup>  
ad 100ml Aqua dest.  
pH mit HCl auf 6,8 einstellen, Lagerung bei 4°C

##### **APS 10%**

0,5g Ammoniumpersulfat (APS)<sup>2</sup>  
ad 5ml Aqua bidest.,  
Lagerung bei -20°C in Aliquots von 110µl



**Trenngel 12%**

3,5ml Aqua bidest.  
2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
4ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>2</sup>  
50µl APS 10%  
20µl N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)<sup>2</sup>  
in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

**Sammelgel**

6,17ml Aqua bidest.  
2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8  
1,33ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung<sup>2</sup>  
50µl APS 10%  
20µl TEMED<sup>2</sup>  
in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

**5x Elektrophoresepuffer**

15,1g Tris<sup>2</sup>  
72,0g Glycin<sup>2</sup>  
5,0g SDS<sup>2</sup>  
ad 1000 ml Aqua dest.  
zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen; Lagerung bei 4°C

**6x Probenpuffer reduzierend (Lämmli-puffer)**

7ml 4x TrisCl/SDS-Puffer pH 6,8  
3ml Glycerin<sup>2</sup>  
1g SDS<sup>2</sup>  
1mg Bromphenolblau<sup>2</sup>  
0,93mg DTT<sup>2</sup>  
ad 10ml Aqua bidest.  
Lagerung bei -20°C in 1ml Aliquots

**1M DTT Lösung<sup>1</sup>**

Lagerung bei -20°C

**Prestained Protein Molekulargewichtsmarker, ~10-180 kDa<sup>8</sup>****Protein Molekulargewichtsmarker, ~10-200 kDa<sup>8</sup>****Durchführung**

In eine BioRad Mini Protean III Gießkammer wurde zunächst das Trenngel eingefüllt und mit ca. 1ml Aqua bidest. überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 Minuten wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt, das Trenngel mit Sammelgel überschichtet und der entsprechende Probenaschenkamm sofort eingesetzt.

Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämme entfernt und die Geltaschen mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Proben wurden so mit Probenpuffer versetzt, dass dieser in einer Endkonzentration von 1x Probenpuffer vorlag und anschließend für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Bei den Arbeiten unter reduzierenden Bedingungen wurden nach dem Erhitzen zu 20µl Probe nochmals 0,5µl einer 1M DTT Lösung zugesetzt. Anschließend wurden 10µl bis 20µl der Probe bzw. 8µl des Markers in die Geltaschen eingebracht und das Gel in die Kammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 20mA gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke bis zum Ende auf 50mA erhöht.

## 4.22 Coomassie Färbung

### Material

#### Coomassie-Färbelösung

450ml Ethanol<sup>2</sup>  
100ml Essigsäure 96%<sup>2</sup>  
2,5g Coomassie-Brilliant-Blau R-250<sup>2</sup>  
ad 1000ml Aqua bidest.

#### Entfärbelösung

250ml Ethanol<sup>2</sup>  
100ml Essigsäure 96%<sup>2</sup>  
ad 1000ml Aqua bidest.  
die Entfärbelösung wurde nach Gebrauch zur Wiederverwendung mit Aktivkohle entfärbt;

### Durchführung

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophoresekammer wurde es für 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht. Diese wurde nach 10 Minuten nochmals gewechselt und das Gel über Nacht entfärbt

### 4.23 Western Blot

#### Material

##### Towbin Puffer 10% Methanol

3,03g Tris<sup>2</sup>  
 14,4g Glycin<sup>2</sup>  
 ad 900 ml Aqua dest  
 100ml Methanol reinst<sup>20</sup>  
 Lagerung bei 4°C

##### Magermilchlösung 4%

4g Magermilchpulver<sup>2</sup>  
 ad 100ml PBS  
 kurz vor Gebrauch ansetzen

##### PBS-T (0,05% Tween20)

0,5ml Tween20<sup>®2</sup>  
 ad 1000ml PBS

##### Streptavidin-POD<sup>22</sup>

Lagerung bei 4°C

##### Nitrocellulosemembran BA83 Porengröße 0,2 µm<sup>20</sup>

##### Filterpapier Nr. 3<sup>21</sup>

##### Amersham ECL<sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagenz<sup>23</sup>

##### Euromed Plus 18x24 (Röntgenfilm)<sup>22</sup>

Ursprungsspezies	Antigen	Subtyp	Konjugat	Verdünnung
Maus	huMxA	IgG2a		1:500
Maus	Huhn-β-Actin <sup>2</sup>	IgG1		1:500
Ziege	Maus-Ig <sup>22</sup>	polyklonal	Biotin	1:500
Maus	M2-Flag <sup>2</sup>	IgG1	POD	1:500
Ziege	Maus-IgG <sup>15</sup>	polyklonal	POD	1:15.000

Tabelle 16: Antikörper Western Blot

### Durchführung

Zum Blotten der Proteine im Tankblot-Elektroblotter wurden in die Blotkassette von unten nach oben geschichtet:

- 1 Faserpad getränkt in kaltem Towbin Puffer,
- 1 Lage Filterpapier,
- das SDS-Gel,
- die mit kaltem Towbin Puffer getränkte Nitrocellulosemembran,
- 1 Lage Filterpapier und
- 1 Faserpad getränkt in kaltem Towbin Puffer.

Alle Komponenten wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und ohne Luftblasen aufeinandergelegt. Die Blotkassette wurde nun in den Tankblotter zwischen die Elektroden eingesetzt. Weiterhin wurden ein auf -20°C vorgekühltes Gefrieraggregat und ein Magnetrührfisch in den, mit kaltem Towbin Puffer befüllten Tankblotter eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte unter Rühren bei einer Spannung von 100 Volt für 30 Minuten. Nach dem Blotten wurde die Membran für 60 Minuten bei RT mit 4% Magermilchlösung blockiert. Dieser Schritt erfolgte wie alle weiteren auf einem Plattenschüttler. Nach einem 15-minütigen Waschschrift mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran 3x10 min mit PBS-T gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen (6x10 Minuten) mit PBS-T, konnte die Membran nun mit, nach Herstellerangaben angesetzter Amersham ECL<sup>TM</sup> Lösung für 2 Minuten inkubiert werden. Im Anschluss wurde die Membran zur Belichtung der Röntgenfilme in eine Röntgenkassette geklebt. Diese Filme wurden dann in einem handelsüblichen Entwickler entwickelt.

Wurde als Sekundärantikörper Biotin-anti-Maus-Ig verwendet, erfolgten vor dem letzten Waschschrift (6x10 Minuten PBS-T) noch drei zusätzliche Waschschrift von je 10 Minuten mit PBS-T und eine Inkubation mit Streptavidin-POD (1:10.000) für eine Stunde bei RT.

#### 4.24 RNA interference

Um die genaue Bedeutung von chMx im antiviralen Status der Zelle nach Interferonstimulation untersuchen zu können wurde ein, auf *short interfering* RNA (siRNA) passierender Knockdown Ansatz gewählt.

##### 4.24.1 Short interfering RNA (siRNA) Design

Da es sich bei chMx um ein Gen handelt, für welches keine validierte siRNA zur Verfügung steht, wurden auf Basis verschiedener Kriterien virtuell siRNA Kandidaten erstellt und die vielversprechendsten Kandidaten durch die Firma MWG, Ebersberg synthetisiert

Kriterium Nr	Kriterium	Punkte
I	30%-52% G/C Gehalt	1
II	mindestens 3 A/U Basen an Position 15-19 des sense strand	1 Punkt für jedes A/U (5max)
III	keine internen WDH (Tm = 20°C)	1
IV	A an Position 19 sense strand	1
V	A an Position 3 sense strand	1
VI	U an Position 10 sense strand	1
VII	Kein G/C an Position 19 sense strand	Wenn doch G/C dann 1 Punkt Abzug
VIII	Kein G an Position 13 sense strand	Wenn doch G dann 1 Punkt Abzug

Tabelle 17: Kriterien für die Auswahl von siRNA Kandidaten

Es wurde nur siRNA verwendet die 6 Punkte und mehr erreichte. Das wichtigste Kriterium für die Auswahl der siRNA Kandidaten war Kriterium VI, da der aktivierte RNA *induced silencing complex* (RISC) die Ziel-mRNA zwischen Nukleotid 10 und 11 relativ zum 5' Ende des komplementären Zielstranges bevorzugt schneidet, wenn hier ein Uracil liegt.

Nummer	Zielgen	Sequenz (5' → 3')
si0901	chMx	cuauaugguugaagagaaa
si0902	chMx	agauccaaccuugcauuga
si0903	eGFP	ggcuacguccaggagcgacc

Tabelle 18: Synthetisierte siRNA

#### 4.24.2 Transfektion von siRNA

Für die Transfektion der siRNA in primäre Linie 0 HEF wurde zur Steigerung der Transfektionseffizienz eine reverse Transfektion gewählt.

#### Material

##### Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektions Reagenz<sup>15</sup>

Lagerung bei 4°C

##### Opti-MEM® Reduced-Serum Medium<sup>15</sup>

Lagerung bei 4°C

##### siRNA Medium

460ml Basal ISCOVE<sup>5</sup>

5ml FBS<sup>5</sup>

5ml Hühnerserum<sup>5</sup>

Lagerung bei 4°C

##### siRNA (100pmol)

gelöst in 1x siRNA Puffer

aliquotiert, Lagerung bei -20°C

#### Durchführung

Für die reverse Transfektion erfolgt das Formen des siRNA Transfektionskomplexes bereits im Zellkulturgefäß und die zu transfizierenden Zellen werden nach Bildung der Komplexe direkt in diese hinein ausgesät. Für primäre Linie 0 HEF wurde eine siRNA Endkonzentration von 50nM pro Delle einer 6-Loch Platte und 5µl Transfektionsreagenz gewählt. siRNA und Transfektionsreagenz wurden in der Delle der 6-Loch Platte vorsichtig in Opti-MEM® gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die HEF abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und in antibiotikafreiem siRNA Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt.

Nach der Inkubation der siRNA mit dem Transfektionsreagenz wurde 1ml der Zellsuspension direkt in die siRNA-RNAiMAX<sup>®</sup> Mischung hinein ausgesät. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert und nach dieser Inkubation für weitere 4 bzw. 8 Stunden mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. Daraufhin erfolgten die Infektion der Zellen bzw. die Analyse des siRNA vermittelten Effektes.

#### **4.25 Homogenisieren von Proben**

Für das Homogenisieren von Zellkultur- bzw. Organproben wurde ein Schüttelhomogenisator verwendet, um die standardisierte Behandlung aller Proben zu gewährleisten.

##### **4.25.1 Homogenisation von Proben für die RNA Isolation**

###### **Material**

**Trifast<sup>®</sup> Reagenz**<sup>24</sup>

Lagerung bei 4°C

**Keramikkügelchen 1,4 mm Durchmesser**<sup>24</sup>

**Röhrchen für Schüttelhomogenisator**<sup>24</sup>

0,6g     Keramikkügelchen 1,4mm pro Röhrchen

**Flüssiger Stickstoff**

**PBS**

###### **Durchführung**

Organproben wurden zur RNA Isolation zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in ein Röhrchen für den Schüttelhomogenisator überführt. Pro 100mg Gewebe wurde 1ml Trifast<sup>®</sup> Reagenz zugegeben. Anschließend wurden die Proben im Schüttelhomogenisator ein- bis viermal für je 2x10 Sekunden bei 5000rpm homogenisiert. Zwischen den einzelnen Läufen wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gestellt, um ein übermäßiges Erhitzen der Proben zu verhindern. Wenn die Probe vollständig homogenisiert war, konnte mit der RNA Isolation fortgefahren werden (siehe 4.5).

#### 4.25.2 Herstellung von Organhomogenaten für den Western Blot

##### Material

###### Radio immuno precipitation assay Puffer (RIPA Puffer)

0,31g TRIS<sup>2</sup> pH 8,0  
0,44g NaCl<sup>2</sup>  
0,5ml Nonidet P-40<sup>2</sup>  
0,25g Natrium Deoxycholate<sup>2</sup>  
0,05g Natrium Dodecylsulfate<sup>2</sup>  
1 Tablette Complete ohne EDTA<sup>® 13</sup>  
Immer frisch ansetzen, auf 4°C kühlen

###### Keramikkügelchen 1,4 mm Durchmesser<sup>24</sup>

###### Röhrchen für Schüttelhomogenisator<sup>24</sup>

0,6g Keramikkügelchen 1,4mm pro Röhrchen

###### Flüssiger Stickstoff

###### PBS

##### Durchführung

Um Organproben möglichst gleichmäßig zu homogenisieren, wurden die Organproben bis zu einem Gewicht von 100mg, nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff, in Röhrchen für den Schüttelhomogenisator überführt. Je Röhrchen wurden 500µl RIPA Puffer zugegeben und die Proben ein- bis sechsmal für 2x10 Sekunden bei 6000rpm homogenisiert. Zwischen den einzelnen Läufen wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis heruntergekühlt um ein übermäßiges Erhitzen zu verhindern. Wenn die Proben vollständig homogenisiert waren, wurden sie für 10 Minuten bei 7500xg und 4°C abzentrifugiert und die Überstände in ein neues Röhrchen überführt. Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -80°C.

#### 4.26 Statistische Auswertung

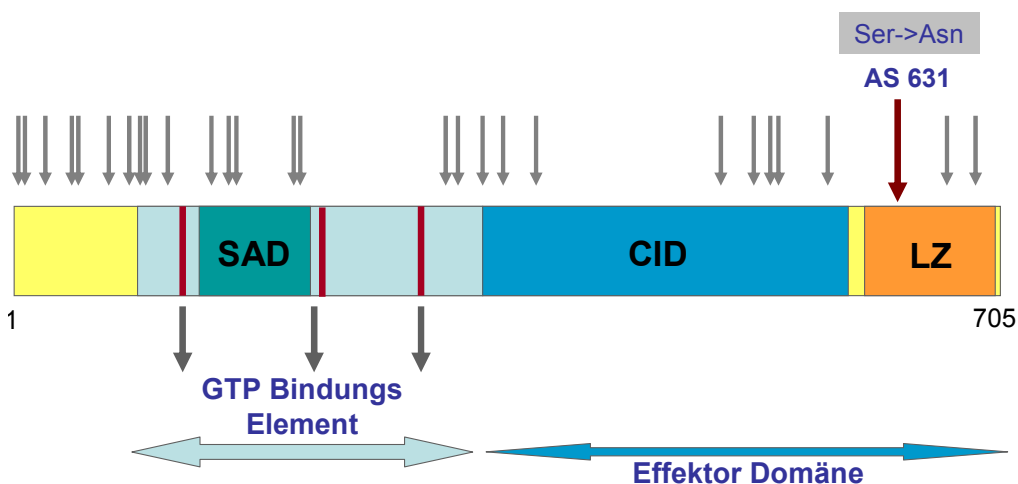
Die statistische Auswertung erfolgte unter der Verwendung der Software Microsoft<sup>®</sup> Office Excel 2003 für Windows. Die Daten wurden mit dem Student t-Test ausgewertet. Wenn kein p-Wert angegeben wurde sind die Daten nicht signifikant verschieden.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Sequenzanalyse des Hühner Mx-Gens

Da es bereits in der Literatur Anhaltspunkte gab, dass es sich bei chMx um ein hoch polymorphes Gen handelt, wurden im Rahmen dieser Arbeit, 18 in einer online Datenbank verfügbare Mx-Sequenzen, von verschiedenen Hühnerrassen verglichen, um Hinweise auf Polymorphismen auf Aminosäureebene zu erhalten [285, 311].



**Abb. 7 Sequenzvergleich von chMx auf Aminosäurenbasis**

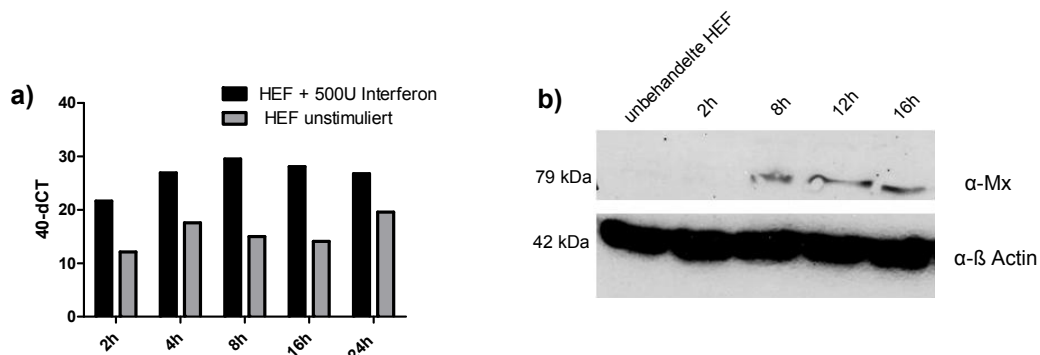
chMx ist 705 Aminosäuren lang, besteht n-terminal aus einer GTPase-Domäne mit 3 GTP-Bindungselementen und einer Selbstzusammenlagerungsdomäne (SAD), gefolgt von einer zentralen Interaktionsdomäne (CID) und c-terminal einem Leuzin-Zipper (LZ). Beim Vergleich der Aminosäuresequenz des chMx-Proteins anhand 18 verschiedener Datenbankeinträge (DQ788613, DQ788614, DQ788615, AB088534, AB088533, AY695797, DQ788616, AB088536, AB088535, NM204609, AB244818, EU348752, ABQ43225, ABQ43222, ABQ43221, ABC41922, ABQ43225, ABQ43219) wurden 28 Polymorphismen gefunden (graue Pfeile). In Rot ist der Polymorphismus an Aminosäureposition 631 von Serin zu Asparagin markiert.

Wie Abb. 7 zeigt, fanden sich allein in diesen 18 Sequenzen 28 Polymorphismen auf Aminosäurenbasis. Diese Polymorphismen finden sich vor allem n-terminal, jedoch nicht innerhalb der hoch konservierten GTP-Bindungsmotive. Diese Daten bestätigen, dass es sich bei chMx um ein hochpolymorphes Protein handelt. Dem Polymorphismus an Aminosäureposition 631 von Serin zu Asparagin fiel im Rahmen dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk zu, da sich in der Literatur Hinweise fanden, dass ein Austausch zu Asparagin an Position 631 eine antivirale Aktivität des chMx gegenüber Influenza A Virusinfektionen bewirken kann [287, 296]. Im Folgenden wurde die Bedeutung dieses Polymorphismus sowohl *in vitro* als auch *in ovo* im Hühnersystem untersucht.

## 5.2 Die Kinetik der chMx-Expression

### 5.2.1 *In vitro* Stimulation von HEF mit Typ I Interferon

Beim Säuger wurde gezeigt, dass die Expression von Mx durch Typ I Interferon induziert wird. Einer der ersten Schritte dieser Arbeit war es die Mx-Induktion beim Huhn zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden primäre HEF mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und anschließend die Mx-Expression auf mRNA- und Proteinebene analysiert.



#### Abb. 8 chIFN $\alpha$ induzierte Mx-Expression *in vitro*

Primäre Linie 0 HEF wurden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert.

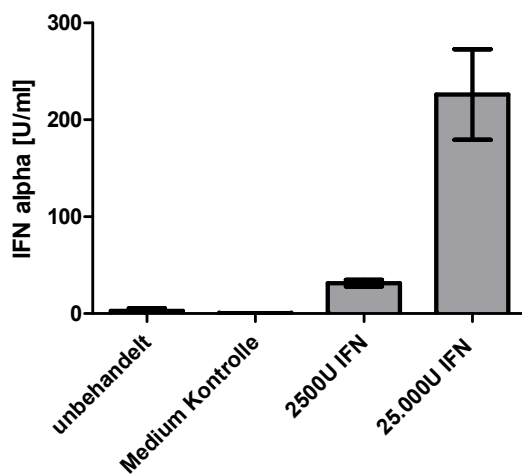
a) Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf chMx-Expression untersucht. ( $\Delta$ CT=CT Mx – *Housekeeping Gen* (18S rRNA))

b) 2, 8, 12 und 16 Stunden nach rek.chIFN $\alpha$  Stimulation wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 500 $\mu$ l 1x Lämmli-puffer lysiert und 20 $\mu$ l dieses Lysats im Western Blot aufgetragen. Mx-Protein wurde mithilfe eines monoklonalen, kreuzreagierenden Maus-anti-huMxA Antikörpers gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-POD Antikörper detektiert.  $\beta$ -Aktin Protein wurde mit einem monoklonalen Maus-anti- $\beta$ -Aktin Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-POD Antikörper detektiert.

Dabei zeigte sich, dass zwei Stunden nach Interferonstimulation ein Unterschied von 9,52 CT Werten der chMx-mRNA gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu erkennen ist (siehe Abb. 8a). Die Expression von chMx auf mRNA-Ebene nimmt noch bis 8 Stunden nach Interferongabe zu und erreicht zu diesem Zeitpunkt ihr Plateau. An dieser Stelle ist die chMx-Expression etwa 30.000 fach (=14,49 CTs) gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht. Zur Untersuchung der chMx-Proteinexpression wurde ein kreuzreaktiver monoklonaler Maus-anti-huMxA Antikörper verwendet. Wie in Abb. 8b zu sehen ist, ließ sich chMx 8 Stunden nach Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  auf Proteinebene nachweisen, während in der Kontrolle kein Protein detektierbar war. Damit lies sich eindeutig zeigen, dass auch im Huhn Mx zur Gruppe der Typ I Interferon stimulierten Gene gehört.

### 5.2.2 Stimulation von Hühnerembryonen mit Typ I Interferon

Wie im vorherigen Abschnitt bereits gezeigt werden konnte, ist die Mx-Expression in primären HEF, genau wie beim Säuger, interferonabhängig. Da jedoch nicht primär die Funktion von Mx *in vitro*, sondern vor allem *in vivo* charakterisiert werden sollte, wurde der Effekt von Mx auch *in ovo* überprüft. Hierfür wurde LSL-Embryonen an Brutttag 11 2500U bzw. 25.000U rek.chIFN $\alpha$  in die Allantoisflüssigkeit appliziert. Um den Erfolg der Injektion zu prüfen, wurde 12 Stunden p.i. die Interferonkonzentration in der Allantoisflüssigkeit im Interferon Reporterassay bestimmt.

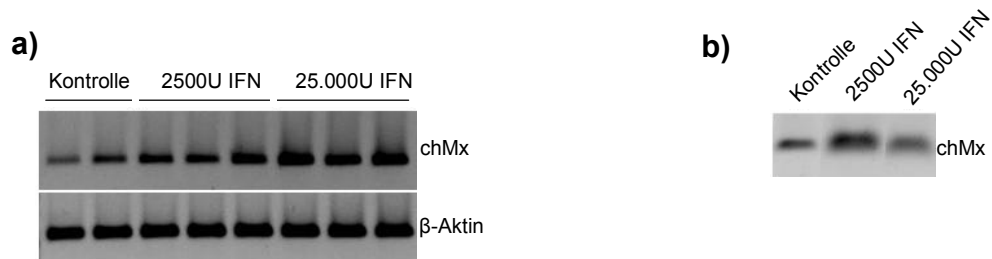


**Abb. 9 Interferon Reporterassay aus Allantoisflüssigkeit**

An Brutttag 11 wurden 2500 bzw. 25.000U rek.chIFN $\alpha$  in 100 $\mu$ l Medium bzw. das gleiche Volumen Medium in die Allantois injiziert. 12 Stunden nach Applikation wurde Allantoisflüssigkeit entnommen und der Interferongehalt der Proben im IFN Reporterassay gemessen. Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei Embryonen.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, fand sich auch 12 Stunden nach der Interferon Applikation biologisch aktives Typ I Interferon in der Allantoisflüssigkeit. Dabei waren in der Allantoisflüssigkeit der Eier die mit 2500U Interferon behandelt worden waren im Schnitt nur noch 20U/ml biologisch aktives Interferon messbar. Für die Allantoisflüssigkeit der Eier die mit 25.000U Interferon behandelt worden waren, wurden im Schnitt 250U/ml Typ I Interferon gemessen.

Ob die Gabe von Interferon auch im Embryo zur Induktion von Mx führt, wurde mittels RT-PCR überprüft.



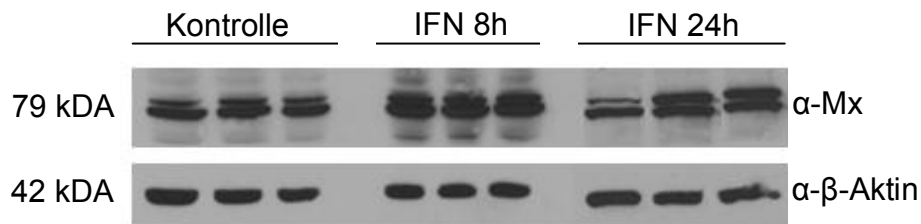
#### Abb. 10 Stimulation von LSL-Embryonen mit rek.chIFN $\alpha$

An Embryonaltag 11 wurden 2500 bzw. 25000U rek.chIFN $\alpha$  in die Allantoishöhle injiziert. 12 Stunden nach Interferongabe wurden Eihaut und Herz entnommen, die RNA isoliert, die RT-PCR wurde mit chMx spezifischen Primern bzw.  $\beta$ -Aktin Primern durchgeführt a) Eihaut; 3 Tiere mit 2500U IFN stimuliert, 3 Tiere mit 25.000U IFN stimuliert b) Herz, 1 Tier ohne IFN, 1 Tier mit 2500U IFN, 1 Tier mit 25.000U IFN.

Auch *in ovo* lässt sich 12 Stunden nach der Applikation von Typ I Interferon eine Zunahme der chMx mRNA per RT-PCR zeigen, wie in Abb. 10 zu sehen ist. Vor allem in der Eihaut ist die Zunahme von chMx gegenüber der unstimulierten Kontrolle deutlich zu erkennen (Abb. 10a). Auch im Herz ist eine schwache Zunahme der chMx-Expression zu sehen, jedoch nicht so ausgeprägt wie in den Eihäuten (Abb. 10b).

#### 5.2.3 Induktion von Hühner Mx *in vivo*

Nachdem bereits eine Interferon-Abhängigkeit der chMx-Expression *in vitro* und *in ovo* gezeigt werden konnte wurde in einem abschließenden Versuch rek.chIFN $\alpha$  in einer Dosis von  $5 \times 10^6$  U/Tier intravenös (i.v.) an 5 Wochen alte Tiere der Linie M11 verabreicht. 5 Minuten nach Applikation des Interferons wurde den Tieren Blut entnommen, das Plasma gewonnen und im Reporterassay der Interferongehalt bestimmt. Im Plasma der Tiere fanden sich mehr als 7000U/ml Typ I Interferon wieder. Weiterhin wurden Tiere 8 bzw. 24 Stunden nach der Interferongabe getötet und die Lunge entnommen. Wie in Abb. 11 zu sehen, zeigte sich die Expression von chMx auf Proteinebene nach i.v. Stimulation mit Typ I Interferon deutlich. Vor allem 8 Stunden nach Applikation des Interferons ist eine stärkere Bande auf der erwarteten Höhe von 79 kDa gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu erkennen. 24 Stunden nach Applikation des Interferons ist die chMx spezifische Bande auf der Höhe von 79 kDa noch immer prominenter als in der unstimulierten Kontrolle jedoch schon etwas dünner als 8 Stunden nach Applikation.



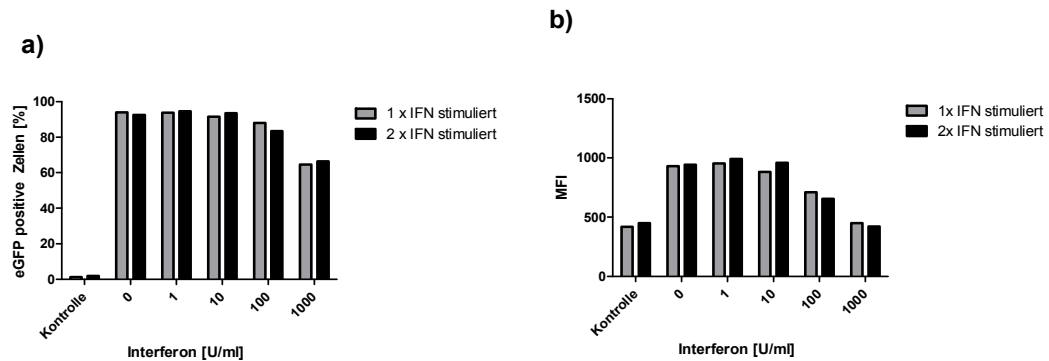
**Abb. 11 Western Blot Lungenhomogenat nach Interferonstimulation von Hühnern**

5 Wochen alte M11 Hühner erhielten  $5 \times 10^6$  U/Tier rek.chIFN $\alpha$  i.v. 8 bzw. 24 Stunden p.i. wurde eine Lungenprobe entnommen und homogenisiert. 0,75 $\mu$ l je Homogenat wurden für den Western Blot aufgetragen. Die Detektion des chMx-Proteins erfolgte mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Biotin-anti-Maus-Ig Antikörper und Streptavidin-POD. Das Hühner  $\beta$ -Aktin Protein wurde mit einem Maus-anti- $\beta$ -Aktin Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-POD Konjugat detektiert.

Damit konnte gezeigt werden, dass Mx genau wie bei den Säugern auch beim Huhn zu den Interferon stimulierten Genen zählt. Für Mensch und Maus ist bekannt, dass Mx die Schlüsselrolle in der interferonvermittelten antiviralen Abwehr der Zelle spielt. Diese Aussage sollte im Folgenden im Hühnersystem überprüft werden.

### 5.3 Transfektion von HEF nach chIFN $\alpha$ Stimulation

Bei dem RCAS(BP)A-Vektor handelt es sich um einen replikationskompetenten retroviralen Vektor. Nach der Transfektion des RCAS(BP)A-Konstruktes in die Zelle kommt es zur Produktion von infektiösem RCAS(BP)A-Virus, welches in der Lage ist die noch uninfizierten Zellen in der Kultur zu infizieren. Um auszuschließen, dass die Transfektion bzw. Infektion von primären Linie 0 HEF, welche nötig ist um die RCAS(BP)A-Konstrukte in den Zellen zu exprimieren, durch die Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  vollständig inhibiert wird, wurden HEF mit verschiedenen Mengen rek.chIFN $\alpha$  für 12 Stunden vor der Transfektion stimuliert. In einem zweiten Ansatz wurde den HEF auch nach der Transfektion nochmals rek.chIFN $\alpha$  zugesetzt. Die Transfektion erfolgte mit RCAS(BP)A-eGFP. Im Anschluss wurde der Erfolg der Transfektion nach 48 Stunden im Durchflusszytometer kontrolliert.



**Abb. 12 Fehlende Interferon medierte Inhibition der RCAS(BP)A-Transfektion**

Linie 0 HEF wurden für 12 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und im Anschluss mit RCAS(BP)A-eGFP transfiziert. Eine Gruppe Zellen wurden nach der Transfektion erneut mit Interferon stimuliert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Analyse der eGFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen.

a) Prozent eGFP positive Zellen b) Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der eGFP positiven Zellen.

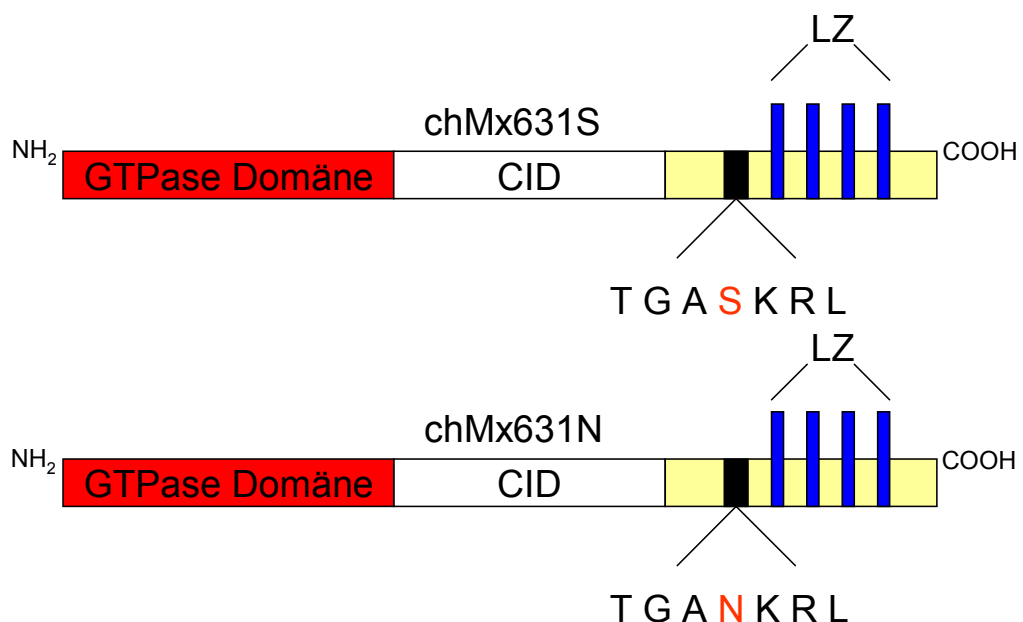
Es zeigte sich, dass die Stimulation der primären HEF mit Typ I Interferon in Konzentrationen bis 100U/ml rek.chIFN $\alpha$  keinen Einfluss auf die Transfektion und darauf folgende Infektion mit RCAS(BP)A-eGFP hatte. 48 Stunden nach der Transfektion waren 88% der Zellen eGFP positiv im Vergleich zu untransfizierten Linie 0 HEF in der Kontrolle, wie in Abb. 12a zu sehen ist. Wurden die Zellen jedoch mit 1000U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert kam es zu einer geringgradigen Inhibition der Infektion der Zellen. Wie in Abb. 12a zu sehen, waren 48 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zur Kontrolle erst 66% der Zellen eGFP positiv. Dies zeigte, dass zwar die Transfektion mit dem RCAS(BP)A-eGFP Konstrukt möglich war, aber die im Anschluss folgende Ausbreitung des RCAS(BP)A Virus *in vitro* durch die hohen chIFN $\alpha$  Mengen inhibiert wurde. In Abb. 12b ist zu sehen, dass es bei dieser Interferonmenge auch zu einer Abnahme der Intensität der eGFP-Fluoreszenz von 930 MFI auf 450 MFI kommt. Bereits nach einer Stimulation mit 100U/ml rek.chIFN $\alpha$  kommt es zu einer Reduktion der MFI von 930 MFI auf 700 MFI. Sowohl bei der Anzahl der eGFP positiven Zellen als auch bei der MFI war jedoch kein Unterschied zwischen einmaliger bzw. zweimaliger Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  zu erkennen.

## 5.4 *In vitro* Infektionsexperimente zur Untersuchung potentiell antiviraler Aktivität von Hühner-Mx

### 5.4.1 Erstellung der Mx-Konstrukte

Erstmals wurde chMx von Bernasconi et. al. [282] kloniert und als ein nicht antivirales Protein beim Huhn beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von chMx im Typ I Interferonsystem des Huhns genau untersucht. Zu diesem Zweck wurde zum einen, das von Bernasconi et. al. klonierte, chMx mit einem Serin an Aminosäureposition 631 und zum anderen eine durch Punktmutation erstellte Mutante, welche an Aminosäureposition 631 ein Asparagin trägt, eingesetzt.

Auf Nucleotidebene wurde durch zielgerichtete Mutagenese (siehe 4.4.6) ein Guanin durch ein Adenin ersetzt. Durch diesen Einzelnukleotid-Polymorphismus (snp = *single nucleotid polymorphism*) kam es auch auf Aminosäurebasis zu einem Austausch von Serin (S) zu Asparagin (N).



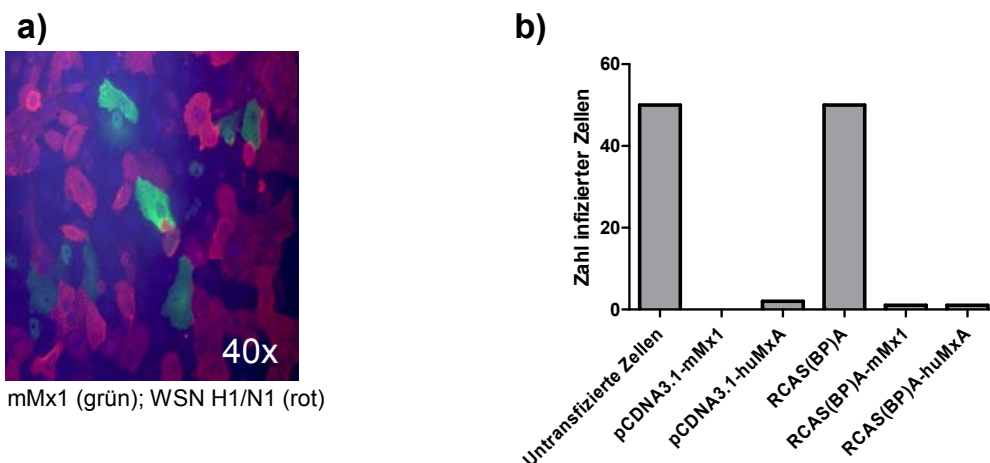
**Abb. 13 Zielgerichtete Mutagenese von chMx631S zu chMx631N**

Ausgehend von dem Konstrukt pTZ18/U-chMx631S wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Hierbei wurde auf Nucleotidebene Guanin (agt) zu Adenin (aat) mutiert und damit auf Aminosäurebasis an Position 631 ein Austausch von Serin zu Asparagin erwirkt.

chMx631S bzw. chMx631N wurden sowohl in pCAGGS/MCS(XmaI) als auch in RCAS(BP)A kloniert. Weiterhin wurden mMx1 und huMxA ebenfalls in RCAS(BP)A kloniert. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

#### 5.4.2 Infektion von Vero Zellen mit WSN/33 (H1N1)

Die erstellten RCAS(BP)A-Mx-Konstrukte (siehe 5.4.1) sollten nun im Huhn zum Einsatz kommen. Zur Prüfung der Funktionalität der erstellten Konstrukte wurden diese zunächst in dem bereits etablierten Säugersystem getestet. Hierfür wurden Vero Zellen transient mit RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA transfiziert und diese Zellen nach 24 Stunden mit dem WSN/33-Virus (H1N1) infiziert. Anschließend wurde eine Doppelimmunfluoreszenz-Färbung gegen Mx-Protein und Influenza A durchgeführt und das Verhältnis Mx-exprimierender nicht infizierter Zellen gegenüber Mx-exprimierenden infizierten Zellen beurteilt.



**Abb. 14** Antivirale Wirkung der RCAS(BP)A basierten huMxA- und mMx1-Expression in Vero Zellen

a) Vero Zellen wurden transient mit RCAS(BP)A-mMx1 transfiziert und 24 Stunden später mit WSN/33 (H1N1) mit einer m.o.i von 10 infiziert. Weitere 12 Stunden später wurden die Zellen fixiert und mMx1 bzw. WSN/33 (H1N1) mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper bzw. einem Kaninchen-anti-PR8 Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-Alexa 488 Konjugat bzw. einem Ziege-anti-Kaninchen-Ig Alexa 568 Konjugat und DAPI detektiert.

b) Auswertung nach Auszählen von 50 mMx1 bzw. huMxA exprimierenden Zellen und Prüfung auf eine gleichzeitig vorliegende WSN/33 (H1N1) Infektion.

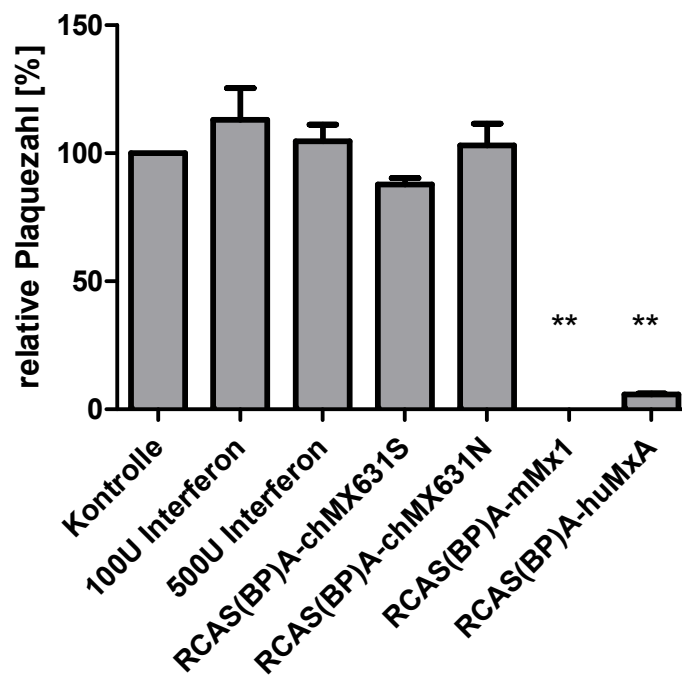
Wie in Abb. 14b zu sehen ist, zeigte sich, dass die Expression von mMx1 und huMxA in dem Geflügel-Vektor RCAS(BP)A, in Säugerezellen, zu einer deutlichen antiviralen Aktivität gegenüber WSN/33 (H1N1) führt. Gegenüber der Expression in dem Säuger-Expressionsvektor pCDNA3.1. war kein Unterschied



zu erkennen. Damit konnte nachgewiesen werden, dass beide Konstrukte korrekt funktionierten und folglich als Positivkontrolle in Hühnerzellen verwendet werden konnten.

### 5.4.3 Infektion von DF1 Zellen mit WSN/33 (H1N1)

Nachdem gezeigt werden konnte (siehe 5.4.2), dass RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA in Säugerzellen gegenüber einem niedrig pathogenen Influenza A Virus einen antiviralen Status erzeugen, wurden in einem nächsten Schritt die Zellen der Hühnerfibroblastenzelllinie DF1 mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA transfiziert und 72 Stunden später mit WSN/33 (H1N1) infiziert. Als Kontrolle wurden DF1 Zellen 12 Stunden vor der Infektion mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert.



**Abb. 15 Antivirale Wirkung der RCAS(BP)A-basierten Mx-Expression in DF1 Zellen**

DF1 Zellen wurden mit den angegebenen RCAS(BP)A Konstrukten transfiziert bzw. 12 Stunden mit 100U/ml bzw. 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und danach mit 50pfu/ml WSN/33 (H1N1) infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und infizierte Zellen angefärbt. Dargestellt ist die Plaquezahl in Relation zur Kontrolle.

Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten \*\* p  $\leq$  0,01 t-Test

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, führte die Expression von mMx1 und huMxA zu einem Schutz der Zellen gegenüber der WSN/33 (H1N1) Infektion. Die Überexpression der beiden chMx-Isoformen erzeugte keine Reduktion der

Plaqueszahl im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise führte die 12 stündige Stimulation der Zellen mit rek.chIFN $\alpha$  zu keinem Schutz der Zellen vor der WSN/33 (H1N1) Infektion. Um einen Defekt im Typ I Interferonrezeptor der verwendeten DF1 Zellen auszuschließen, wurden diese mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und ein Western Blot zum Nachweis von Mx-Protein durchgeführt.



**Abb. 16 chIFN $\alpha$  vermittelte Mx-Induktion in DF1 Zellen**

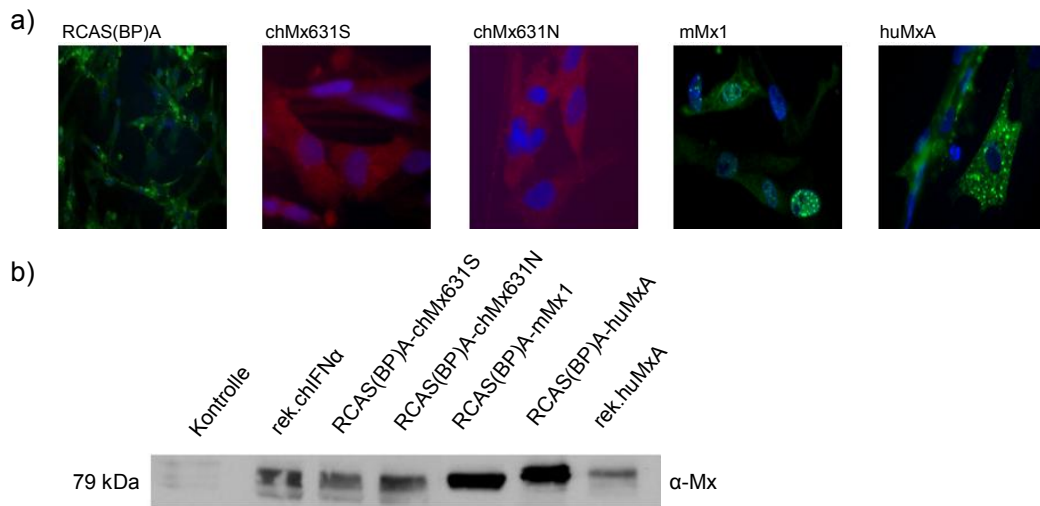
$1 \times 10^7$  DF1 Zellen wurden mit 500U rek.chIFN $\alpha$  für 12 Stunden stimuliert oder waren mit RCAS(BP)A-chMx631S transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in 500 $\mu$ l 1x Lämmli-puffer lysiert. 20 $\mu$ l des Lysates wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und das Mx-Protein mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig POD Konjugat detektiert. Positivkontrolle 0,1 $\mu$ g rek.huMxA.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, lässt sich im Western Blot nach rek.chIFN $\alpha$  Stimulation Mx-Protein nachweisen, sodass davon auszugehen war, dass die fehlende antivirale Wirkung des Interferons in der DF1 Zelllinie nicht an einem Defekt im Typ I Interferonrezeptor lag.

Da ein funktionierendes Interferonsystem essenziell für die Erforschung der Bedeutung von Mx im Typ I Interferonsystem des Haushuhns war, wurden in allen weiteren Versuchen primäre Fibroblasten (Linie 0) verwendet.

#### 5.4.4 Infektion von HEF mit WSN/33 (H1N1)

In einem ersten Versuch wurden primäre Linie 0 HEF mit den Konstrukten RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurde zum einen per Western Blot auf Zelllysaten (siehe Abb. 17a) und zum anderen per Immunfluoreszenz-Färbung (siehe Abb. 17b) die Expression der jeweiligen Konstrukte untersucht.



**Abb. 17 Expression der RCAS(BP)A-Mx Konstrukte**

a) Mit den angegebenen Konstrukten infizierte Linie 0 HEF wurden zum Nachweis der Mx-Expression und RCAS(BP)A-Infektion mit Maus-anti-huMxA bzw. Maus-anti-p19-IgG1 gefolgt von einem Ziege-anti-Maus Alexa 488 Konjugat bzw. Ziege-anti-Maus Alexa 568 Konjugat gefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

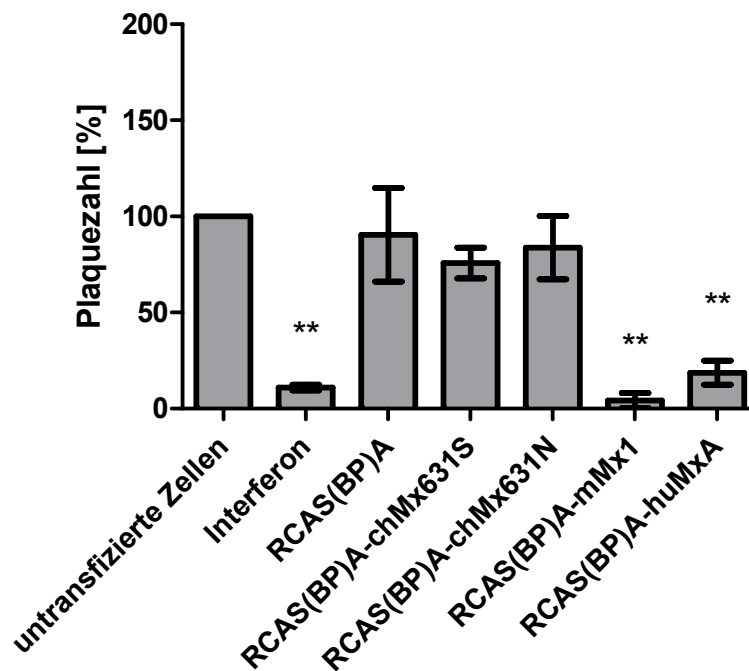
b)  $1 \times 10^7$  Linie 0 HEF wurden mit den RCAS(BP)A-Konstrukten transfiziert oder für 12 Stunden mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l 1x Lämmli-puffer lysiert. 20  $\mu$ l des Lysates wurden mittels 10% SDS-PAGE aufgetrennt, gebロットet und das Mx-Protein mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-POD Konjugat und Chemilumineszenz detektiert. Als Positivkontrolle dienten 0,1  $\mu$ g rek.huMxA.

Die Immunfluoreszenz-Färbung der transduzierten primären Linie 0 HEF zeigt, wie in Abb. 17a zu sehen ist, dass alle erstellten RCAS(BP)A-Konstrukte exprimiert werden. Im Gegensatz zu einer transienten Transfektion mit herkömmlichen Expressionsvektoren ist zu erkennen, dass mit dem RCAS(BP)A-System annähernd 100% der Zellen infiziert werden und das gewünschte Transgen überexprimieren. Ebenso lassen sich in der Immunfluoreszenz auch deutlich die Unterschiede zwischen den einzelnen Mx-Proteinen hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle erkennen. Während beide chMx-Isoformen und huMxA im Zytoplasma der Zelle exprimiert werden, ist mMx1 wie zu erwarten im Kern lokalisiert. Dies beruht darauf, dass mMx1 noch eine Nukleus-Zielsequenz besitzt, welche den anderen Mx-Isoformen fehlt. Weiterhin sind bei mMx1 und huMxA deutlich heller leuchtende punktförmige Areale zu erkennen. Hier handelt es sich um die oligomerisierte Form des Mx-Proteins, welche als stabile Speicherform dient. Diese Oligomere konnten bei der Immunfluoreszenz-Färbung von chMx nie beobachtet werden.

Auch wurde die Überexpression der verschiedenen Mx-Konstrukte im Western Blot aus Zelllysaten nachgewiesen. In Abb. 17b ist zu erkennen, dass die Zellen

nach 12 stündiger Interferonstimulation endogenes chMx exprimieren, und die Banden bei mMx1 und huMxA deutlich prominenter waren. Dies ist vermutlich auf den verwendeten monoklonalen Antikörper zurückzuführen, welcher gegen huMxA gerichtet ist und mit chMx kreuzreagiert.

In einem ersten Infektionsversuch wurden nun primäre Linie 0 HEF mit WSN/33 (H1N1) infiziert.



**Abb. 18 Infektion von Mx überexprimierenden HEF mit WSN/33 (H1N1)**

Primäre Linie 0 HEF wurden mit den jeweiligen RCAS(BP)A-Konstrukten transfiziert und 72 Stunden inkubiert bzw. 12 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und danach mit 100pfu/ml WSN/33 (H1N1) infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und WSN/33 (H1N1) per Immunostaining angefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und das relative Verhältnis der Plaques bezogen auf die Kontrolle berechnet.

Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten \*\*  $p \leq 0,01$  t-Test

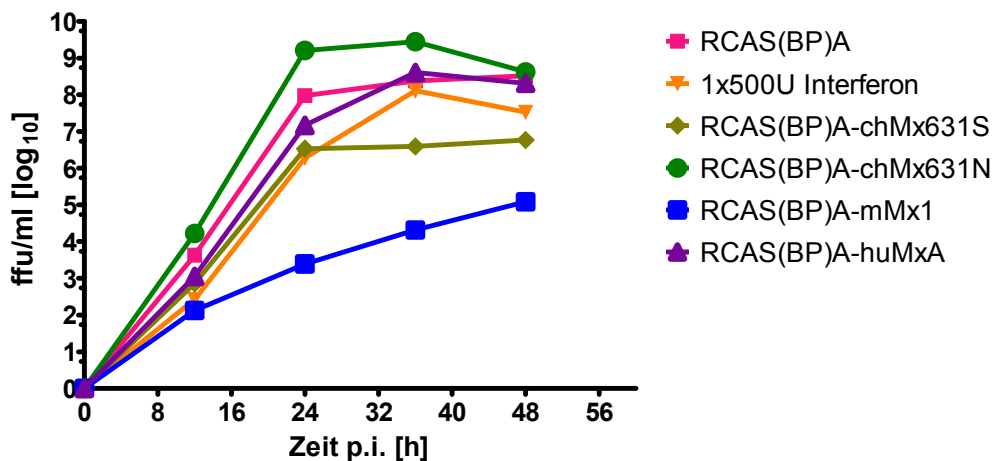
Wie in Abb. 18 zu sehen ist, ist die Plaquezahl durch Typ I Interferonstimulation von 100% auf 11% Plaques reduziert, die Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  führt also zu einem Schutz der primären Linie 0 HEF *in vitro*. Weiterhin ist die Plaquezahl der Zellen, die RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA überexprimieren auf 4% bzw. 19% Plaques reduziert und die Zellen sind somit vor der Infektion mit diesem niedrig pathogenen an den Säuger adaptierten Influenza A Virus geschützt. Weder durch die Überexpression von chMx631S und chMx631N noch durch den RCAS(BP)A-Vektor ist jedoch ein antiviraler Effekt zu beobachten. Ein Unterschied zwischen den beiden chMx-Isoformen war folglich nicht

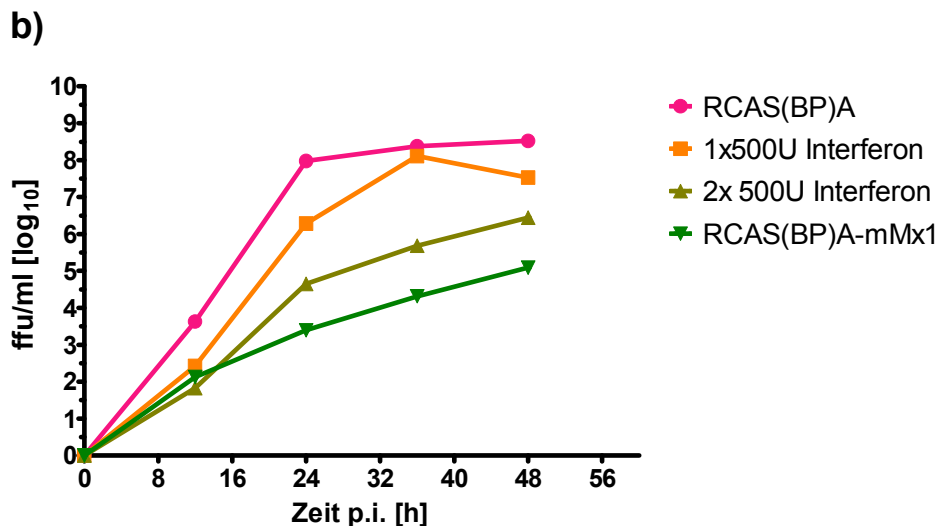
auszumachen. Auch die Mutation von Serin zu Asparagin an Aminosäureposition 631 scheint also nicht zu einer antiviralen Wirkung von chMx gegenüber niedrig pathogenen Influenza A Viren zu führen.

#### 5.4.4.1 Wachstumskinetik von WSN/33 (H1N1) auf Linie 0 HEF

Da es nicht möglich ist, mittels Plaque-Assay Ausbreitung und Wachstumsgeschwindigkeit von Viren *in vitro* zu beurteilen und anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die chMx-Isoformen evtl. einen Effekt auf die Ausbreitung bzw. die Wachstumsgeschwindigkeit der Viren haben, wurden zur Klärung der Frage Wachstumskinetiken *in vitro* angefertigt. Hierfür wurden primäre Linie 0 HEF verwendet. Die Zellen wurden entweder unbehandelt bzw. mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert eingesetzt oder waren mit den Konstrukten K023, K052, K053, K057 oder K062 transfiziert. Für die Infektion wurde WSN/33 (H1N1) mit einer m.o.i von 0,001 verwendet. Die m.o.i. wurde hier so niedrig gewählt, um initial möglichst wenige Zellen zu infizieren und somit die Ausbreitung in Zellkultur und vor allem die Geschwindigkeit der Ausbreitung beurteilen zu können.

a)





**Abb. 19 Wachstumskinetik von WSN/33 (H1N1) auf primären Linie 0 HEF**

Primäre Linie 0 HEF wurden mit einer m.o.i. von 0,001 mit WSN/33 (H1N1) infiziert. Zu den angegebenen Zeiten nach Infektion wurde Überstand entnommen und auf MDCK Zellen titriert; a) HEF wurden 12 Stunden vor der Infektion mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert bzw. waren mit den verschiedenen RCAS(BP)A-Mx Konstrukten transfiziert, nach der Infektion wurde kein Interferon mehr zugesetzt.

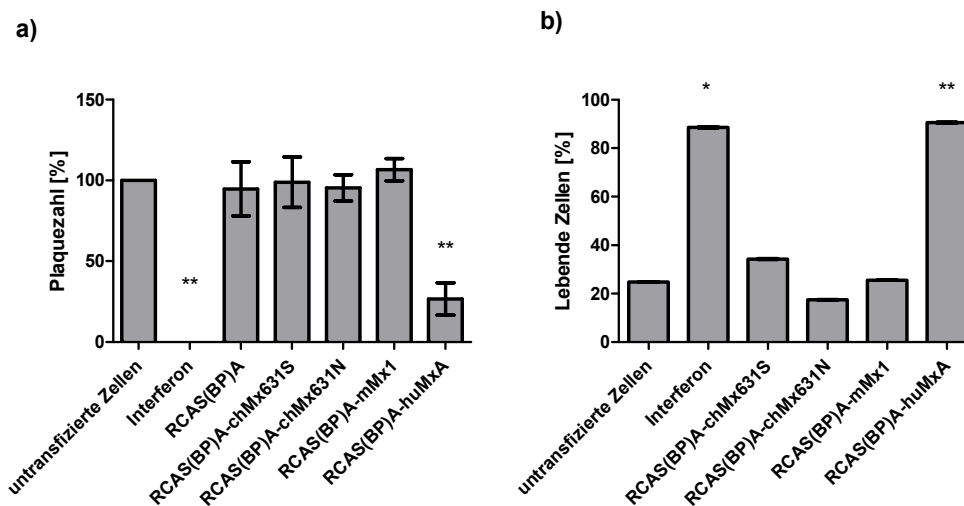
b) HEF wurden 12 Stunden vor der Infektion mit 500U/ml Interferon stimuliert bzw. waren mit RCAS(BP)A oder RCAS(BP)A-mMx1 transfiziert; nach der Infektion wurden die Interferon behandelten HEF erneut mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert.

Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 19a zu sehen ist, führte die Überexpression von mMx1 zu einem verlangsamten Viruswachstum über 48 Stunden. Überexprimiertes huMxA war dagegen nicht in der Lage, die Virusausbreitung gegenüber der Kontrolle (RCAS(BP)A-Vektor) zu inhibieren. Interessanterweise zeigten die Zellen, die 12 Stunden vor der Infektion mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert wurden und nach der Infektion ohne chIFN $\alpha$  weiter kultiviert wurden, nur einen schwachen antiviralen Effekt durch Interferonstimulation, welcher nur die ersten 24 Stunden p.i. zu erkennen war. Die Überexpression der beiden chMx-Isoformen führte nicht zu einem antiviralen Effekt bezogen auf das Viruswachstum von WSN/33 (H1N1) (Abb. 19a). Wurden die Zellen nach der Infektion nochmals mit rek.chIFN $\alpha$  stimuliert, wie in Abb. 19b zu sehen, ist der Virustiter auch 48 Stunden p.i. noch um ungefähr 2 log Stufen gegenüber der Kontrolle (RCAS(BP)A-Vektor) reduziert, liegt jedoch 1 log Stufe höher als der Virustiter mMx1 exprimierender Zellen.

### 5.4.5 Infektion von Linie 0 HEF mit Vesicular stomatitis Virus

Da Ko et. al [287, 296] auch eine potenziell antivirale Aktivität von chMx631N gegenüber Vesicular stomatitis Virus (VSV) beschrieben hatten, wurde in einem weiteren Infektionsexperiment die antivirale Aktivität der chMx-Isoformen gegenüber VSV getestet. Im Gegensatz zu Ko et al. wurden hier jedoch alle Versuche in einem rein geflügelsspezifischen System durchgeführt. Hierfür wurden primäre Linie 0 HEF mit den RCAS(BP)A-Mx Konstrukten transfiziert bzw. 12 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit VSV und die Inkubation für 24 Stunden. Die Auswertung erfolgte mittels Plaque-Assay und antiviralem Bioassay.



**Abb. 20 VSV Infektion primärer Linie 0 HEF**

Primäre Linie 0 HEF wurden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert bzw. mit den RCAS(BP)A-Mx-Konstrukten transfiziert und im Anschluss mit 50pfu/ml Vesicular stomatitis Virus infiziert.

a) Plaque-Assay; die infizierten Zellen wurden mit Avicel<sup>®13</sup> überschichtet und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert; Nach Färbung mit Kristallviolett konnten die Plaques gezählt werden;

b) Antiviraler Bioassay; SD  $\leq$  0,22.

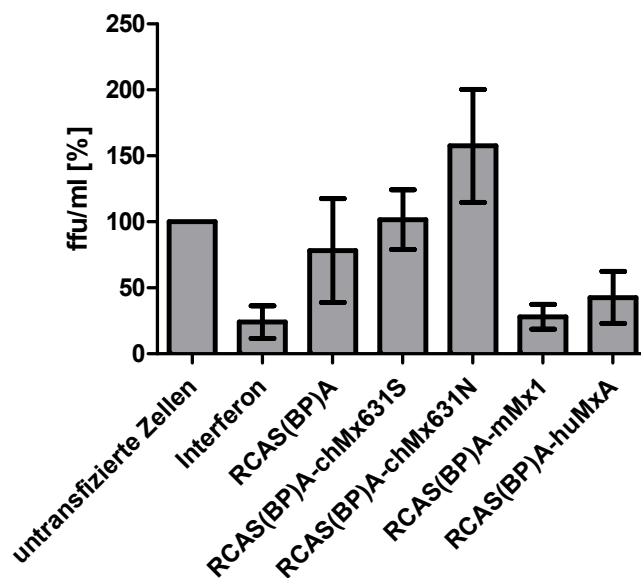
Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten.

\*\* p  $\leq$  0,01 t-Test, \* p  $\leq$  0,05 t-Test

Abb. 20a und b ist zu entnehmen, dass die Stimulation mit Typ I Interferon einen antiviralen Status der primären Linie 0 HEF gegenüber der VSV Infektion hervorruft. Auch die Überexpression von huMxA ist in der Lage, HEF vor der VSV Infektion sowohl im Plaque-Assay als auch im antiviralen Bioassay zu schützen. Jedoch bestätigt sich die Beobachtung von Ko et al., dass chMx631N gegen VSV Infektionen schützt, in beiden Assays nicht. Vielmehr ist kein Unterschied zwischen chMx631S, chMx631N, mMx1 und der unbehandelten Kontrolle zu erkennen.

### 5.4.6 Infektion von Linie 0 HEF mit niedrig pathogenen Influenza A Geflügelviren

Bisher hatten sich keine antiviralen Effekte von chMx gegenüber den getesteten Viren gezeigt. Allerdings waren bis zu diesem Zeitpunkt auch nur an den Säuger adaptierte Viren zur Untersuchung gekommen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein niedrig pathogenes Influenza A Virus verwendet, welches an Geflügel adaptiert ist. Da es sich um ein Virus handelt, welches keinen zytopathischen Effekt hervorrufen kann, konnte kein Plaque-Assay durchgeführt werden. Stattdessen wurde zum Testen dieses Virus die HEF mit einer m.o.i von 1 infiziert und für 24 Stunden nur mit Medium überschichtet inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und die Zellmembran durch Einfrieren und Tauen zerstört, um nicht sezernierte Viruspartikel aus den Zellen freizusetzen. Die Überstände wurden mit Trypsin inkubiert, da die Viren zwar in der Lage sind Viruspartikel aus der Zelle auszuschleusen, diese jedoch nur unter Trypsinzusatz infektiös sind. Diese mit Trypsin inkubierten Überstände konnten nun auf MDCK Zellen titriert werden.



**Abb. 21 Antivirale Wirkung der Mx-Expression gegen ein geflügelspezifisches niedrig pathogenes Influenza A Virus**

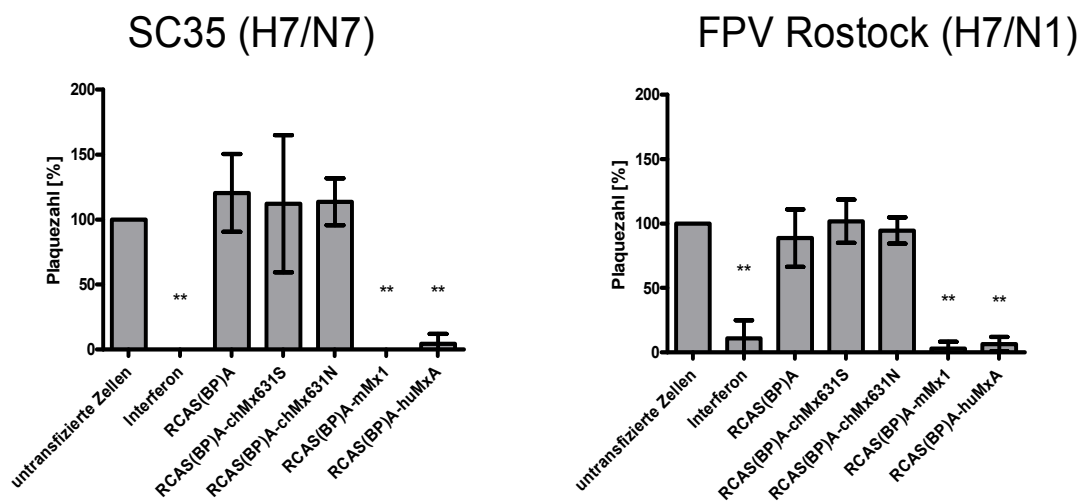
Primäre Linie 0 HEF wurden mit einer m.o.i von 1 mit low pathogenic avian influenza (LPAI) 84 (H8N4) A/Turkey/Ontario/6118/68 infiziert. 24 Stunden p.i. wurden die Überstände abgenommen, die Zellen durch Einfrieren und Tauen lysiert, in den Überständen resuspendiert und diese Überstände mit 1mg/ml Trypsin inkubiert. Diese Überstände wurden dann auf MDCK Zellen titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten.

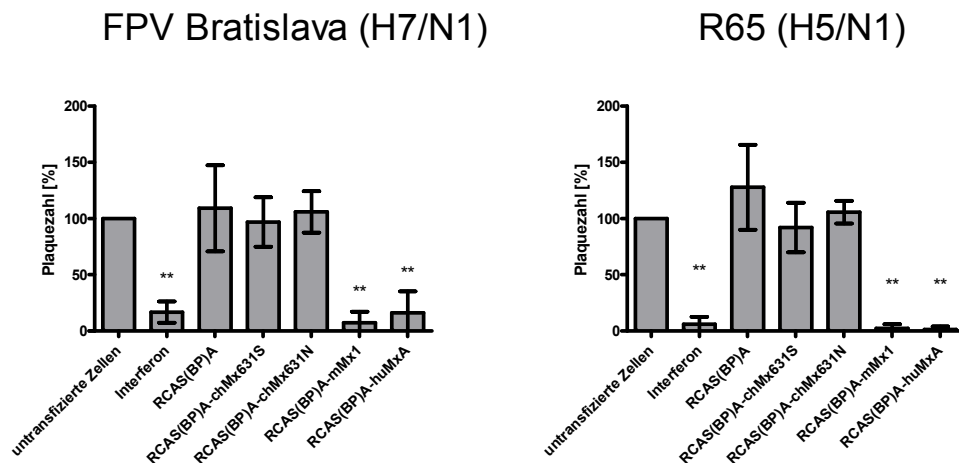


Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, ruft die Stimulation mit Typ I Interferon eine Reduktion des Virustiters auf 24% der Kontrolle (untransfizierte Zellen) hervor, ähnlich wie die mMx1 exprimierenden Zellen, welche den Titer auf 28% der Kontrolle reduzieren. Die Überexpression von huMxA in primären Linie 0 HEF führt ebenfalls zu einer Titerreduktion auf 48% im Vergleich zur Kontrolle. Bei LPAI/84 (H8N4) A/Turkey/Ontario/6118/68 ist kein Unterschied zwischen chMx631S und chMx631N zu erkennen, beide Isoformen sind nicht antiviral gegenüber dem verwendeten Virus.

#### 5.4.7 Infektion von Linie 0 HEF mit hoch pathogenen Influenza A Viren

Wie schon einleitend beschrieben, stellen niedrig und mittel pathogene Influenza A Viren ein wirtschaftliches Problem in der Geflügelindustrie dar. Aber auch hoch pathogene Influenza Viren führen immer wieder zu tödlichen Infektionen beim Geflügel. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Überexpression der verschiedenen chMx-Isoformen einen Effekt auf hoch pathogene Influenza A Viren hat.





**Abb. 22 Antivirale Wirkung der Mx-Expression gegen hoch pathogene Influenza A Viren**

Primäre Linie 0 HEF wurden für 12 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert bzw. waren vor 72 Stunden mit den RCAS(BP)A-Mx-Konstrukten transfiziert worden. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit 100pfu/ml der angegebenen Viren

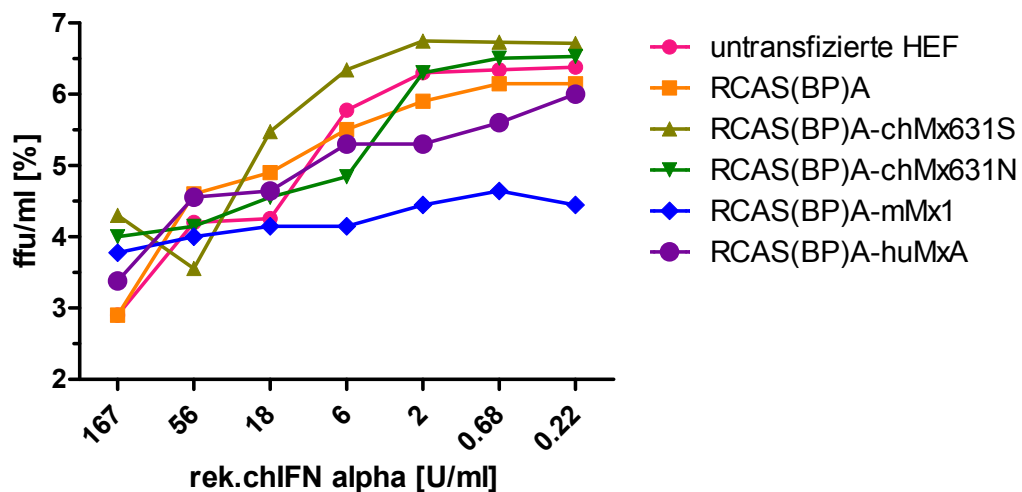
Die Daten repräsentieren MW und SD aus drei unabhängigen Experimenten \*\*  $p \leq 0,01$  t-Test

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, führte die Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  bei allen eingesetzten Viren zu einer Reduktion der Plaquezahl auf Werte von 0-16% im Vergleich zur Kontrolle (untransfizierte Zellen). Ebenso war die Plaquezahl bei den Zellen die RCAS(BP)A-mMx1 bzw. RCAS(BP)A-huMxA überexprimierten auf 0-16% der Kontrolle reduziert. Die Zellen die mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S oder RCAS(BP)A-chMx631N infiziert waren zeigten keinen antiviralen Effekt gegenüber der Infektion mit den hoch pathogenen Erregern. chMx alleine ist folglich nicht in der Lage, einen antiviralen Status in Geflügelzellen gegenüber hoch pathogenen Influenza A Viren hervorzurufen, so wie es mMx1 und huMxA bewirken.

#### 5.4.8 chIFN $\alpha$ Titration auf HEF und anschließende WSN/33 (H1N1) Infektion

Da *in vitro* bisher keinerlei Effekte der chMx-Isoformen gesehen wurden, sehr wohl aber ein Schutzeffekt gegenüber Influenza A Viren durch Typ I Interferonstimulation ausgelöst werden konnte, war die Überlegung, ob womöglich ein durch chIFN $\alpha$  Stimulation regulierter Kofaktor zusammen mit chMx eine antivirale Wirkung zeigen kann. Aus diesem Grund wurden Linie 0 HEF mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 oder RCAS(BP)A-huMxA transfiziert und mit verschiedenen

Mengen rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. Ziel war es, die chIFN $\alpha$  Konzentration zu ermitteln, bei welcher kein antiviraler Effekt mehr durch die alleinige Stimulation mit chIFN $\alpha$  zu sehen ist, aber womöglich noch ein, für die Wirkung von chMx notwendiger Kofaktor induziert wird.



**Abb. 23 Antivirale Wirkung der Mx-Expression in Kombination mit Interferonstimulation gegen ein niedrig pathogenes Influenza A Virus**

Primäre Linie 0 HEF wurden mit den RCAS(BP)A-Konstrukten transfiziert und 72 Stunden später für 12 Stunden mit verschiedenen Mengen an rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. Danach erfolgte die Infektion mit WSN/33 (H1N1). Im Anschluss an die Infektion wurde den Zellen nochmals rek.chIFN $\alpha$  zugegeben und der Ansatz bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Titration der Überstände auf MDCK Zellen.

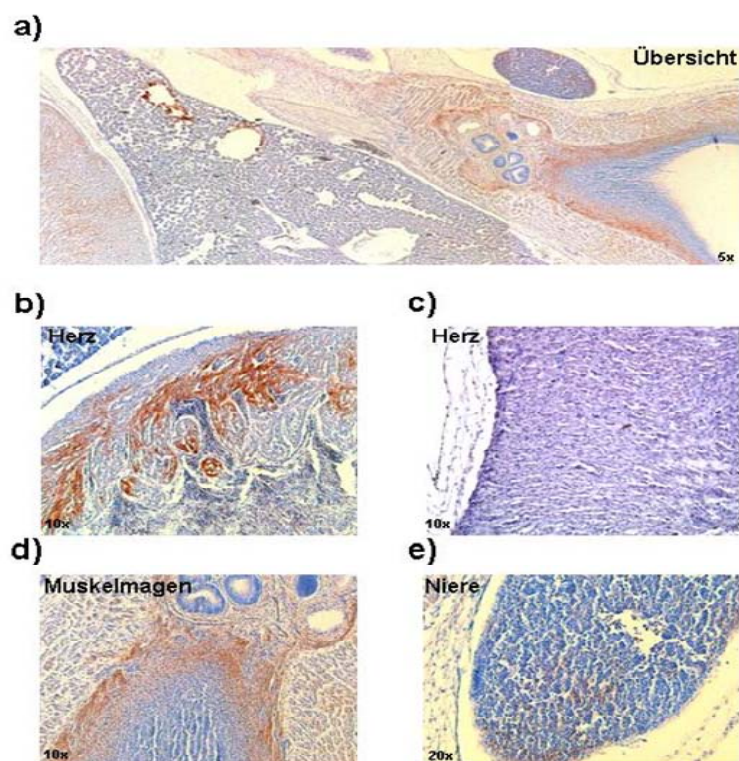
Wie zu erwarten und in Abb. 23 zu sehen reduzierten mMx1 und huMxA die Virustiter gegenüber der RCAS(BP)A-Vektor Kontrolle um 3 log Stufen. Die Stimulation mit 167U/ml rek.chIFN $\alpha$  führte unabhängig der überexprimierten Mx-Konstrukte zu einem deutlichen Schutz der Zellen vor der WSN/33 (H1N1) Infektion. Die Virustiter waren hier um bis zu 3 log Stufen gegenüber den unstimulierten Zellen reduziert. Mit abnehmender Menge an Interferon war ein Anstieg der Virustiter 24 Stunden p.i. zu beobachten. Nur die Virustiter von mMx1 exprimierenden Zellen blieben unabhängig der Interferonkonzentration konstant bei ungefähr  $1 \times 10^4$  ffu/ml. Zwischen den beiden chMx-Isoformen war kein Unterschied zu erkennen. Es ließ sich durch Stimulation mit geringen Mengen an chIFN $\alpha$  kein Kofaktor induzieren, welcher zusammen mit den chMx-Isoformen in der Lage gewesen wäre, die Zellen vor der Infektion mit dem niedrig pathogenen Influenza A Virus zu schützen.

## 5.5 *In ovo* Infektionsexperimente mit Influenza A Viren zur Analyse der Bedeutung von chMx in der Virusabwehr

Nachdem die *in vitro* Experimente nahelegten, dass chMx keine Bedeutung in der antiviralen Abwehr gegenüber Influenza A Viren zukommt sollten diese Ergebnisse *in ovo* überprüft werden.

### 5.5.1 Kontrolle der RCAS(BP)A-Vektor basierten Mx-Überexpression

Um zu überprüfen, ob chMx einen antiviralen Effekt *in vivo* vermittelt, wurde das RCAS(BP)A-System genutzt. Hierzu wurden die Mx-Konstrukte im Hühnerembryo überexprimiert (siehe Abb. 6). An Bruttag 3 wurden Linie 0 HEF, welche mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 oder RCAS(BP)A-huMxA transfiziert waren, in die Eier injiziert und diese anschließend bebrütet. An Bruttag 11 wurden Embryonen entnommen und die RCAS(BP)A medierte Transgenexpression kontrolliert.



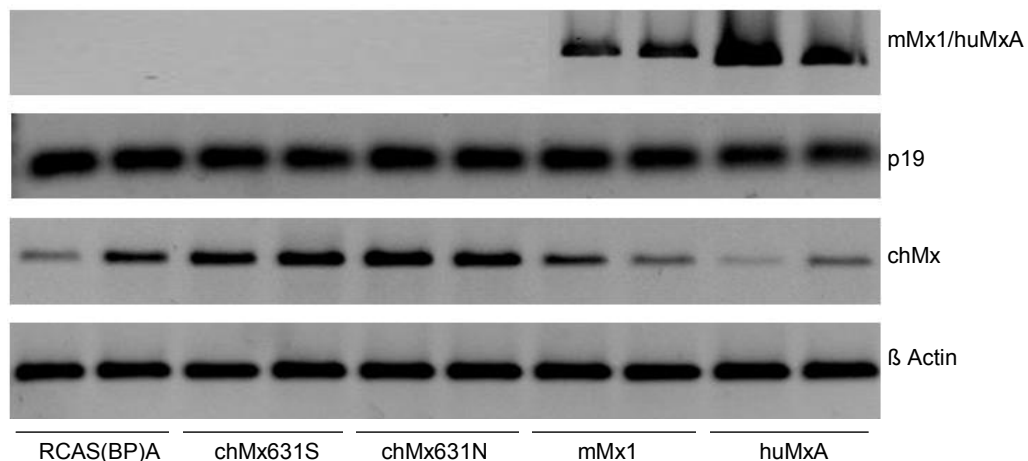
**Abb. 24 RCAS(BP)A Expression an Embryontag 11**

An Bruttag 11 wurden RCAS(BP)A-Vektor transduzierte Embryonen entnommen und die Gewebe fixiert und für die Immunhistochemie vorbereitet. Virales p19 Protein (Braun) wurde mit einem Maus-anti-p19-IgG1 Antikörper gefolgt von einem Pferd-anti-Maus-Biotin Antikörper mit dem Vectastain ABC:HRP Mouse IgG Kit<sup>14</sup> detektiert und mit DAB Kit<sup>14</sup> entwickelt.

RCAS(BP)A transduzierte Tiere a, b, d, e); Kontrolle c)

In der Immunhistologie kam es zu einer deutlichen Anfärbung des p19 Proteins, wie in Abb. 24a, b, d und e zu sehen ist. Vor allem in den Endothelien war RCAS(BP)A nachweisbar. Die höchste Expressionsrate fand sich im Herz wie auch in Abb. 24b zu sehen ist. Da Linie 0 Embryonen frei von endogenen Retroviren sind, wie die Kontrollfärbung in Abb. 24c zeigt, ist die Färbung auf p19 in diesen Tieren spezifisch für die Transduktion dieser Zellen mit RCAS(BP)A.

Neben der immunhistologischen Färbung für das RCAS(BP)A p19 Protein wurde von Embryonen an Embryonaltag 11 Gewebe zur RNA-Isolation gewonnen. cDNA der Proben wurde mit spezifischen Primern für p19, chMx, mMx1 oder huMxA auf die Expression der jeweiligen Transkripte im Embryo untersucht.



**Abb. 25 Expressionskontrolle der RCAS(BP)A Konstrukte *in ovo***

Aus dem Herz von 11 Tage alten LSL-Embryonen wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und in die RT-PCR eingesetzt. Es wurden Primer verwendet, die spezifisch für chMx, mMx1 bzw. huMxA waren; 5µl der PCR-Reaktion wurden auf ein 1,2% Agarosegel aufgetragen und im Anschluss an die Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

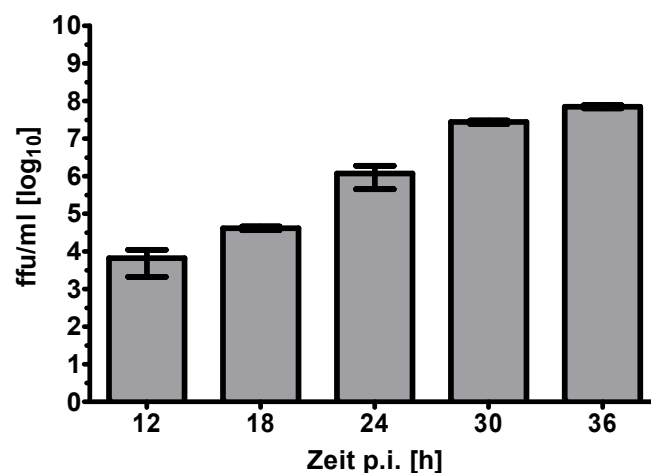
Wie die RT-PCR in Abb. 25 zeigt, funktioniert die Überexpression der RCAS(BP)A-Mx-Konstrukte auch in Embryonen der Linie LSL. In den Embryonen welche mit RCAS(BP)A-mMx1 oder RCAS(BP)A-huMxA transduziert wurden, ist eine spezifische Bande für diese Konstrukte in der RT-PCR zu erkennen. Embryonen welche nicht mit mMx1 bzw. huMxA transduziert wurden, waren in dieser RT-PCR negativ. Wurde die Transduktion der Embryonen mit RCAS(BP)A-chMx631S oder RCAS(BP)A-chMx631N durchgeführt, war eine spezifische Bande für chMx zu erkennen (siehe Abb. 25). Jedoch war auch in den RCAS(BP)A-mMx1, RCAS(BP)A-huMxA und

RCAS(BP)A behandelten Embryonen eine Bande mit den chMx spezifischen Primern zu detektieren, welche jedoch schwächer war als in den mit den chMx-Konstrukten behandelten Embryonen.

Weiterhin findet sich in allen Tieren p19 was jedoch in Embryonen der Linie LSL auch endogen vorkommen kann, da diese Tiere nicht frei von endogenen Retroviren sind und somit zum Teil auch schon vor der Infektion mit den RCAS(BP)A-Konstrukten p19 exprimieren könnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das RCAS(BP)A-System geeignet war, um die verschiedenen Mx-Isoformen in Embryonen überzuexprimieren. Diese Embryonen konnten nachfolgend für Infektionsexperimente eingesetzt werden.

### 5.5.2 Infektion von LSL-Embryonen mit WSN/33 (H1N1)

In einem ersten Experiment wurden Eier der Linie LSL für 11 Tage unter Standardbedingungen bebrütet und an Tag 11 mit 1000ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert. Um Informationen über das Wachstum von WSN/33 (H1N1) *in ovo* zu erhalten wurde ab 12 Stunden p.i. alle 6 Stunden Allantoisflüssigkeit entnommen und auf MDCK Zellen titriert.

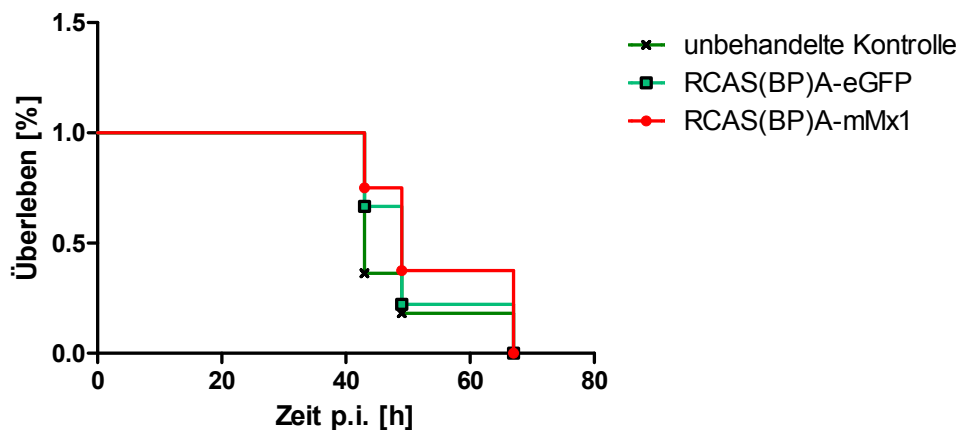


**Abb. 26** Wachstumskinetik WSN/33 (H1N1) *in ovo*

An Brutttag 11 wurden Embryonen der Linie LSL mit 1000ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert und danach unter Standardbedingungen bebrütet. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurde Allantoisflüssigkeit gewonnen und auf MDCK Zellen auf ihren Virusgehalt hin titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD von 5 Embryonen je Zeitpunkt.

In Abb. 26 zeigte sich ein moderates Wachstum von WSN/33 (H1N1) bis 24 Stunden p.i.. Ab 30 Stunden erreicht WSN/33 (H1N1) ein Plateau von ungefähr  $5 \times 10^7$  ffu/ml. Weiterhin wurde beobachtet, dass die ersten Embryonen bereits 36 Stunden nach der Infektion abstarben.

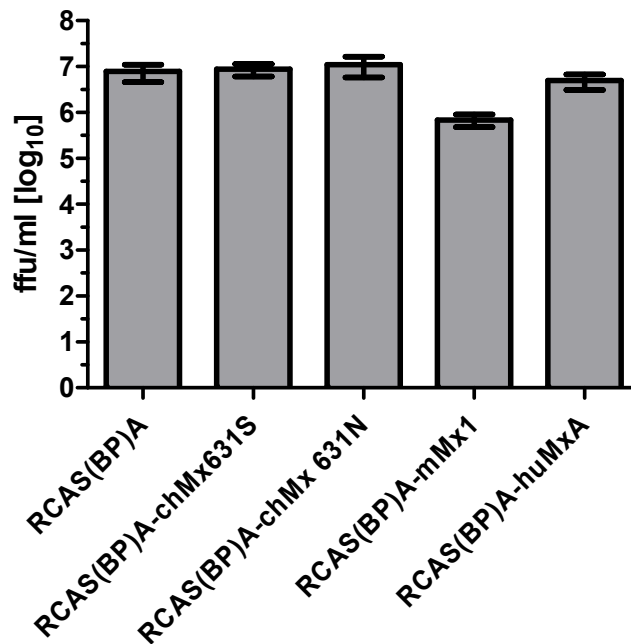
Da in der Maus bereits gezeigt wurde, dass allein mMx1 in der Lage ist vor Influenza A Infektionen zu schützen, wurde nun im Hühnerembryonen mMx1 mithilfe von RCAS(BP)A überexprimiert und das Überleben dieser Embryonen nach WSN/33 (H1N1) Infektion beurteilt. LSL-Embryonen wurden hierfür an Bruttag 3 mit RCAS(BP)A-eGFP oder RCAS(BP)A-mMx1 transduziert, an Bruttag 11 mit  $10.000$  ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert und alle 12 Stunden auf Lebenszeichen überprüft.



**Abb. 27 Überlebenskurve Mx exprimierender LSL-Embryonen nach WSN/33 (H1N1) Infektion**  
An Bruttag 3 wurden LSL-Embryonen mit RCAS(BP)A-eGFP und RCAS(BP)A-mMx1 transduziert und an Bruttag 11 mit  $1 \times 10^4$  ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert. Anschließend wurden die Embryonen alle 12 Stunden auf Lebenszeichen überprüft  $n \geq 8$  je Gruppe.

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, führt die Überexpression von RCAS(BP)A-mMx1 in LSL-Eiern nach Infektion mit dem niedrig pathogenen Influenza A Virus WSN/33 (H1N1) nicht zu einer Verlängerung der Lebenszeit. Die Embryonen begannen 40 Stunden p.i. zu sterben und waren 72 Stunden p.i., unabhängig des überexprimierten Gens, alle verstorben.

Im Weiteren wurden LSL-Embryonen an Bruttag 3 mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 oder RCAS(BP)A-huMxA transduziert, an Bruttag 11 mit  $1000$  ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert und 24 Stunden p.i. der Virusgehalt in der Allantoisflüssigkeit auf MDCK Zellen titriert.



**Abb. 28 Virustiter in der Allantoisflüssigkeit von LSL-Eiern nach WSN/33 (H1N1) Infektion**

An Brutttag 3 wurden LSL-Embryonen mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA transduziert und an Brutttag 11 mit 100ffu/Ei WSN/33 (H1N1) infiziert, 24 Stunden später wurde die Allantoisflüssigkeit entnommen und der Gehalt an Virus auf MDCK Zellen titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD von  $\geq 7$  Tieren je Gruppe.

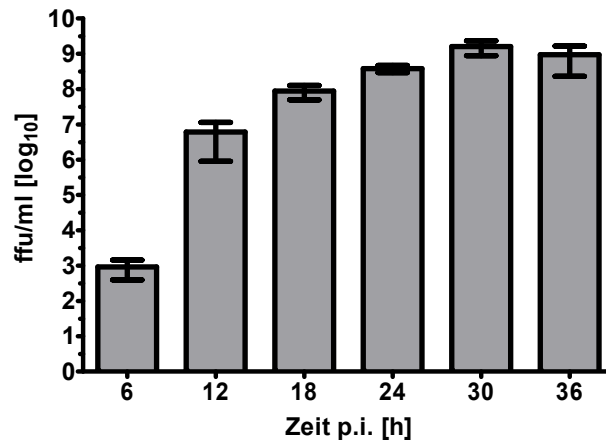
Wie in Abb. 28 zu erkennen ist, führte die Überexpression von mMx1 in LSL-Embryonen zu einer Reduktion des WSN/33 (H1N1) Virustiter in der Allantois auf  $6,9 \times 10^5$  ffu/ml 24 Stunden p.i. im Vergleich zu  $7,9 \times 10^6$  ffu/ml in der Kontrolle (RCAS(BP)A exprimierende Embryonen).

Durch die Expression von huMxA kommt es nur zu einer Reduktion auf  $4,9 \times 10^6$  ffu/ml und nicht zu einem so deutlichen antiviralen Effekt wie *in vitro*. Beide chMx-Isoformen liegen auf dem gleichen Niveau wie die Kontrollgruppe und zeigen somit keinen antiviralen Effekt *in ovo* gegenüber WSN/33 (H1N1).

### 5.5.3 Infektion von LSL-Embryonen mit LPAI/84 (H8N4)

In den bisherigen *in ovo* Experimenten wurde mit einem an den Säuger adaptierten Influenza A Virus, WSN/33 (H1N1), gearbeitet. Daher sollte nun ein an das Geflügel adaptierte niedrig pathogenes Influenza A Virus verwendet werden, um auszuschließen, dass mögliche antivirale chMx-Effekte nur in Kombination mit an das Geflügel adaptierten Viren sichtbar werden.





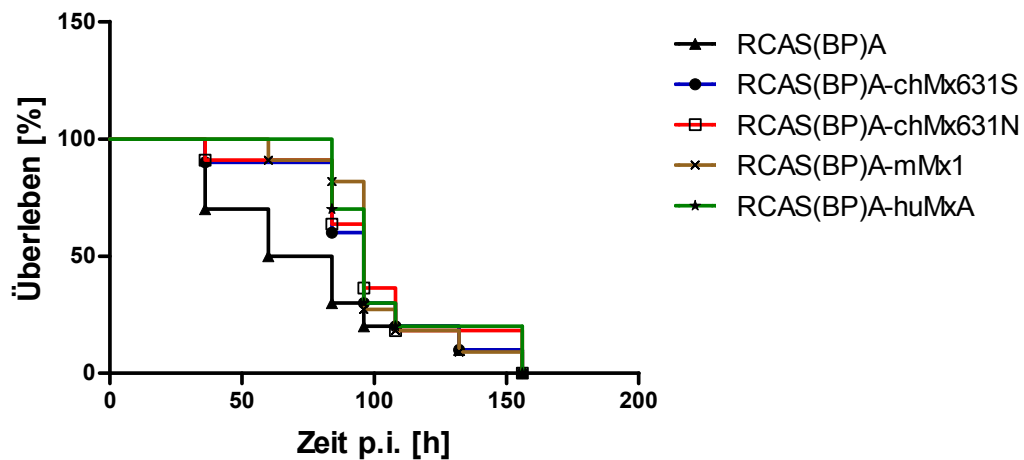
**Abb. 29 Wachstumskinetik LPAI/84 (H8N4) *in ovo***

An Bruttag 11 wurden Embryonen der Linie LSL mit 1000ffu/Ei LPAI/84 (H8N4) infiziert und danach unter Standardbedingungen bebrütet. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurde Allantoisflüssigkeit gewonnen und auf MDCK Zellen auf ihren Virusgehalt hin titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD von 7 Tieren je Zeitpunkt.

Das niedrig pathogene geflügelsspezifische LPAI/84 (H8N4) Virus wuchs im Vergleich zu WSN/33 (H1N1) (siehe Abb. 26) deutlich schneller zu hohen Titern im Ei heran. Bereits nach 12 Stunden erreichte LPAI/84 (H8N4) Titer von  $1 \times 10^7$  ffu/ml wohin gegen WSN/33 (H1N1) 12 Stunden p.i. noch bei  $1 \times 10^4$  ffu/ml lag. Dieses schnelle Wachstum für LPAI/84 (H8N4) setzte sich bis 24 Stunden p.i. fort. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die Virustiter ein Plateau im Ei wie in Abb. 29 zu erkennen ist. Die Titer für LPAI/84 (H8N4) bewegten sich im Maximum bei  $1 \times 10^9$  ffu/ml und lagen damit deutlich höher als bei WSN/33 (H1N1). Jedoch lebten 36 Stunden p.i. noch alle Embryonen. Mit diesem niedrig pathogenen geflügelsspezifischen Virus starben die Embryonen erst ab 48 Stunden p.i..

Um die Wirkung der Mx-Expression gegen LPAI/84 (H8N4) in LSL-Embryonen zu überprüfen wurden LSL-Embryonen an Bruttag 3 mit RCAS(BP)A, RCAS(BP)A-chMx631S, RCAS(BP)A-chMx631N, RCAS(BP)A-mMx1 und RCAS(BP)A-huMxA transduziert und an Bruttag 11 mit 1000ffu/Ei LPAI/84 (H8N4) infiziert.

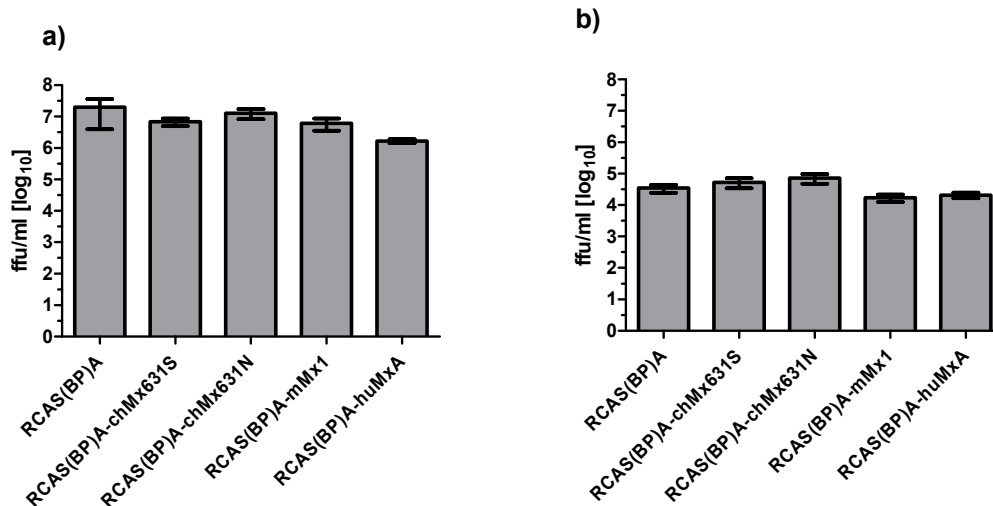
Im Abstand von 12 Stunden wurde die Vitalität der infizierten Embryonen überprüft.



**Abb. 30 Überlebenskurve Mx exprimierender LSL-Embryonen nach LPAI/84 (H8N4) Infektion**  
An Bruttag 3 wurden LSL-Embryonen mit den angegebenen Konstrukten transduziert und an Bruttag 11 mit 1000ffu/Ei LPAI/84 (H8N4) infiziert. Anschließend wurde die Vitalität der Embryonen alle 12 Stunden überprüft n ≥ 10 je Gruppe.

Überraschenderweise ist nach der Infektion mit einem, an das Geflügel adaptierten niedrig pathogenen Influenza A Virus ein geringer Effekt, bezogen auf das Überleben der RCAS(BP)A-Mx transduzierten Tiere zu sehen. Verglichen mit der RCAS(BP)A-Vektor Kontrollgruppe starben alle Tiere die eine Form von Mx, egal ob chMx, mMx1 oder huMxA, überexprimierten um etwa 48 Stunden versetzt zu der RCAS(BP)A-Vektor Kontrollgruppe, wie in Abb. 30 zu sehen ist. Diese Tiere überlebten mit der LPAI/84 (H8N4) Infektion im Schnitt also zwei Tage länger als Tiere die keine Mx-Isoform überexprimierten. Aber auch hier überlebte kein Tier die Infektion mit dem Influenza A Virus. Hervorzuheben ist, dass kein Unterschied zwischen dem chMx631S und chMx631N zu beobachten war.

Da bezüglich des Überlebens der Embryonen kein Unterschied zwischen den Mx-Isoformen zu sehen war, wurden in einem weiteren Versuch Herz und Allantoisflüssigkeit 14 Stunden p.i. und damit vor Erreichen des Plateaus des Virustiters entnommen.



**Abb. 31 Virustiter von LSL-Embryonen nach LPAI/84 (H8N4) Infektion**

An Brutttag 3 wurden LSL-Embryonen mit den angegebenen Konstrukten transduziert und an Brutttag 11 mit 1000ffu/Ei LPAI/84 (H8N4) infiziert, 14 Stunden später wurde a) die Allantoisflüssigkeit und b) das Herz entnommen und der Gehalt an Virus auf MDCK Zellen titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD von 8 Tieren je Gruppe.

Ähnlich wie in den Versuchen mit WSN/33 (H1N1) führt auch bei der Infektion mit LPAI/84 (H8N4) die Überexpression von mMx1 und huMxA zu einer geringgradigen Hemmung des Viruswachstums. Wie in Abb. 31a zu sehen, reduziert die Überexpression von huMxA den Virustiter um 1,5 log Stufen und mMx1 um 0,5 log Stufen verglichen mit der RCAS(BP)A-Vektor-Kontrolle in der Allantoisflüssigkeit. In der Allantoisflüssigkeit ist auch eine Virustiterreduktion von LPAI/84 (H8N4) bei RCAS(BP)A-chMx631S zu beobachten. Es kommt hier zu einer Reduktion von 0,5 log Stufen verglichen mit der Kontrolle. Im Herz ist ein leichter antiviraler Effekt von mMx1 und huMxA nach Überexpression zu erkennen, wie Abb. 31b zeigt. Durch diese beiden Mx-Proteine der Säuger kommt es zu einer Reduktion von 0,5 log Stufen im Herz der LSL-Embryonen. Die beiden chMx-Isoformen bewirken keinen antiviralen Effekt im Herz der LSL-Embryonen.

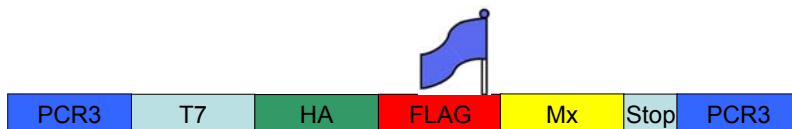
Abschließend kann festgehalten werden, dass auch die Überexpression keiner der untersuchten chMx-Isoformen *in ovo* einen potenziellen Kofaktor aktivieren konnte, der von Bedeutung für das Überleben gewesen wäre, *in vitro* aber gefehlt hätte, um einen antiviralen Effekt gegenüber Influenza A Viren zu vermitteln.

## 5.6 Prüfung der GTPase-Aktivität von Mx

Bei den Mx-Proteinen handelt es sich um große GTPasen, welche zur Dynamin Superfamilie gehören. Für huMxA konnte gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität auch mit der antiviralen Wirkung des Proteins gekoppelt ist [211, 223]. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob chMx, dem in allen getesteten Systemen die antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren und Vesicular stomatitis virus fehlte, GTPase-Aktivität besitzt. Hierzu wurde chMx rekombinant hergestellt.

### 5.6.1 Erstellen von Hühner Mx-Konstrukten zur rekombinanten Proteinexpression

Um das Vorhandensein von GTPase-Aktivität für chMx zu untersuchen musste das chMx-Protein rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. Da es nicht möglich war mithilfe von prokaryotischen Expressionssystemen eine ausreichend große Proteinmenge aufzureinigen, wurde ein eukaryotischer Ansatz basierend auf einem modifizierten PCR3 Vektor, mit HA-Signalpeptid und Flag-Tag (siehe Tabelle 5) zur Expression in HEK293T Zellen gewählt.



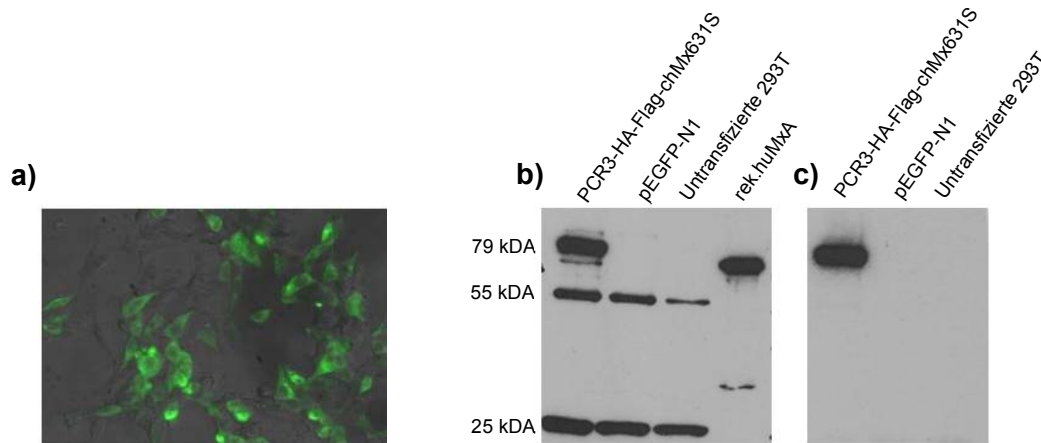
#### Abb. 32 Struktur PCR3-Ha-Flag

chMx631S wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor PCR3-HA-Flag kloniert; der Vektor besitzt einen T7 Promoter mit folgendem HA-Signalpeptid und einem Flag-Tag. An das Flag-Tag schließt sich eine Klonierungsregion, an in welche das chMx inseriert wurde.

Die Sequenz des Konstruktes wurde per Sequenzierung überprüft. Im weiteren Verlauf konnte dieses Konstrukt zur rekombinanten Proteinexpression von chMx631S genutzt werden.

### 5.6.2 Expression und Immunpräzipitation von Mx

Die Expression des PCR3-HA-Flag-chMx631S Konstruktes erfolgte in transient transfizierten HEK293T Zellen.



**Abb. 33 Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation von Flag-chMx631S**

PCR3-HA-Flag-chMx631S oder pEGFP-N1 wurden in HEK293T Zellen transfiziert;

a) 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und immunfluoreszenzgefärbt. Die Detektion des chMx-Proteins erfolgte mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Alexa 488 Konjugat.

b) 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einer Kavität einer 24-Loch Platte in CelLytic™ M Puffer lysiert und mit M2-Flag-Beats immunpräzipitiert. 10µl des Präzipitats wurden geblottet und das chMx-Protein mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-POD Konjugat detektiert und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

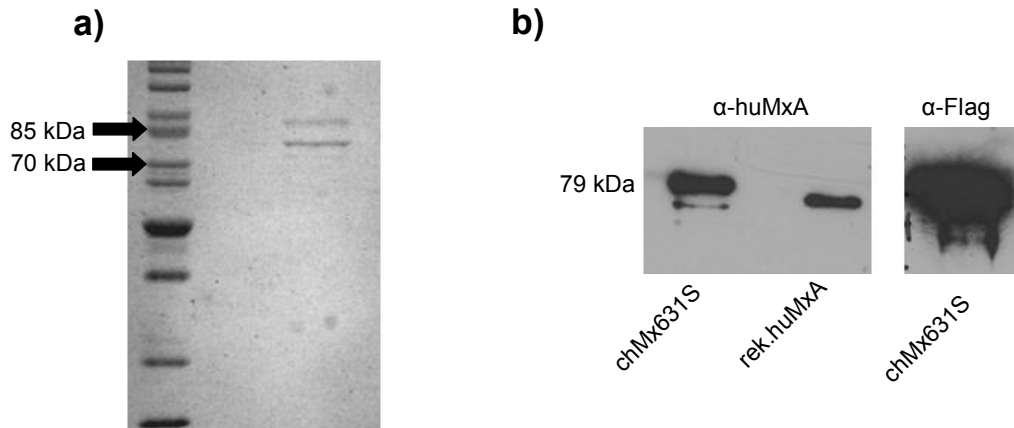
c) gleiches vorgehen wie bei b) aber Detektion des Flag-Tags mit einem Maus-anti-M2-Flag-POD Konjugat.

Wie in Abb. 33a in der anti-Mx Immunfluoreszenz-Färbung zu erkennen ist, wurde chMx631S in HEK293T Zellen mithilfe des PCR3-HA-Flag Vektors exprimiert. Um das chMx aufzureinigen, wurde das Flag-Tag des Konstruktes überprüft. Hierfür wurden zum einen HEK293T Zellen mit PCR3-HA-Flag-chMx631S, zum anderen zur Kontrolle mit pEGFP-N1 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf ihre Mx-Expression und das Vorhandensein eines funktionstüchtigen Flag-Tags geprüft. Wie in Abb. 33b zu sehen ist, war nur bei dem Lysat der mit dem Mx-Konstrukt transfizierten Zellen eine deutliche Bande auf der Höhe von 79 kDa zu sehen, was dem Molekulargewicht von chMx entspricht. Weiterhin war in allen Proben je eine Bande bei 55 kDa und eine bei 25 kDa zu detektieren. Diese Banden sind typisch für die schwere und leichte Kette des M2-Flag Antikörpers der durch den Ziege-anti-Maus-POD Antikörper detektiert wurde. Abb. 33c zeigt, dass ein funktionsfähiges Flag-Tag zusammen mit dem chMx-Protein exprimiert wurde.

### 5.6.3 Aufreinigung von chMx-Protein

Für die weiteren Untersuchungen wurde in HEK293T Zellen exprimiertes chMx-Protein aus Zelllysaten mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Anschließend erfolgte die Konzentration des Proteins mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*<sup>29</sup> und die Schätzung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE.



**Abb. 34 Kontrolle des aufgereinigten chMx631S-Proteins**

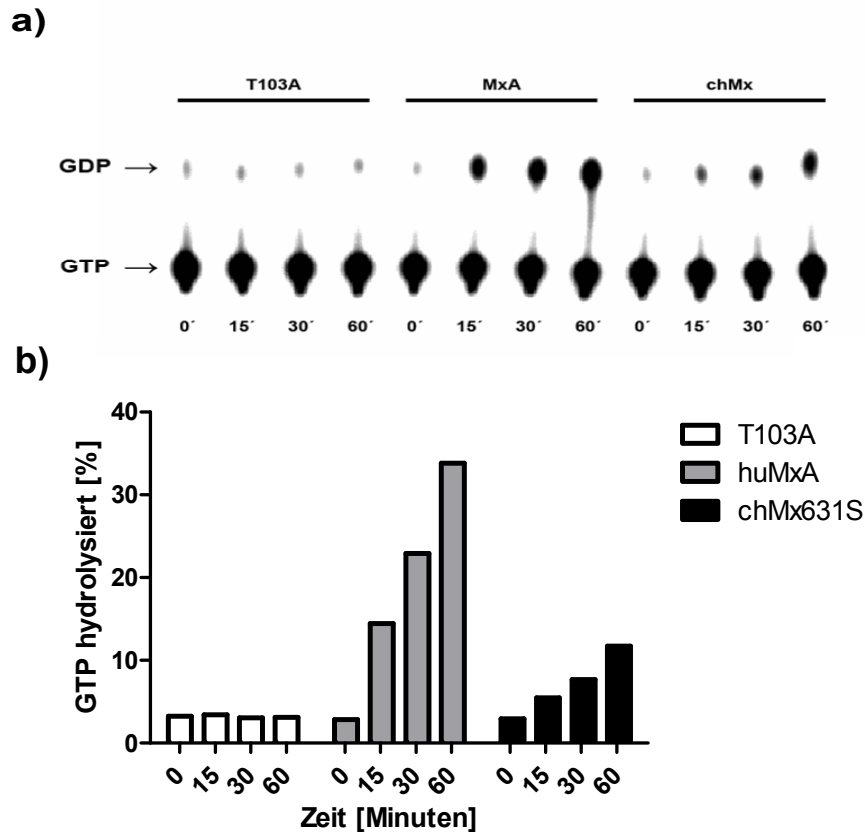
a) Im Anschluss an die Proteinaufreinigung wurde das chMx631S-Protein konzentriert und 10µl auf einem 12% SDS-Gel mittels Coomassie Färbung detektiert.

b) Eine Probe des konzentrierten Proteins wurde im Western Blot mittels einem Maus-α-huMxA Antikörpers gefolgt von einem Ziege-α-Maus-POD Konjugat per Chemilumineszenz detektiert. Zusätzliche erfolgte die Detektion des Proteins durch einen Maus-α-M2-Flag-POD Antikörper mittels Chemilumineszenz.

Wie in Abb. 34b zu sehen ist, zeigte das Eluate eine deutliche Bande auf 79 kDa für chMx. Auch war nur eine Bande mit dem M2-Flag Antikörper zu erkennen, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass das vollständige Mx-Protein aufgereinigt worden war. Anhand eines vorliegenden Proteinstandards wurde die Proteinmenge des Mx-Proteins über ein auf ein SDS-Gel aufgetragenes Aliquot (Abb. 34a) geschätzt. chMx631S-Protein lag demnach in einer Konzentration von ungefähr 0,1µg/ml vor.

#### 5.6.4 Überprüfung der GTPase-Aktivität von chMx

Das aufgereinigte chMx631S-Protein wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Kochs, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg weiter untersucht. Der GTPase-Assay wurde wie von Richter et al. beschrieben durchgeführt [312].



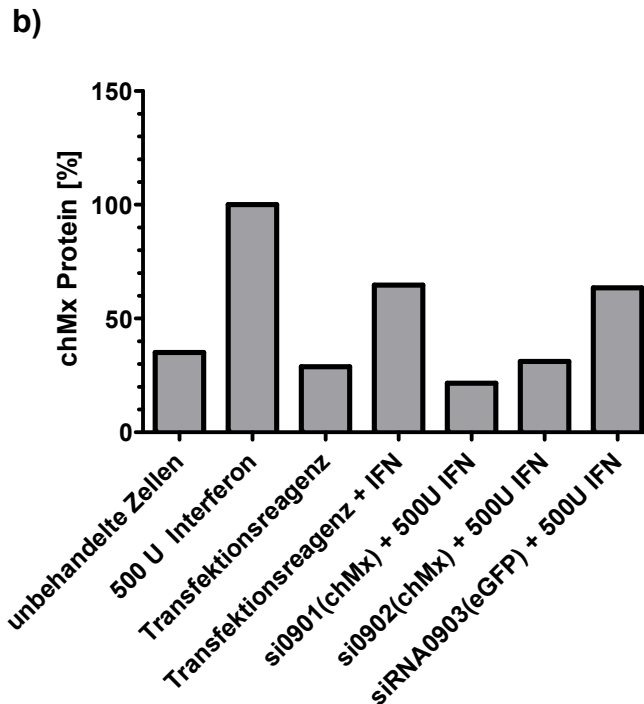
**Abb. 35 Überprüfung der GTPase-Aktivität von chMx**

Zur Prüfung der GTPase-Aktivität wurden 0,1mg/ml Mx-Protein für die angegebene Zeit mit radioaktivem GTP inkubiert, per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und über Nacht mithilfe eines Röntgenfilmes detektiert. a) Röntgenfilm nach 12 Stunden Belichtung; Die Guanosindiphosphat (GDP) Spots wurden densitometrisch ausgemessen und der Prozentsatz hydrolysiertes GTP wie unter b) zu sehen berechnet.

Wie in Abb. 35a zu sehen ist, kam es durch rek.huMxA zu einer deutlichen Hydrolyse von GTP zu GDP. Als Negativkontrolle diente hier eine huMxA Mutante, welcher durch Mutation an Aminosäurenposition 103 von Threonin zu Alanin (T103A) die GTPase-Aktivität verloren gegangen war. Wie gut zu erkennen ist, kam es durch diese Mutation zu keiner Umsetzung des radioaktiv markierten GTPs. Für chMx631S zeigte sich eine Hydrolyse von GTP zu GDP, jedoch waren die Spots nicht so prominent wie bei huMxA. In Abb. 35b ist die densitometrische Auswertung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die huMxA Mutante T103A kein GTP umsetzt. Schaut man jedoch auf rek.huMxA sieht man, dass bis zu 34% des GTPs nach 60 Minuten Inkubation im Vergleich zu 3% bei der T103A Mutante zu GDP umgesetzt wurden. chMx631S war in der Lage 12% GTP zu GDP in 60 Minuten zu hydrolysieren. Somit handelt es sich auch bei chMx631S um eine GTPase.







**Abb. 36 Knockdown von chMx mittels siRNA**

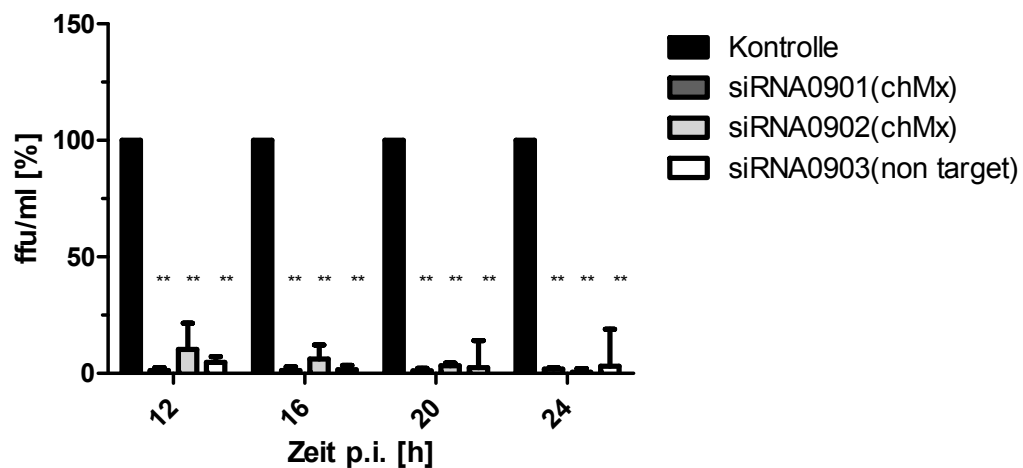
Linie 0 HEF wurden mit siRNA0901(chMx), siRNA0902(chMx) oder siRNA0903(*non target*) transfiziert, 48h inkubiert und im Anschluss für 8 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert. a) 10 $\mu$ g Gesamtprotein wurden im Western Blot aufgetragen und das Mx-Protein mit einem Maus-anti-huMxA Antikörper gefolgt von einem Biotin-anti-Maus-Ig Antikörper und einem Streptavidin-POD Konjugat detektiert. Das ch $\beta$ -Aktin Protein wurde mit einem Maus-anti-ch $\beta$ -Aktin Antikörper gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig POD Konjugat detektiert. b) Densitometrische Auswertung der chMx Bande mithilfe der Software Image Quant TL 7.0

Wie in Abb. 36a zu sehen ist, zeigte sich nach 8 Stunden Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  bei den untransfizierten aber stimulierten Zellen eine deutliche Bande im Western Blot auf der Höhe von 79 kDa, welche spezifisch für chMx ist. Im Vergleich, war bei den mit siRNA 0901 (chMx) transfizierten Zellen keine, oder nur eine sehr schwache chMx-Protein Bande im Western Blot zu erkennen. Auch bei den mit siRNA 0902 (chMx) transfizierten Zellen war eine Abschwächung der chMx-Bande zu sehen, jedoch nicht so deutlich wie bei siRNA 0901. Die mit siRNA 0903 (*non target* siRNA) transfizierten Zellen wiesen eine deutliche chMx-Bande auf, sodass der Effekt bei den siRNA 0901 transfizierten Zellen eindeutig der Wirkung der siRNA zugeordnet werden konnte. Weiterhin wurde der Blot, wie in Abb. 36b zu sehen, mithilfe der Software ImageQuant TL 7.0 ausgewertet. Hierbei wurden die Intensitäten der chMx-Banden untereinander verglichen und der relative chMx-Proteingehalt bezogen auf die rek.chIFN $\alpha$  stimulierte Kontrolle berechnet. Durch die siRNA 0901 wurde das chMx-Protein um 78% herunterreguliert und lag damit unter dem basal Wert von 35% an chMx-

Protein in unstimulierten Zellen. Auch die zweite siRNA 0902 gegen chMx führte zu einem Knockdown von chMx *in vitro*. Allerdings war die Effizienz mit 69% nicht ganz so hoch wie mit siRNA 0901.

### 5.7.2 Infektion von HEF mit WSN/33 (H1N1) nach einem chMx Knockdown

In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob nach einem Knockdown von chMx in Linie 0 HEF, diese Zellen mittels Interferonstimulation vor WSN/33 (H1N1) zu schützen sind. Hierzu wurden HEF wie unter 4.24.2 beschrieben mit drei verschiedenen siRNAs transfiziert, 48 Stunden später für 4 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN  $\alpha$  stimuliert und im Anschluss mit einer m.o.i von 0,1 mit WSN/33 (H1N1) infiziert.



**Abb. 37 Interferon vermittelter Schutz von HEF gegenüber WSN/33 (H1N1) nach chMx Knockdown**

Linie 0 HEF wurden mit den angegebenen siRNA transfiziert, 48 Stunden später für 3,5 Stunden mit 500U/ml rek.chIFN $\alpha$  stimuliert und daraufhin mit einer m.o.i =0,1 mit WSN/33 (H1N1) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Überstand abgenommen und auf MDCK Zellen titriert. Die Daten repräsentieren MW und SD von 3 unabhängigen Experimenten. t-Test  $p \leq 0,01$ .

Wie in Abb. 37 zu sehen ist, führt die Stimulation von, mit einer unspezifischen siRNA (siRNA0903) transfizierten, HEF mit rek.chIFN $\alpha$  zu einer Hemmung des Viruswachstums innerhalb der ersten 24 Stunden p.i. von nahezu 100%. Vergleicht man diesen interferonvermittelten Effekt mit HEF in welchen das chMx-Protein mittels siRNA-Technologie herunterreguliert wurde, sieht man, dass unabhängig der verwendeten siRNA die Effizienz der Hemmung der

WSN/33 (H1N1) Replikation durch rek.chIFN $\alpha$  Stimulation bei mindestens 90% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle liegt.

Es ist also davon auszugehen, dass das chMx-Protein keine Rolle in dem Typ I Interferon vermittelten antiviralen Effekt gegenüber Influenza A Viren in HEF spielt.

## 6 Diskussion

Vögel sind die natürlichen Wirte für Influenza A Viren. Entsprechend kommt es immer wieder zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in der Geflügelindustrie durch Influenza A Virusinfektionen. Zudem resultiert hieraus eine ständige Gefahr der Übertragung von Influenza A Viren auf den Menschen. Aus diesem Grund gibt es ein großes Interesse an Influenza A Virus resistenten Hühnerlinien. Zur Erstellung einer solchen Hühnerlinie stehen vor allem tierzüchterische Ansätze im Vordergrund. Auch wäre die Erstellung transgener Hühner denkbar, doch ist es zum einen zur Zeit in Europa nicht vorstellbar, transgene Tiere zu vermarkten und zum anderen handelt es sich nicht um ein, wie bei der Maus etabliertes Verfahren, welches standardmäßig eingesetzt werden kann [313, 314].

Welche Gene wären also für einen tierzüchterischen Ansatz zur Kontrolle von Influenza Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel geeignet? Mit Mx fand sich im Säuger ein Protein, welches allein effektiv in der Lage war, gegenüber Influenza A Virusinfektionen zu schützen [241]. Im Huhn dachte man viele Jahre, dass Mx nicht von Bedeutung für die Abwehr von Influenza A Virusinfektionen sei [282]. Erst als entdeckt wurde, dass es sich bei chMx um ein hoch polymorphes Gen handelt, wurden verschiedene Hühnerlinien hinsichtlich ihres Mx-Genotyps sequenziert und die unterschiedlichen chMx-Isoformen auf ihre antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Virusinfektionen überprüft [287, 296]. Der hierbei gefundene Polymorphismus an Aminosäureposition 631 von Serin zu Asparagin sollte eine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Virusinfektionen vermitteln und würde somit ein hervorragendes Selektionskriterium für die Tierzucht darstellen. Bevor tierzüchterische Anstrengungen zur Selektion resistenter Tiere unternommen werden, sollte die biologische Aktivität des Mx-Proteins im Detail analysiert werden. Dies war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Zudem sollte durch vergleichende Analysen die Funktion des humanen und murinen Mx-Proteins in Hühnerzellen untersucht werden. Würden Säuger-Mx-Proteine in Hühnerzellen eine starke antivirale Wirkung entfalten, würden sich diese, ungeachtet der kontroversen Diskussion, für die Erstellung transgener Tiere anbieten.

## 6.1 Untersuchung der verschiedenen Mx-Isoformen hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität

Die verschiedenen chMx-Isoformen wurden sowohl *in vitro* als auch *in ovo* hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass zwar das mMx1 und huMxA sowie die Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  in der Lage waren, HEF vor der Infektion mit Influenza A Viren zu schützen, die chMx-Isoformen jedoch keinen antiviralen Effekt gegenüber den verwendeten Viren zeigten. Weiterhin fiel auf, dass die Zelllinie DF1 zwar durch die Expression von mMx1 bzw. huMxA vor WSN/33 (H1N1) Infektionen geschützt werden konnte, jedoch nicht durch Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$ . Der Knockdown von chMx mittels siRNA in Kombination mit den sich anschließenden Infektionsexperimenten konnte zeigen, dass chMx keine Bedeutung in dem durch chIFN $\alpha$  ausgelösten antiviralen Status der HEF hat.

Bei der Untersuchung der genannten Mx-Isoformen *in ovo* zeigte sich kein positiver Effekt auf das Überleben der Embryonen nach der Infektion mit WSN/33 (H1N1). Nach der Infektion mit LPAI/84 (H8N4) kam es zwar zu einer Verzögerung des Sterbens der, mit den RCAS(BP)A-Konstrukten transduzierten Embryonen, aber auch hier überlebte keiner der Embryonen und es war kein Unterschied zwischen den verschiedenen Mx-Isoformen nachweisbar. Die Titration des Virusgehaltes aus der Allantois bzw. dem Herz der Embryonen zeigte für WSN/33 (H1N1) eine geringe Reduktion des Virustiter bei den mMx1 positiven Embryonen und keinen Unterschied zwischen den Mx-Isoformen für LPAI/84 (H8N4). Diese Befunde sollen im Folgenden ausführlich diskutiert werden.

### 6.1.1 Die antivirale Aktivität von chMx *in vitro*

Im Widerspruch zu den hier erhobenen *in vitro* Ergebnissen stehen die Daten von Ko et al., welche eine antivirale Wirkung von chMx631N gegenüber VSV und Influenza A beschrieben [287, 296]. Ko et al. geben an, stabil transfizierte Zelllinien erzeugt zu haben, welche verschiedene chMx-Isoformen exprimieren. Es stellt sich hier die Frage, ob wirklich 100% der 3T3 Zellen das chMx-Protein überexprimierten, da Bernasconi et al. bereits zeigen konnten, dass es zwar

möglich ist, eine stabile 3T3 Zelllinie zu erzeugen, welche chMx konstant exprimiert, jedoch nur bei weniger als 50% der Zellen chMx-Protein nachweisbar ist [282]. Hieraus resultierend ist die Auswertungsmethode, welche Ko et al. wählten recht zweifelhaft. Sie zählten 10-20 Gesichtsfelder im Mikroskop hinsichtlich der VSV-eGFP Expression aus und schlossen aus der Anzahl der eGFP-positiven Zellen auf einen chMx-Effekt oder keinen chMx-Effekt. Zum einen ist hier nicht sichergestellt, dass die Zellen wirklich auch auf Proteinebene chMx positiv waren und zum anderen wäre z.B. denkbar, dass durch die starke chMx-Proteinsynthese die VSV-eGFP Synthese verzögert wird und somit gar kein spezifischer chMx-Effekt vorliegt. Auch für die Auswertung des antiviralen Effektes gegenüber Influenza A wurde mit der *tissue culture infectious dose 50* Methode ein nicht sehr sensitives Verfahren gewählt, bei welchem es schnell zu falsch positiven Aussagen kommen kann [3]. Es ist also durchaus denkbar, dass die hier getroffenen Aussagen auf der Auswahl ungeeigneter Methoden beruhen.

Benfield et al. konnten die von Ko et al. gezeigten Daten ebenfalls nicht bestätigen [297]. Sowohl bei der Infektion von HEF verschiedener Hühnerlinien, welche homozygot für ein Serin oder Asparagin an Aminosäureposition 631 waren, noch bei der Untersuchung einer chMx631N-Isoform, welche vollständig mit der von Ko et al. publizierten Sequenz übereinstimmte, wurde eine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren gefunden. Jedoch bleibt auch hier anzumerken, dass bei der Untersuchung des mit dem von Ko et al. identischen chMx nicht mit Zellkultursystemen gearbeitet wurde in welchen 100% der Zellen das zu untersuchende Protein exprimierten.

Das in dieser Arbeit verwendete RCAS-Vektorsystem, welches von Hughes et al. entwickelt und von Kothlow et al. näher charakterisiert wurde, bot die Möglichkeit, die verschiedenen Mx-Isoformen in 100% der Zellen zu exprimieren [315, 316].

Für die Experimente mit den RCAS(BP)A-Konstrukten sollte die eigens für das RCAS-System vorgesehene Zelllinie DF1 verwendet werden [307]. Da durch chIFN $\alpha$  kein antiviraler Effekt gegenüber WSN/33 (H1N1) auslösbar war, wurde diese Zelllinie jedoch für die weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet. Ein Defekt im Interferonrezeptor oder dem nachfolgenden Signalweg konnte mit

hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da nach Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  die Expression von Mx-Protein in DF1 Zellen nachweisbar war. Die Beobachtung, dass durch rek.chIFN $\alpha$  Stimulation chMx-Protein exprimiert wird, aber kein Schutz der Zellen gegenüber WSN/33 (H1N1) messbar war, ist eine weitere Bestätigung für die fehlende antivirale Aktivität von chMx. Bemerkenswert dabei ist, dass DF1 Zellen ein chMx mit Asparagin an Aminosäureposition 631 tragen, also den initial als antiviral beschriebenen chMx-Isotyp [297]. Ein Vergleich zwischen DF1 Zellen und Linie 0 HEF könnte in der Zukunft einen guten Ansatz darstellen, um herauszufinden welcher Faktor essenziell für den Typ I Interferon vermittelten antiviralen Status der Zellen ist, da in Linie 0 HEF ein antiviraler Status gegenüber Influenza A Viren durch Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  auslösbar ist.

Die Stimulation von HEF mit Typ I Interferon im Plaque-Assay/Immunostaining führte zu einer Inhibition von WSN/33 (H1N1) bzw. VSV von nahezu 100%. Betrachtete man den interferonabhängigen Effekt allerdings mithilfe einer Wachstumskinetik für WSN/33 (H1N1) bzw. im antiviralen Bioassay für VSV, fiel auf, dass dieser Effekt nicht so deutlich ausfiel wie in dem zuvor genannten Testsystem. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass im Plaque-Assay sofort nach der Infektion der Zellen der Zellrasen überschichtet wird, so dass eine Verteilung der neu produzierten Viren nicht möglich ist und man lediglich ein Abbild der initial infizierten Zellen erhält. In der Viruskinetik bzw. dem antiviralen Bioassay können durch die Verteilung der neu synthetisierten Viren über das Zellkulturmedium theoretisch alle Zellen in der Zellkulturkavität infiziert werden. Stimuliert man die Zellen nur einmalig vor der Infektion mit Interferon, lässt der interferonvermittelte Effekt 24 Stunden p.i. nach. Dies passt zum Replikationszyklus der Influenza A Viren, welche nicht mehr als 10 Stunden benötigen um nach der Infektion erneut infektiöses Virus in der Wirtszelle zu produzieren [68]. Somit befindet sich 24 Stunden p.i. bereits neu synthetisiertes Virus im Zellkulturmedium und kann nicht geschützte Zellen bzw. Zellen in denen der Schutzeffekt durch Interferon nachlässt infizieren. Deutlich wird in diesen Experimenten jedoch auch, dass mMx1 im Gegensatz zu den chMx-Isoformen alleine, ohne Interferonstimulation, äußerst effektiv in der Lage ist, die Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum vor der WSN/33 (H1N1)

Infektion zu schützen. Ähnliches wurde auch für huMxA und die Infektion mit VSV beobachtet.

Da es sich bei dem LPAI/84 (H8N4) Virus um ein niedrig pathogenes Virus handelt, welches keinen zytopathischen Effekt auslöst, wurde die antivirale Aktivität der Mx-Isoformen gegenüber diesem Virus in einem ähnlichem System wie der Wachstumskinetik beurteilt. Hierzu wurden die infizierten Zellen nicht wie bei den Plaque-Assays mit Avicel<sup>®</sup> überschichtet, um ein Verteilen von neu synthetisierten Viruspartikeln über das Medium zu verhindern, sondern lediglich unter Zusatz von frischem Medium inkubiert, so dass sich auch Virus im Überstand der Zellen fand. Dass der antivirale Effekt hier nicht so deutlich war, wie bei WSN/33 (H1N1) Infektionen, ist vermutlich unabhängig von dem verwendeten Virus durch die hier verwendete Technik bedingt. Es ist davon auszugehen, dass die Rücktitration der Überstände und die Bestimmung der Virustiter per Immunfluoreszenz deutlich sensitiver ist, als die Beurteilung im Plaque-Assay. Auch spiegelt der hier dargestellte Virustiter nur einen Influenza A Replikationszyklus wieder, da die initial infizierten Zellen zwar Viruspartikel ausschleusen, diese aber ohne Trypsinzusatz nicht infektiös sind. Wären hier weitere Replikationszyklen möglich, würde es zu einer Addition des Interferoneffektes und des mMx1- bzw. huMxA-Effektes kommen und diese damit vermutlich deutlicher ausfallen, als hier beobachtet.

Offensichtlicher war der antivirale Effekt von mMx1, huMxA und rek.chIFN $\alpha$  wenn die Daten mittels Plaque-Assay erhoben wurden. Die Überexpression von mMx1 bzw. huMxA in HEF konnte hier einen stärkeren antiviralen Effekt gegenüber hoch pathogenen Influenza A Viren hervorrufen als die Stimulation der Zellen mit rek.chIFN $\alpha$ . Im Gegensatz hierzu hatte die Überexpression der chMx-Isoformen keine Bedeutung im antiviralen Status der Hühnerzellen gegenüber Influenza A Virusinfektionen. Offen bleibt hier also die Frage, wieso mMx1 und huMxA einen Schutz gegenüber Influenza A Viren in Hühnerzellen vermitteln und warum die chMx-Isoformen hierzu nicht in der Lage sind?

Nachdem durch Typ I Interferon eine große Zahl von Genen reguliert wird, ist es denkbar, dass Mx beim Huhn nicht selbst für die antivirale Wirkung verantwortlich ist, sondern in Verbindung mit einem Kofaktor einen antiviralen



Effekt vermittelt. Im Widerspruch hierzu steht aber, dass mMx1 bzw. huMxA alleine in der Lage sind, in HEF einen deutlichen antiviralen Effekt zu vermitteln. Wenn es doch einen solchen Kofaktor gibt, müsste dieser aufgrund der gezeigten mMx1 und huMxA Wirkung auch in Hühnerzellen vorhanden sein. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation des chMx-Proteins im Zytoplasma nicht für die fehlende antivirale Wirkung verantwortlich gemacht werden kann. Das huMxA-Protein, welches eine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren zeigt, ist genau wie das chMx-Protein im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Auch die Stimulation von chIFN $\alpha$  induzierten Faktoren in Kombination mit der Überexpression der chMx-Isoformen führte nicht zu einem antiviralen Effekt gegenüber WSN/33 (H1N1). Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass chMx keine Bedeutung in der Influenza A Virusabwehr in HEF zu kommt.

Anzumerken bleibt jedoch, dass es sich bei den verwendeten *in vitro* Systemen natürlich um artifizielle Systeme handelt, welche nicht das natürliche Bild widerspiegeln, sondern nur ein Modell der sehr komplexen *in vivo* Vorgänge darstellen. Aus diesem Grund war es unabdingbar, die hier erhobenen Daten nochmals *in vivo*, wie bereits auch von Ko et al. empfohlen, auf ihre Richtigkeit hin zu prüfen.

### 6.1.2 Die antivirale Aktivität von chMx *in vivo*

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Erstellung von transgenen Hühnern kein etabliertes Routineverfahren, sodass in dieser Arbeit eine alternative Technik eingesetzt werden musste. Hier bot sich die RCAS-Gentransfertechnologie an. Dieses System bietet die Möglichkeit, Gene von Interesse im Huhn überzuexprimieren [316]. Es ist somit innerhalb kürzester Zeit möglich, retroviral transduzierte Hühner zu erzeugen und Genfunktionen *in vivo* zu untersuchen. Nachdem gezeigt wurde, dass huMxA alleine in der Lage ist, transgene Mäuse ohne Interferonstimulation vor Influenza A Virusinfektionen zu schützen, wurde mithilfe der RCAS-Technologie untersucht, ob ähnliches auch im Huhn möglich ist [179, 180, 317]. Die erhobenen Daten zeigten allerdings, dass 11 Tage alte LSL-Embryonen nicht vor der Infektion mit WSN/33 (H1N1) oder LPAI/84 (H8N4) geschützt waren. Beobachtet wurde nur ein schwacher antiviraler Effekt

von mMx1 und huMxA transduzierten Embryonen gegenüber WSN/33 (H1N1) Infektionen.

Ein Grund für dieses, vom Säugersystem divergierende Ergebnis könnte das verwendete Expressionssystem sein. Während huMxA transgene Mäuse in der Lage sind, huMxA wirklich im gesamten Organismus zu exprimieren, stellt die Expression mithilfe des RCAS-Vektorsystems nur ein Mosaik im Körper dar. Die höchsten Expressionsraten werden hier z.B. im Herz und den Gefäßendothelien erreicht. Da jedoch nicht alle Zellen des Embryos vor dem Virus geschützt sind, kommt es zur Replikation des Influenza A Virus. Hieraus resultiert eine Milieuveränderung im gesamten Ei, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Tod des Embryos trotz der Säuger-Mx-Expression führt. Auch der schwache antivirale mMx1- und huMxA-Effekt, bezogen auf die Virustiter in der Allantois nach der Infektion mit WSN/33 (H1N1), reichte nicht aus, um den Embryo am Leben zu erhalten. Ebenso waren die beiden chMx-Isoformen auch in ihrer natürlichen Umgebung *in vivo* nicht in der Lage, eine antivirale Wirkung zu entfalten. Dies kann im gewählten Versuchsansatz nicht darauf zurückzuführen sein, dass ein Kofaktor, welcher womöglich *in vitro* nicht vorhanden war, fehlt. Nachdem mit WSN/33 (H1N1) ein aus dem Menschen isoliertes Virus gewählt worden war, mussten die Ergebnisse mit einem aus dem Vogel isolierten Virus (LPAI/84 (H8N4)) bestätigt werden.

Erstaunlich war, dass LPAI/84 (H8N4) zu sehr hohen Titern im Ei replizierte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Virus aufgrund seiner geringen Pathogenität anfangs die Wirtszellen infiziert, hier sehr gut repliziert, aber nicht zum Tod dieser Zellen führt. Damit ist das Virus in der Lage, in deutlich mehr Zellen zu replizieren als ein hoch pathogenes Virus mit zytopathischem Effekt. Jedoch wurde auch bei Verwendung dieses niedrig pathogenen aviären Virus kein mMx1 bzw. huMxA und auch kein chMx-Effekt in Bezug auf die Virustiter gesehen. Bei der geringgradigen Virustiterreduktion aller Mx transduzierter Embryonen im Vergleich zu Leervektor transduzierten Embryonen handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen Mx-Protein vermittelten Effekt, sondern um einen Nebeneffekt, welcher auf dem Expressionssystem beruht. Es ist davon auszugehen, dass durch die Zuhilfenahme

des RCAS(BP)A-Vektors eine sehr starke Expressions des Mx-Proteins erreicht werden konnte [315]. Von daher ist denkbar, dass für die Virusreplikation, welche ebenfalls die Proteinbiosynthese-Ressourcen der Zelle benötigt, weniger Synthesekapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche lediglich RCAS(BP)A und damit kein zusätzliches Transgen exprimierte, zur Verfügung stand. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass die Expression von eGFP in Zellen immer zu einer leichten Reduktion der Virustiter führt. Weiterhin musste natürlich auch über die Eignung des RCAS-Systems für diese Experimente nachgedacht werden.

Leider gelang es nicht, die mithilfe des RCAS-Vektorsystems exprimierten Mx-Proteine in den Embryonen nachzuweisen. Es ist hier zum einen möglich, dass der verwendete Antikörper welcher auch in der Immunfluoreszenz-Färbung auf Zellen nur schwache Signale ergab, auf in Paraffin eingebetteten Geweben nicht mehr funktioniert und von daher kein Mx mehr nachgewiesen werden kann. Weiterhin ist denkbar, dass das exprimierte Mx-Protein *in vivo* im Huhn nicht stabil ist und so schnell verstoffwechselt wird, dass es nicht mehr nachweisbar ist. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass auch in diesem Fall verschiedene Mx-Abbaustadien vorliegen müssten und somit detektierbares Mx zu finden sein müsste. Auch möglich, aber eher unwahrscheinlich ist, dass das RCAS(BP)A-System nicht geeignet ist, um dieses nicht lösliche Protein *in vivo* zu exprimieren. Hiergegen spricht, dass in vorherigen Arbeiten eGFP, welches auch nicht löslich und zytoplasmatisch vorliegt, erfolgreich *in vivo* mit RCAS(BP)A in LSL-Embryonen exprimiert wurde [316]. Allerdings weißt eGFP mit einer Halbwertszeit  $\geq 48$  Stunden eine deutlich höhere Stabilität als das Mx-Protein auf. Weiterhin konnten Fekete et al. zeigen, dass in allen Zellen, in welchen p19-Protein exprimiert wird, auch das in den RCAS(BP)A-Vektor inserierte Gen exprimiert wird [318]. Dies lässt den Rückschluss zu, dass exprimiertes Mx-Protein in den Embryonen und hier speziell in den p19 positiven Zellen vorhanden war.

Um trotzdem einen Nachweis der erfolgreichen Transduktion der Embryonen mit den Mx-Konstrukten zu führen, wurde mRNA aus Herzhomogenaten isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression der Mx-Isoformen untersucht.

Der Nachweis von mRNA mittels mMx1 und huMxA spezifischen Primern war ein eindeutiger Beleg dafür, dass die Transduktion der Embryonen erfolgreich war, da mit diesen Primerpaaren auch nur in mMx1 und huMxA transduzierten Embryonen ein Signal zu erhalten war. Auch konnte in chMx transduzierten Embryonen das Transgen eindeutig nachgewiesen werden. Die, für den Nachweis von chMx verwendeten Primer lagen auf zwei verschiedenen Exons, so dass es sich bei dem erhaltenen RT-PCR Produkt aufgrund der Größe nicht um genomische DNA sondern nur um gesplittede mRNA handeln konnte. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass trotz des fehlenden Nachweises des überexprimierten Mx-Proteins in den Embryonen von einer erfolgreichen Transduktion und damit Expression der Mx-Konstrukte gesprochen werden kann.

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob ein retrovirales Vektorsystem, welches auf einem replikationskompetenten Virus basiert für Studien mit Erregern geeignet ist, welche antiviral wirkendes Typ I Interferon induzieren. Bei Stimulation *in vitro* mit hohen Dosen von rek.chIFN $\alpha$  (1000U/ml) zeigte sich jedoch nur eine geringgradig langsamere Infektion der Zellen mit dem RCAS(BP)A-eGFP und eine Beeinträchtigung der Expression des eGFP. Dieser Effekt kann vermutlich darauf zurück geführt werden, dass Zellen, welche mit hohen Dosen (1000U/ml) Typ I Interferon stimuliert werden in ihrem Stoffwechsel inhibiert sind. Es fiel auf, dass diese Zellen schlechter proliferierten und unter dem Lichtmikroskop einen veränderten Phänotyp gegenüber unstimulierten Zellen aufwiesen. Nichts desto trotz war das RCAS(BP)A-eGFP-Virus in der Lage, sich in Zellkultur auszubreiten und eGFP-Expression in den Zellen zu vermitteln. Da in den Embryonen, mit den verwendeten niedrig pathogenen Influenza A Viren zudem keine Interferonkonzentrationen in dieser Höhe erreicht werden, sprach nichts gegen den Einsatz des RCAS(BP)A-Vektorsystems, da mit einer konstanten Expression des Transgens auch während der Virusinfektion gerechnet werden konnte.

Nachdem das RCAS-Vektorsystem, als für diese Untersuchung geeignet befunden wurde, stellte sich die Frage, ob bei dem hier verwendeten *in ovo* System mit Hühnern eines Entwicklungsstadiums gearbeitet wurde, zu welchem das Immunsystem bereits ausgereift genug ist, um sich mit einem Erreger wie

Influenza A auseinanderzusetzen. Allerdings zeigte sich bei der Bestimmung der Interferonwerte in der Allantois nach der WSN/33 (H1N1) Infektion, dass die Embryonen bereits in der Lage waren, Typ I Interferon zu bilden. Von daher kann davon ausgegangen werden, dass das Typ I Interferonsystem bereits ausgebildet war. Des Weiteren fanden die Experimente von Isaacs et al. ebenfalls mit Chorioallantoismembranen von 11 Tage alten Embryonen statt und hier war ein deutlicher Interferoneffekt gegenüber Influenza A Virusinfektionen zu beobachten [81, 82]. Auch finden sich zahlreiche Hinweise in der Literatur, dass die Entwicklung des Immunsystems bereits in einem sehr frühen Embryonalstadium beginnt [319]. Unabhängig vom Entwicklungsstadiums führten Versuche mit adulten Hühnern zu keinem anderen Ergebnis. So infizierten Daviet et al. Hühner mit H5N1 und untersuchten auf mRNA-Ebene die Induktion verschiedener Zytokine. Hierbei fiel auf, dass große Mengen an Mx- und PKR-mRNA zu finden waren, die Hühner aber trotz dieser Expression, von im Säuger als antiviral beschriebenen Proteinen, starben [298]. Andere Studien konnten auf Proteinebene zeigen, dass es auch durch die H5N1-Infektion zu einer massiven Typ I Interferon Produktion *in vivo* kommt und somit auch die Mx- und PKR-Expression erklärt werden kann [320]. Ewald et al. infizierten schließlich Hühner, welche auf den Aminosäurenaustausch an Position 631 typisiert waren. Auch hier vermochte keine der chMx-Isoformen die Hühner vor einem hoch pathogenen Influenza A Virus zu schützen [321]. Entlang dieser Beobachtungen kann also davon ausgegangen werden, dass auch in adulten Hühnern mit einem voll entwickelten Immunsystem chMx nicht in der Lage ist, die Hühner vor einer Influenza A Infektion zu schützen.

## 6.2 Der Knockdown von chMx

Nachdem alle bisherigen Ergebnisse darauf hinweisen, dass chMx keine Bedeutung für die Influenza A Virusabwehr im Huhn hat, aber diese Daten bisher nur durch die Überexpression der chMx-Isoformen erhoben worden sind, wäre es wünschenswert diese Resultate durch einen knock out von chMx zu bestätigen. Im Gegensatz zur Maus ist beim Huhn die knock out Technologie jedoch nicht etabliert. Daher musste, um zu prüfen ob chMx wirklich keine Rolle in der angeborenen antiviralen Immunabwehr spielt, auf ein anderes System

ausgewichen werden. Hierfür wurde das *in vitro* System der RNA *interference* gewählt, mit dessen Hilfe es möglich ist, Gene von Interesse *in vitro* effizient herunterzuregulieren und somit deren Funktion zu untersuchen [322-325]. Ein chMx-Knockdown in Linie 0 HEF konnte zeigen, dass dem chMx-Protein gar keine Bedeutung innerhalb des Typ I Interferon vermittelten Schutz von HEF gegenüber Influenza A Viren zu kommt. Dass der siRNA Ansatz geeignet ist, um die Bedeutung von chMx zu untersuchen konnten Arbeiten im Barramundi, welcher zur Familie der Riesenbarsche gehört, zeigen [326]. Hier gelang es mithilfe eines siRNA vermittelten Mx-Knockdowns die antivirale Wirkung von Mx bei dieser Spezies zu demonstrieren.

### 6.3 Hühner Mx als große GTPase

Wie die vorangegangenen Daten eindeutig belegen, hat das chMx-Protein im Vergleich zu diversen Mx-Proteinen anderer Spezies keine antivirale Aktivität. Dieses Ergebnis gewährt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten. Zum einen ist es möglich, dass dem chMx-Protein an sich eine Funktion fehlt, welche dem Säuger-Mx gegeben ist. Zu denken wäre hier an die, beim Säuger nachgewiesene GTPase-Aktivität, die Fähigkeit zur Oligomerisierung oder die Fähigkeit GTP zu binden [173]. Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung der in HEF exprimierten Mx-Konstrukte zeigt allerdings, dass sowohl mMx1, als auch huMxA transfizierte Zellen immer wieder deutlich hellere, punktförmige Areale aufweisen. Hierbei handelt es sich vermutlich um die oligomerisierte Speicherform des Mx-Proteins. Für die chMx-Konstrukte konnten solche prominenten Areale nie beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass zur Detektion des chMx-Proteins ein kreuzreagierender, monoklonaler Antikörper gegen huMxA verwendet wurde, welcher in der Immunfluoreszenz nicht optimal mit dem chMx-Protein reagiert. Der verwendete monoklonale Antikörper bindet n-terminal im Bereich der ersten 372 Aminosäuren des huMxA-Proteins [222].



**Abb. 38 Bindungsstelle des  $\alpha$ -huMxA Antikörpers**

Modifiziert nach Flohr et al. [222]

Gerade n-terminal finden sich im chMx-Protein die meisten Polymorphismen und eine Region die nur beim Huhn vorkommt. Die Kreuzreaktivität kann allerdings nur damit erklärt werden, dass die drei GTP-Bindungsmotive, welche ebenfalls innerhalb dieser Region liegen, hoch konserviert sind und somit höchstwahrscheinlich die Bindung des Antikörpers ermöglichen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Hühner-Mx nicht in der Lage ist zu oligomerisieren. Dies würde bedeuten, dass diese, für das huMxA beschriebene Speicherform dem chMx fehlt. Für huMxA wurde gezeigt, dass das Protein nur in dieser oligomerisierten Form eine Stabilität von bis zu 24 Stunden aufweist, wohin gegen die Monomere schnell degradiert werden [221]. Hinweise, dass es sich bei chMx um ein Protein handelt, welches unter natürlichen Bedingungen nicht so stabil ist wie die Säuger-Mx-Proteine finden sich bereits in der Literatur. So konnte endogenes chMx-Protein welches durch Typ I Interferonstimulation in CEC32 Wachtelzellen exprimiert wurde, nur schlecht per Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, wohingegen chMx welches mithilfe eines Expressionsvektors in den Zellen im Überschuss exprimiert wurde gut nachgewiesen werden konnte [282]. Der Unterschied liegt hier darin, dass durch Stimulation mit rek.chIFN $\alpha$  nur solange chMx-Protein gebildet wird, wie aktives chIFN $\alpha$  vorhanden ist, wohin gegen bei der Expression über einen Expressionsvektor ständig chMx produziert wird.

Obwohl der Wirkmechanismus der antiviralen Mx-Proteine bis heute nicht vollständig entschlüsselt ist, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass sowohl die GTP-Bindung, als auch die damit verbundene Fähigkeit GTP zu hydrolysieren essenziell für die antivirale Wirkung des Mx-Proteins sind [222, 239]. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob das chMx-Protein GTPase-

Aktivität besitzt oder ob sich aufgrund einer fehlenden Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse erklären lässt, warum chMx nicht antiviral ist. Als problematisch gestaltete sich an dieser Stelle die rekombinante Expression des chMx-Proteins. Zwar war es immer wieder möglich kleine Proteinmengen in prokaryotischen Expressionssystemen zu exprimieren, doch gelang es nie das Protein aufzureinigen, da dieses nicht stabil zu sein schien. Es fand sich hier nach der Aufreinigung nur ein diffuses Bandenmuster aber keine eindeutig abgrenzbare Bande auf Höhe des chMx-Proteins. Im Gegensatz hierzu lässt sich huMxA gut in *E.coli* exprimieren und aufreinigen [218]. Ähnliche Probleme bei der Proteinaufreinigung wurden für mMx1 beschrieben [174, 176]. Mithilfe eines eukaryotischen Expressionssystem gelang es jedoch, chMx-Protein in einer ausreichenden Menge aufzureinigen. Es zeigte sich, dass chMx-Protein die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse besitzt. Verglichen mit der Aktivität vom huMxA-Protein lag die GTPase-Aktivität in etwa um zwei Drittel niedriger.

Für die geringere GTPase-Aktivität im Vergleich zum huMxA sind verschiedene Gründe denkbar. Das im GTPase-Assay eingesetzte huMxA wurde über ein His-Tag aus *E.coli* aufgereinigt. Im Falle des Flag-Tag-chMx wurde das Protein durch eine pH-Wertverschiebung auf pH 3,5 eluiert. Zwar wurde das Eluat sofort auf einen pH-Wert von ungefähr 7,2 neutralisiert, doch ist nicht auszuschließen, dass das Protein durch diese Elutionsmethode GTPase-Aktivität eingebüßt hat. Weiterhin konnten aufgrund des eukaryotischen Expressionssystem nur niedrigere Proteinkonzentrationen als beim Einsatz eines *E.coli* basierten Systems erreicht werden. Aus diesem Grund musste das chMx-Protein im Gegensatz zum huMxA nach erfolgreicher Aufreinigung noch konzentriert werden, wodurch weitere Aktivitätsverluste denkbar sind. Um hier eine abschließende Aussage treffen zu können, ob die GTPase-Aktivität wirklich schwächer ist als die von huMxA, muss huMxA in weiteren Untersuchungen auf dem selben Weg exprimiert und aufgereinigt werden wie dies für das chMx erfolgte.

Nachdem mithilfe des rekombinanten chMx631S gezeigt werden konnte, dass es zur Hydrolyse von GTP durch chMx-Protein kommt, kann davon ausgegangen werden, dass chMx in der Lage ist GTP zu binden. Für huMxA wurde gezeigt, dass es genau durch diese Bindung zur Konformationsänderung im Protein kommt



und hierdurch zum einen die Oligomere entstehen, welche als Speicherform dienen und zum anderen z.B. Virusbestandteile umhüllen [227, 228]. Ähnliche Experimente wurden bisher für chMx nicht durchgeführt. Aber aufgrund der fehlenden Granula in der Immunfluoreszenzaufnahme ist es denkbar, dass eine Oligomerisierung trotz gegebener GTPase-Aktivität nicht möglich ist. Hierfür könnte evtl., die dem Huhn vorbehaltene n-terminale Region, welche zu einer anderen Faltung des chMx-Proteins führen könnte, verantwortlich sein. Eine endgültige Aussage hierzu kann jedoch zurzeit nicht getroffen werden. Die Kristallstruktur der zentralen Interaktionsdomäne und der GTPase-Effektordomäne zeigte, dass diese Regionen essenziell für die Oligomerisierung des huMxA-Proteins sind [327]. Gerade diese Regionen sind jedoch zwischen huMxA und chMx nicht so hoch konserviert wie beispielsweise die drei GTP-Bindungsmotive.

#### **6.4 Worin liegt die Bedeutung von Mx beim Huhn – Ausblick**

Offen bleibt die Frage, warum mMx1 und huMxA in der Lage sind, Mäuse vor der tödlich verlaufenden Krankheit zu bewahren, jedoch in Hühnern dieser Schutzmechanismus nicht greift. Da es sich mit Influenza A um ein Virus handelt, dessen natürlicher Wirt das Geflügel ist, wäre denkbar, dass das Virus durch die extrem schnelle Replikation schneller ist als die wirtseigene Immunabwehr. Dieses Überrennen des wirtseigenen Immunsystems führt zum schnellen Tod des Wirtes. Vor den Zeiten der Massentierhaltung und Globalisierung kam es so zum Tod des Individuums. Nur selten kam es zur Infektion von Artgenossen und der Ausbreitung des tödlichen Virus unter selbigen. Heutige Produktionsbetriebe mit mehreren zehntausend Legehennen bzw. Broilern bieten jedoch beste Bedingungen für die Entstehung und Verbreitung hoch pathogener Virusmutanten. Doch existieren auch Geflügelspezies wie zum Beispiel die Ente aus der Ordnung der Anseriformes, welche sehr gut mit der Influenza A Infektion umgehen können.

Die Ente trägt zwar Influenza A Viren und scheidet diese aus, erkrankt und stirbt jedoch nicht daran [66]. Auch in der Ente wurde Mx gefunden, kloniert und hinsichtlich seiner antiviralen Aktivität untersucht [280]. Das im Zellkern und Zytoplasma lokalisierte Enten-Mx wies dabei keine antivirale Aktivität *in vitro*

gegenüber den getesteten Viren auf. Dies stellt einen weiteren Hinweis darauf dar, dass Mx-Protein in der angeborenen antiviralen Abwehr des Geflügels gegenüber Influenza A Viren keine Rolle spielt. In der Ente konnte im Gegensatz zum Huhn RIG-I beschrieben werden [134]. Es zeigte sich, dass durch die Expression von Enten-RIG-I in DF1 Zellen ein schwacher antiviraler Effekt gegenüber Influenza A Viren herzustellen war. Wie mittlerweile bekannt ist, handelt es sich bei der Erkennung der Virus-RNA durch RIG-I um einen der Hauptmechanismen der Viruserkennung und somit den wichtigsten Weg für die nachfolgende Typ I Interferonproduktion [328]. Zwar kommt es auch bei der Infektion von Hühnern mit Influenza A zu einer massiven Produktion von Typ I Interferon, doch ist es denkbar, dass der Signalweg über RIG-I potenter und schneller zur Interferonproduktion und somit zum Schutz der Enten vor Influenza A Viren führt. Gewiss kann an dieser Stelle jedoch nur gesagt werden, dass Enten ein nicht antivirales Mx-Protein besitzen und im Gegensatz zum Huhn RIG-I als weiterer PRR zu finden ist.

Unabhängig des fehlenden RIG-I im Huhn kann sicher gesagt werden, dass chMx keine antivirale Aktivität gegenüber den hier getesteten Influenza A Viren besitzt. Ni et al. beschrieben aber eine antivirale Wirkung von chMx gegenüber NDV [329]. NDV aus der Familie der Paramyxoviridae gehört der Gruppe der Einzelstrang RNA Viren negativer Polarität an. Bei Hunden konnte gezeigt werden, dass es nach der Infektion mit dem caninen Staupevirus, welches ebenfalls zur Familie der Paramyxoviridae gehört, zu einer Expression von caninem Mx im Gehirn der Tiere kommt [330]. Es ist also durchaus denkbar, dass chMx gegenüber dem geflügelspezifischen NDV eine antivirale Aktivität zeigt, zumal bekannt ist, dass die Infektion mit NDV zu einer starken Typ I Interferoninduktion führt [331]. Auch konnte gezeigt werden, dass es nach der Stimulation von Entenzellen mit NDV, genau wie mit Influenza A Viren, zu einer deutlichen Mx-Expression kommt [280]. Um zu überprüfen ob chMx wirkliche eine antivirale Wirkung gegenüber NDV besitzt, könnte das etablierte RCAS-Vektorsystem zur Überexpression von chMx, *in vitro* und *in vivo* genutzt werden, und die Sensitivität von NDV gegenüber diesem Protein überprüft werden.

Natürlich sollte neben chMx auch an andere Vertreter aus der Gruppe der ISG gedacht werden, welche für die antivirale Wirkung von Typ I Interferon gegenüber Influenza A Viren oder NDV verantwortlich gemacht werden können. So wurde die PKR des Huhnes bereits hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität *in vitro* untersucht und hier in Abhängigkeit eines Polymorphismus auf Aminosäurenebene eine antivirale Aktivität gegenüber VSV beschrieben. Diese Versuche fanden jedoch bisher nur in Maus 3T3 Zellen und mit einem eGFP markierten VSV statt, einem System, dass bei den chMx-Protein-Untersuchungen zu uneinheitlichen Ergebnissen führte [139]. Da die Sequenz für die Hühner-PKR bekannt ist, wäre es auch hier möglich siRNA zu gestalten und einen Knockdown der PKR *in vitro* herbeizuführen und somit die Bedeutung dieses Proteins hinsichtlich des antiviralen Status von Hühnerzellen zu untersuchen. Sollte sich hier eine Bedeutung von PKR zeigen, könnte auch dieses Protein mithilfe der RCAS-Technologie näher charakterisiert werden.

Nicht auszuschließen ist, dass der bisherige Fokus auf die antivirale Aktivität von chMx gar nicht der eigentlichen Bedeutung des Mx-Proteins beim Huhn entspricht. Mx ist ein Gen welches über viele Spezies hinweg hoch konservierte Regionen wie z.B. die GTP-Bindungsmotive besitzt und sogar in Nicht-Wirbeltieren wie den Seeohren gefunden werden kann [253]. So kann auch eine entwicklungsbiologische Aufgabe des chMx-Proteins nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise zeigt sich beim Schaf, dass Mx-Protein während der Trächtigkeit und zwar korrelierend zur Ausschüttung von Interferon  $\tau$  zwischen Trächtigkeitstag 13-20 im trächtigen Uterushorn exprimiert wird [254]. Es ist also auch durchaus vorstellbar, dass Mx nicht nur Aufgaben im Bezug auf die Virusabwehr hat, sondern auch entwicklungsbiologische Funktionen im Rahmen der Embryonalentwicklung besitzt. Erste Hinweise hierfür ergeben sich aus Microarray-Analysen der Hühner Bursa, in welcher noch im Embryonalstadium eine Hochregulation von chMx zu beobachten ist [332]. Um sich der Frage zu nähern, ob chMx eine entwicklungsbiologische Rolle spielt, ist es denkbar, die *in vitro* bereits etablierte siRNA Technologie auf *in vivo* Experimente zu übertragen. So ist es möglich, mithilfe des RCAS-Vektorsystems *short hairpin RNAs*

überzuexprimieren [333, 334] und damit auch *in vivo* einen Knockdown von chMx zu erzeugen. Es ist also vorstellbar ab Embryonaltag 3 chMx im Hühnerembryo herunterzuregulieren und die so entstandenen pseudotransgenen Hühner hinsichtlich ihrer Entwicklung zu untersuchen. Sollte es wirklich gelingen, in diesen Tieren die Mx-Protein Werte nach Interferonstimulation im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu reduzieren, könnte man diese Tiere beispielsweise immunisieren, um zu testen ob eine effiziente Antikörperproduktion noch möglich ist oder ob es durch das fehlende Mx-Protein bzw. die niedrigeren Mx-Protein Werte zu einer Störung in der B-Zell Entwicklung gekommen ist.

In dieser Arbeit konnte in einem reinen Vogelmodell gezeigt werden, dass chMx keine Rolle im antiviralen Geschehen gegenüber Influenza A Viren beim Huhn spielt. Aufgrund dieser Daten macht eine Selektion auf die Aminosäure Asparagin an Aminosäureposition 631 des chMx-Proteins, zur Züchtung Influenza resistenter Hühner, keinen Sinn. Es kann sicher gesagt werden, dass Typ I Interferon Hühnerzellen vor Influenza A Infektionen schützt, aber das interferonstimulierte Gen Mx beim Huhn hierfür keine Rolle spielt. An dieser Stelle muss davon ausgegangen werden, dass chMx andere Aufgaben als die Influenzaabwehr im Huhn inne hat. Es bleibt also zu klären, welche interferonstimulierten Mechanismen für den antiviralen Effekt in Hühnerzellen verantwortlich sind.

## 7 Zusammenfassung

Influenza A Virusinfektionen stellen weltweit eine große Gefahr für die Geflügelpopulationen dar. Bereits im 19ten Jahrhundert wurde das durch Influenza A Viren verursachte Krankheitsbild unter dem Namen „Geflügelpest“ bei Hühnern als tödliche Infektion beschrieben. Das Huhn stellt einen natürlichen Wirt für diese Virusinfektion dar.

In Mausmodellen wurde das *myxovirus resistance* (Mx) Gen beschrieben, welches zur Gruppe der Interferon stimulierten Gene (ISG) gehört. Dieses Protein ist in der Lage Mäuse vor hoch pathogenen Influenza A Virusinfektionen zu schützen. Mx-Proteine sind mittlerweile bei zahlreichen Spezies aus den Familien der Säugetiere, Vögel und Fische beschrieben. Das zu den großen GTPasen gehörende Protein weist bei all diesen Spezies ein dreigeteiltes hoch konserviertes GTP-Bindungsmotiv an seinem N-Terminus und einen Leuzin-Zipper am C-Terminus auf. Für das humane MxA-Protein konnte gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität essenziell für die antivirale Wirkung des Proteins ist.

Auch beim Huhn wurde ein Mx-Protein beschrieben. Das chMx-Gen ist innerhalb der Hühnerpopulation hoch polymorph. Der Polymorphismus an Aminosäureposition 631 (Serin versus Asparagin) soll dem ursprünglich als nicht antiviral beschriebenen Protein eine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren verleihen. In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen chMx-Isoformen mithilfe des RCAS-Vektorsystems sowohl *in vitro* als auch *in vivo* überexprimiert und hinsichtlich ihrer antiviralen Aktivität gegenüber unterschiedlich pathogenen Influenza A Viren untersucht. Weder *in vitro* noch *in vivo* gelang es eine antivirale Aktivität der getesteten chMx-Isoformen gegenüber Influenza A Viren nachzuweisen. Demgegenüber führte die Überexpression von mMx1 und huMxA in primären Hühnerfibroblasten (HEF) zu einem Schutz gegenüber den untersuchten Influenza A Viren. Die Stimulation von Hühnerfibroblastenkulturen mit Typ I Interferon induziert die Expression von chMx sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene und bewirkt die Ausbildung eines antiviralen Status. Ein siRNA vermittelter Knockdown von chMx in Fibroblasten der Hühnerlinie Linie 0 führte allerdings nicht zum Verlust des

Interferon vermittelten antiviralen Status der Zellen. Die genannten *in vitro* Versuche ergaben somit keinen Hinweis darauf, dass dem chMx eine Rolle in der IFN induzierten antiviralen Aktivität zukommt.

Ergänzende Untersuchungen *in vivo* an Hühnerembryonen bestätigten die *in vitro* Befunde. Während die RCAS vermittelte Überexpression von mMx1 zu einer deutlichen Reduktion der Virusreplikation in der Allantois führte beeinflussten beide chMx-Isoformen das Viruswachstum dagegen nicht.

Um die fehlende antivirale Aktivität des chMx-Proteins genauer zu untersuchen, wurde rekombinant hergestelltes und affinitätschromatographisch gereinigtes chMx-Protein hinsichtlich seiner GTPase-Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass auch chMx-Protein, genau wie die Säuger-Mx-Proteine, GTP hydrolysiert. Die fehlende antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren ist somit nicht auf eine fehlende enzymatische Aktivität zurück zu führen.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen gezeigt, dass das Mx-Protein auch im Huhn zu den Interferon stimulierten Genen gehört und eine GTPase-Aktivität aufweist. Im Gegensatz zu den homologen Proteinen der Säuger besitzt chMx aber keine antivirale Aktivität gegenüber Influenza A Viren. Demnach muss die durch Interferon induzierte antivirale Wirkung durch andere, bisher nicht identifizierte Effektormoleküle vermittelt sein.

## 8 Summary

### **The role of Mx protein in the antiviral defence against influenza A virus infection in the chicken.**

Influenza A virus infections are a major threat to the world poultry population. In the 19<sup>th</sup> century fatal influenza A virus infections have been described under the name “fowl plague” in chickens. The chicken is a natural host for this viral infection.

The myxovirus resistance (Mx) gene which belongs to the group of interferon stimulated genes (ISG) was first described in mice. This protein confers protection against highly pathogenic influenza A viruses in mice. Mx proteins have been characterized in many species including mammals, poultry and fish. They belong to the family of large GTPase proteins exhibiting three highly conserved GTP-binding motifs at the amino-terminus and a leucin zipper at the carboxy-terminus. The GTPase activity was been shown to be essential for the antiviral activity of the Mx protein.

Mx was also identified in the chicken, where it shows a significant degree of polymorphism. A polymorphism at aminoacid position 631 (serin versus asparagin) is thought to confer antiviral activity towards influenza A viruses. With the help of the RCAS retroviral vector system these two different chMx isoforms were examined *in vitro* and *in vivo* for their antiviral activity towards various pathogenic influenza A viruses. Neither *in vitro* nor *in vivo* antiviral activity of the chMx isoforms was detectable. In contrast overexpression of murine Mx1 and human MxA in the same form led to protection of the chicken embryo fibroblast cultures against influenza A viruses. Stimulation of chicken embryo fibroblasts with type I interferon induced chMx mRNA and protein expression as well as an antiviral state of the cells. However a chMx knock down mediated by siRNA did not lead to the loss of the antiviral state mediated by type I interferon. In summary, the *in vitro* studies did not provide evidence for a role of chMx in the antiviral state induced by type I interferon.

Additional *in vivo* experiments with chicken embryos confirmed the *in vitro* results. While the RCAS mediated overexpression of murine Mx1 reduced viral titers in the allantoic fluid the overexpression of both chMx isoforms did not.

To further investigate its functional properties chMx was expressed as a recombinant protein and purified by affinity chromatography. Purified chMx was assayed for its GTPase activity and shown to hydrolyze GTP similar to the mammalian Mx proteins. Thus, the lack of antiviral activity towards influenza A viruses can not be explained by a lack of enzymatic activity.

Collectively these studies show that chMx belongs to the interferon stimulated genes and possesses GTPase activity. In contrast to its mammalian homologues the chMx protein does not exhibit antiviral activity towards influenza A viruses. Accordingly, the type I interferon induced antiviral activity must be mediated by other not yet identified effector molecules.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Hoehling, A.A., *The Great Epidemic*. The Great Epidemic. 1961, Boston: LITTLE BROWN & CO. 217.
2. Livius, T., *History of Rome, Vol. 3 by Titus Livius*, ed. G. Baker. Vol. 3. 1823, New York.
3. Knipe, D.M., P.M. Howley, and D.E. Griffin, *Fields Virology*. 2007, Lippincott Williams & Wilkins.
4. Lamb, R.A. and R.M. Krug, *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. Fundamental virology, ed. D.M. Knipe, Howley, P. M. Vol. 4th. 2004: Lippincott-Raven Publishers.
5. McCauley, J.W. and B.W. Mahy, *Structure and function of the influenza virus genome*. Biochem J, 1983. **211**(2): p. 281-94.
6. Klumpp, K., R.W. Ruigrok, and F. Baudin, *Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1248-57.
7. Brown, E.G., *Influenza virus genetics*. Biomed Pharmacother, 2000. **54**(4): p. 196-209.
8. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol Rev, 1992. **56**(1): p. 152-79.
9. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, *Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 591-600.
10. Guilligay, D., et al., *The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(5): p. 500-6.
11. Toyoda, T., et al., *Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: PB1 subunit alone is able to catalyze RNA synthesis*. Virus Genes, 1996. **12**(2): p. 155-63.
12. Kobayashi, M., T. Toyoda, and A. Ishihama, *Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase*. Arch Virol, 1996. **141**(3-4): p. 525-39.
13. Nakagawa, Y., K. Oda, and S. Nakada, *The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6390-4.
14. Daniels, P.S., et al., *The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies*. EMBO J, 1987. **6**(5): p. 1459-65.

15. Gamblin, S.J., et al., *The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1838-42.
16. Portela, A. and P. Digard, *The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 723-34.
17. Gottschalk, A., *Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae*. Biochim Biophys Acta, 1957. **23**(3): p. 645-6.
18. Gottschalk, A., *The influenza virus neuraminidase*. Nature, 1958. **181**(4606): p. 377-8.
19. Schild, G.C. and H.G. Pereira, *Characterization of the ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A viruses by immunodiffusion*. J Gen Virol, 1969. **4**(3): p. 355-63.
20. Oxford, J.S. and G.C. Schild, *Immunological and physicochemical studies of influenza matrix (M) polypeptides*. Virology, 1976. **74**(2): p. 394-402.
21. Lamb, R.A. and P.W. Choppin, *Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus*. Virology, 1981. **112**(2): p. 729-37.
22. Etkind, P.R., et al., *The segments of influenza viral mRNA*. J Virol, 1977. **22**(2): p. 346-52.
23. Inglis, S.C., et al., *The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(8): p. 3790-4.
24. Shaw, M.W., E.W. Lamon, and R.W. Compans, *Immunologic studies on the influenza A virus nonstructural protein NS1*. J Exp Med, 1982. **156**(1): p. 243-54.
25. Greenspan, D., et al., *Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells*. J Virol, 1985. **54**(3): p. 833-43.
26. Klenk, H.D., et al., *Activation of influenza A viruses by trypsin treatment*. Virology, 1975. **68**(2): p. 426-39.
27. Webster, R.G. and R. Rott, *Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin*. Cell, 1987. **50**(5): p. 665-6.
28. White, J., J. Kartenbeck, and A. Helenius, *Membrane fusion activity of influenza virus*. EMBO J, 1982. **1**(2): p. 217-22.
29. Flick, R., et al., *Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure*. RNA, 1996. **2**(10): p. 1046-57.
30. Luo, G. and P. Palese, *Genetic analysis of influenza virus*. Curr Opin Genet

- Dev, 1992. **2**(1): p. 77-81.
31. Shapiro, G.I. and R.M. Krug, *Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer*. J Virol, 1988. **62**(7): p. 2285-90.
  32. Garcia-Sastre, A., et al., *Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems*. Virology, 1998. **252**(2): p. 324-30.
  33. Kochs, G., et al., *Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 12): p. 2990-4.
  34. Nayak, D.P., E.K. Hui, and S. Barman, *Assembly and budding of influenza virus*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 147-65.
  35. Gotoh, B., et al., *An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo*. EMBO J, 1990. **9**(12): p. 4189-95.
  36. Kido, H., et al., *Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13573-9.
  37. Stieneke-Grober, A., et al., *Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2407-14.
  38. Sugiyama, A., et al., *Paradoxical role of Helicobacter pylori infection: protective effect against ethanol-induced gastric mucosal injury in Mongolian gerbils*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(11): p. 2433-9.
  39. Horimoto, T., et al., *Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6074-8.
  40. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, *Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 3120-8.
  41. Kawaoka, Y., C.W. Naeve, and R.G. Webster, *Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin?* Virology, 1984. **139**(2): p. 303-16.
  42. Kawaoka, Y. and R.G. Webster, *Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 324-8.
  43. Johnson, N.P. and J. Mueller, *Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic*. Bull Hist Med, 2002. **76**(1):

- p. 105-15.
44. Reid, A.H. and J.K. Taubenberger, *The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2285-92.
  45. Simonsen, L., et al., *Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution*. J Infect Dis, 1998. **178**(1): p. 53-60.
  46. Kobasa, D., et al., *Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus*. Nature, 2004. **431**(7009): p. 703-7.
  47. Reid, A.H., J.K. Taubenberger, and T.G. Fanning, *Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(11): p. 909-14.
  48. Stevens, J., et al., *Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1866-70.
  49. Cox, N.J. and K. Subbarao, *Global epidemiology of influenza: past and present*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 407-21.
  50. Dawood, F.S., et al., *Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2605-15.
  51. Kawaoka, Y., S. Krauss, and R.G. Webster, *Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics*. J Virol, 1989. **63**(11): p. 4603-8.
  52. Scholtissek, C., et al., *On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2*. Virology, 1978. **87**(1): p. 13-20.
  53. Nakajima, K., U. Desselberger, and P. Palese, *Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950*. Nature, 1978. **274**(5669): p. 334-9.
  54. Beare, A.S. and R.G. Webster, *Replication of avian influenza viruses in humans*. Arch Virol, 1991. **119**(1-2): p. 37-42.
  55. Connor, R.J., et al., *Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates*. Virology, 1994. **205**(1): p. 17-23.
  56. Ito, T. and Y. Kawaoka, *Host-range barrier of influenza A viruses*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 71-5.
  57. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.
  58. Ito, T., et al., *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A*

- viruses with pandemic potential*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7367-73.
59. Claas, E.C., et al., *Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection*. Vaccine, 1998. **16**(9-10): p. 977-8.
60. Claas, E.C., et al., *Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus*. Lancet, 1998. **351**(9101): p. 472-7.
61. Subbarao, K., et al., *Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness*. Science, 1998. **279**(5349): p. 393-6.
62. Matrosovich, M., et al., *The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1146-55.
63. Matrosovich, M.N., et al., *Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4620-4.
64. Perroncito, C., *Typhoid epizootic in gallinaceous birds*. Annali Accademia Agricoltura, 1878. **21**: p. 87-126.
65. Schäfer, W., *Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der klassischen Geflügelpest*. Naturforschung, 1955. **10b**: p. 81-91.
66. Kim, J.K., et al., *Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza*. Influenza Other Respi Viruses, 2009. **3**(4): p. 121-8.
67. Webster, R.G., et al., *Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks*. Virology, 1978. **84**(2): p. 268-78.
68. Werner, O. and T.C. Harder, *Avian Influenza*, in *Influenza Report 2006*, B.S. Kamps, C. Hoffmann, and W. Preisser, Editors. 2006, Flying Publisher. p. 48-86.
69. Alexander, D.J., *A review of avian influenza in different bird species*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 3-13.
70. Alexander, D.J., G. Parsons, and R.J. Manvell, *Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail*. Avian Pathol, 1986. **15**(4): p. 647-62.
71. *Avian influenza H5N1 detected in German poultry and a United Kingdom wild bird*. Euro Surveill, 2006. **11**(4): p. E060406 1.
72. Rinder, M., et al., *Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) into Bavaria, Germany*. J Vet Diagn Invest, 2007. **19**(3): p. 279-82.
73. Alexander, D.J., *Summary of avian influenza activity in Europe, Asia,*

- Africa, and Australasia, 2002-2006*. Avian Dis, 2007. **51**(1 Suppl): p. 161-6.
74. Klopfleisch, R., et al., *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, 2007. **44**(3): p. 261-8.
75. Weber, S., et al., *Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 554-8.
76. Capua, I. and F. Mutinelli, *Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken*, in *A Colour Atlas and Text on Avian Influenza*. 2001, Papi Editore: Bologna. p. 13-20.
77. BMELV, *Verordnung zur Aufstallung des Geflügels zum Schutz vor der Klassischen Geflügelpest*, BMELV, Editor. 2006, Bundesanzeiger: Berlin. p. 2063.
78. Findlay, G.M. and F.O. MacCallum, *Interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1937. **44**(2): p. 19.
79. Hoskins, M., *A Protective Action of Neurotropic Against Viscerotropic Yellow Fever Virus in Macacus Rhesus*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1935. **15**(6): p. 5.
80. Henle, W., *Interference phenomena between animal viruses; a review*. J Immunol, 1950. **64**(3): p. 203-36.
81. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
82. Isaacs, A., J. Lindenmann, and R.C. Valentine, *Virus interference. II. Some properties of interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 268-73.
83. Basler, C.F. and A. Garcia-Sastre, *Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion*. Int Rev Immunol, 2002. **21**(4-5): p. 305-37.
84. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
85. Paul, W.E., *Type I Cytokines and Interferons and Their Receptors*, in *Fundamental Immunology*. 2003, Lippincott Williams & Wilkins. p. 707-749.
86. Bartlett, N.W., et al., *Murine interferon lambdas (type III interferons)*

- exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 6): p. 1589-96.
87. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.* Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 69-77.
88. Vilcek, J., *Novel interferons.* Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 8-9.
89. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Cytokine-mediated control of viral infections.* Virology, 2000. **273**(2): p. 221-7.
90. Uze, G., et al., *The receptor of the type I interferon family.* Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **316**: p. 71-95.
91. Domanski, P. and O.R. Colamonici, *The type-I interferon receptor. The long and short of it.* Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(2): p. 143-51.
92. Liu, Y.J., *IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
93. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons.* Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
94. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 571-611.
95. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways.* Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
96. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.* Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
97. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9577-82.
98. Honey, K., *TLR ligands from the natural world.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 247-247.
99. Bowie, A.G. and L. Unterholzner, *Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 911-22.
100. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology.* Vol. 7. 2008, New York: Garland Science, Taylor&Francis Group. 887.
101. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
102. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein, *The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning.* Cell, 1994. **77**(3): p. 391-400.

103. Schindler, C., et al., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. Science, 1992. **257**(5071): p. 809-13.
104. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
105. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
106. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber, *The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses*. Virology, 2006. **344**(1): p. 119-30.
107. Hovanessian, A.G., *Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2',5'-oligoadenylate synthetases*. J Interferon Res, 1991. **11**(4): p. 199-205.
108. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities*. Virology, 1991. **183**(1): p. 1-11.
109. Carroll, S.S., et al., *Cleavage of oligoribonucleotides by the 2',5'-oligoadenylate-dependent ribonuclease L*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4988-92.
110. Cirino, N.M., et al., *Targeting RNA decay with 2',5' oligoadenylate-antisense in respiratory syncytial virus-infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1937-42.
111. Clemens, M.J. and A. Elia, *The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(9): p. 503-24.
112. Chang, C.H., et al., *The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1)*. Immunogenetics, 1992. **35**(6): p. 378-84.
113. Tamai, T., et al., *Cloning and expression of flatfish (Paralichthys olivaceus) interferon cDNA*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1174**(2): p. 182-6.
114. Ball, L.A., *Induction of 2'5'-oligoadenylate synthetase activity and a new protein by chick interferon*. Virology, 1979. **94**(2): p. 282-96.
115. Kohase, M., et al., *Purification and characterization of chick interferon induced by viruses*. J Gen Virol, 1986. **67** ( Pt 1): p. 215-8.
116. Yoshida, I. and P.I. Marcus, *Interferon induction by viruses. XX. Acid-labile interferon accounts for the antiviral effect induced by poly(rI).poly(rC) in primary chick embryo cells*. J Interferon Res, 1990.



- 10(5): p. 461-8.
117. Krempien, U., I. Redmann, and C. Jungwirth, *Purification of chick interferon by zinc chelate affinity chromatography and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J Interferon Res, 1985. **5**(1): p. 209-14.
118. Sekellick, M.J. and P.I. Marcus, *Induction of high titer chicken interferon*. Methods Enzymol, 1986. **119**: p. 115-25.
119. Weiler, H. and V. Von Bulow, *Detection of different macrophage-activating factor and interferon activities in supernatants of chicken lymphocyte cultures*. Avian Pathol, 1987. **16**(3): p. 439-52.
120. Pusztai, R., B. Tarodi, and I. Beladi, *Production and characterization of interferon induced in chicken leukocytes by concanavalin A*. Acta Virol, 1986. **30**(2): p. 131-6.
121. Moehring, J.M. and W.R. Stinebring, *Examination of "species specificity" of avian interferons*. Nature, 1970. **226**(5243): p. 360-1.
122. Ziegler, R.E. and W.K. Joklik, *Effect of interferon on multiplication of avian sarcoma virus B77 in duck embryo fibroblasts*. J Interferon Res, 1981. **1**(4): p. 521-38.
123. Sekellick, M.J., et al., *Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis*. J Interferon Res, 1994. **14**(2): p. 71-9.
124. Schultz, U., B. Kaspers, and P. Staeheli, *The interferon system of non-mammalian vertebrates*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 499-508.
125. Schultz, U., et al., *Recombinant chicken interferon from Escherichia coli and transfected COS cells is biologically active*. Eur J Biochem, 1995. **229**(1): p. 73-6.
126. Sick, C., U. Schultz, and P. Staeheli, *A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7635-9.
127. Lowenthal, J.W., et al., *Nomenclature of avian interferon proteins*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(7): p. 547-9.
128. Sick, C., et al., *Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9749-54.
129. Song, K.D., et al., *Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma*. Vet Immunol Immunopathol, 1997. **58**(3-4): p. 321-33.
130. Karpala, A.J., et al., *Molecular cloning, expression, and characterization of*

- chicken IFN -lambda*. J Interferon Cytokine Res, 2008. **28**(6): p. 341-50.
131. Iqbal, M., V.J. Philbin, and A.L. Smith, *Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **104**(1-2): p. 117-27.
  132. Philbin, V.J., et al., *Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 507-21.
  133. MacDonald, M. *persönliches Gespräch*. in *Avian immunology research group meeting*. 2008. Brisbane.
  134. Barber, M.R., et al., *Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010.
  135. Reboul, J., et al., *Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster*. Genome Res, 1999. **9**(3): p. 242-50.
  136. Heuss, L.T., et al., *Biological efficacy and signal transduction through STAT proteins of recombinant duck interferon in duck hepatitis B virus infection*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 8): p. 2007-12.
  137. Jungwirth, C., et al., *Chicken interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) and interferon regulatory factor (IRF) 1 genes reveal evolutionary conservation in the IRF gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3105-9.
  138. Zoller, B., et al., *Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(8): p. 711-7.
  139. Ko, J.H., et al., *Characterization of the chicken PKR: polymorphism of the gene and antiviral activity against vesicular stomatitis virus*. Jpn J Vet Res, 2004. **51**(3-4): p. 123-33.
  140. Tatsumi, R., et al., *2',5'-oligoadenylate synthetase gene in chicken: gene structure, distribution of alleles and their expression*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1494**(3): p. 263-8.
  141. Yamamoto, A., et al., *Two types of chicken 2',5'-oligoadenylate synthetase mRNA derived from alleles at a single locus*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1395**(2): p. 181-91.
  142. Lindenmann, J., *Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus*. Virology, 1962. **16**: p. 203-4.
  143. Lindenmann, J., C.A. Lane, and D. Hobson, *The Resistance of A2g Mice to Myxoviruses*. J Immunol, 1963. **90**: p. 942-51.

144. Lindenmann, J., *Inheritance of Resistance to Influenza Virus in Mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1964. **116**: p. 506-9.
145. Lindenmann, J., *Further studies on the resistance of mice to myxoviruses*. Archives of Virology, 1966. **19**(1): p. 12.
146. Haller, O. and J. Lindenmann, *Athymic (nude) mice express gene for myxovirus resistance*. Nature, 1974. **250**(5468): p. 679-80.
147. Haller, O., H. Arnheiter, and J. Lindenmann, *Genetically determined resistance to infection by hepatotropic influenza A virus in mice: effect of immunosuppression*. Infect Immun, 1976. **13**(3): p. 844-54.
148. Horisberger, M.A., P. Staeheli, and O. Haller, *Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(7): p. 1910-4.
149. Haller, O., M. Acklin, and P. Staeheli, *Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies*. J Interferon Res, 1987. **7**(5): p. 647-56.
150. Bang, F.B. and A. Warwick, *Mouse Macrophages as Host Cells for the Mouse Hepatitis Virus and the Genetic Basis of Their Susceptibility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. **46**(8): p. 1065-75.
151. Goodman, G.T. and H. Koprowski, *Macrophages as a cellular expression of inherited natural resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 160-5.
152. Lindenmann, J., et al., *Inborn resistance of mice to myxoviruses: macrophages express phenotype in vitro*. J Exp Med, 1978. **147**(2): p. 531-40.
153. Haller, O., H. Arnheiter, and J. Lindenmann, *Natural, genetically determined resistance toward influenza virus in hemopoietic mouse chimeras. Role of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1979. **150**(1): p. 117-26.
154. Fiske, R.A. and P.A. Klein, *Effect of immunosuppression on the genetic resistance of A2G mice to neurovirulent influenza virus*. Infect Immun, 1975. **11**(3): p. 576-87.
155. Gresser, I., et al., *Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. I. Rapid evolution of encephalomyocarditis virus infection*. J Exp Med, 1976. **144**(5): p. 1305-15.
156. Haller, O., et al., *Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice*. J Exp Med, 1979. **149**(3): p. 601-12.
157. Haller, O., et al., *Virus-specific interferon action. Protection of newborn*

- Mx carriers against lethal infection with influenza virus.* J Exp Med, 1981. **154**(1): p. 199-203.
158. Haller, O., et al., *Interaction between interferon and host genes in antiviral defense.* Ann N Y Acad Sci, 1980. **350**: p. 558-65.
159. Arnheiter, H., O. Haller, and J. Lindenmann, *Host gene influence on interferon action in adult mouse hepatocytes: specificity for influenza virus.* Virology, 1980. **103**(1): p. 11-20.
160. Bazzigher, L., et al., *Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes.* Virology, 1992. **186**(1): p. 154-60.
161. Aebi, M., et al., *cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(11): p. 5062-72.
162. Simon, A., et al., *Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines.* J Virol, 1991. **65**(2): p. 968-71.
163. von Wussow, P., et al., *The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type I interferons.* Eur J Immunol, 1990. **20**(9): p. 2015-9.
164. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber, *Interferon, Mx, and viral countermeasures.* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(5-6): p. 425-33.
165. Staeheli, P., M.A. Horisberger, and O. Haller, *Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma.* Virology, 1984. **132**(2): p. 456-61.
166. Dreiding, P., P. Staeheli, and O. Haller, *Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses.* Virology, 1985. **140**(1): p. 192-6.
167. Staeheli, P., et al., *Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon.* Mol Cell Biol, 1986. **6**(12): p. 4770-4.
168. Staeheli, P., et al., *Interferon-regulated influenza virus resistance gene Mx is localized on mouse chromosome 16.* J Virol, 1986. **58**(3): p. 967-9.
169. Cox, D.R., L.B. Epstein, and C.J. Epstein, *Genes coding for sensitivity to interferon (IfRec) and soluble superoxide dismutase (SOD-1) are linked in mouse and man and map to mouse chromosome 16.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 2168-72.
170. Lin, P.F., et al., *Assignment of the murine interferon sensitivity and cytoplasmic superoxide dismutase genes to chromosome 16.* Science, 1980. **209**(4453): p. 285-7.
171. Horisberger, M.A., et al., *cDNA cloning and assignment to chromosome 21*

- of IFI-78K gene, the human equivalent of murine Mx gene.* Somat Cell Mol Genet, 1988. **14**(2): p. 123-31.
172. Reeves, R.H., et al., *Genetic mapping of the Mx influenza virus resistance gene within the region of mouse chromosome 16 that is homologous to human chromosome 21.* J Virol, 1988. **62**(11): p. 4372-5.
173. Haller, O., S. Stertz, and G. Kochs, *The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins.* Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1636-43.
174. Nakayama, M., et al., *Interferon-inducible mouse Mx1 protein that confers resistance to influenza virus is GTPase.* J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 21404-8.
175. Staeheli, P., F. Pitossi, and J. Pavlovic, *Mx proteins: GTPases with antiviral activity.* Trends Cell Biol, 1993. **3**(8): p. 268-72.
176. Melen, K., et al., *Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper.* J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 25898-907.
177. Schwemmle, M., et al., *Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein.* J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13518-23.
178. Nakayama, M., et al., *Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change.* J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15033-8.
179. Pavlovic, J., et al., *Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein.* J Virol, 1995. **69**(7): p. 4506-10.
180. Arnheiter, H., et al., *Mx transgenic mice--animal models of health.* Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **206**: p. 119-47.
181. Horisberger, M.A., O. Haller, and H. Arnheiter, *Interferon-dependent genetic resistance to influenza virus in mice: virus replication in macrophages is inhibited at an early step.* J Gen Virol, 1980. **50**(1): p. 205-10.
182. Meyer, T. and M.A. Horisberger, *Combined action of mouse alpha and beta interferons in influenza virus-infected macrophages carrying the resistance gene Mx.* J Virol, 1984. **49**(3): p. 709-16.
183. Krug, R.M., et al., *Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product.* J Virol, 1985. **56**(1): p. 201-6.
184. Herz, C., et al., *Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells.* Cell, 1981. **26**(3 Pt 1): p. 391-400.

185. Shapiro, G.I., T. Gurney, Jr., and R.M. Krug, *Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs*. J Virol, 1987. **61**(3): p. 764-73.
186. Broni, B., et al., *Parental influenza virion nucleocapsids are efficiently transported into the nuclei of murine cells expressing the nuclear interferon-induced Mx protein*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 6335-40.
187. Pavlovic, J., O. Haller, and P. Staeheli, *Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2564-9.
188. Staeheli, P. and J. Pavlovic, *Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4498-501.
189. Huang, T., et al., *Overexpression of the influenza virus polymerase can titrate out inhibition by the murine Mx1 protein*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4154-60.
190. Strandén, A.M., P. Staeheli, and J. Pavlovic, *Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus*. Virology, 1993. **197**(2): p. 642-51.
191. Arnheiter, H. and O. Haller, *Antiviral state against influenza virus neutralized by microinjection of antibodies to interferon-induced Mx proteins*. EMBO J, 1988. **7**(5): p. 1315-20.
192. Weitz, G., et al., *Purification and characterization of a human Mx protein*. J Interferon Res, 1989. **9**(6): p. 679-89.
193. Banerjee, A.K., *Transcription and replication of rhabdoviruses*. Microbiol Rev, 1987. **51**(1): p. 66-87.
194. Krug, R.M., *The Influenza Viruses*. 1989, New York: Plenum Publishing Group.
195. Zurcher, T., J. Pavlovic, and P. Staeheli, *Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5059-66.
196. Garber, E.A., et al., *Mutations in murine Mx1: effects on localization and antiviral activity*. Virology, 1993. **194**(2): p. 715-23.
197. Zurcher, T., J. Pavlovic, and P. Staeheli, *Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties*. EMBO J, 1992. **11**(4): p. 1657-61.
198. Noteborn, M., et al., *Transport of the murine Mx protein into the nucleus is dependent on a basic carboxy-terminal sequence*. J Interferon Res, 1987. **7**(5): p. 657-69.

199. Li, G., et al., *The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates.* Mol Biol Evol, 2009.
200. Obar, R.A., et al., *Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins.* Nature, 1990. **347**(6290): p. 256-61.
201. Rothman, J.H., et al., *A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting.* Cell, 1990. **61**(6): p. 1063-74.
202. Chen, M.S., et al., *Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis.* Nature, 1991. **351**(6327): p. 583-6.
203. Jones, B.A. and W.L. Fangman, *Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin.* Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 380-9.
204. van der Blik, A.M. and E.M. Meyerowitz, *Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic.* Nature, 1991. **351**(6325): p. 411-4.
205. Yeh, E., et al., *A dynamin-like protein encoded by the yeast sporulation gene SPO15.* Nature, 1991. **349**(6311): p. 713-5.
206. Obar, R.A., H.S. Shpetner, and R.B. Vallee, *Dynamin: a microtubule-associated GTP-binding protein.* J Cell Sci Suppl, 1991. **14**: p. 143-5.
207. Horisberger, M.A., *Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins.* J Virol, 1992. **66**(8): p. 4705-9.
208. Jurnak, F., *Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins.* Science, 1985. **230**(4721): p. 32-6.
209. McCormick, F., et al., *A model for the tertiary structure of p21, the product of the ras oncogene.* Science, 1985. **230**(4721): p. 78-82.
210. Pai, E.F., et al., *Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation.* Nature, 1989. **341**(6239): p. 209-14.
211. Pitossi, F., et al., *A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins.* J Virol, 1993. **67**(11): p. 6726-32.
212. Rapiejko, P.J. and R. Gilmore, *Protein translocation across the ER requires a functional GTP binding site in the alpha subunit of the signal recognition particle receptor.* J Cell Biol, 1992. **117**(3): p. 493-503.

213. Sigal, I.S., et al., *Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(4): p. 952-6.
214. Wagner, P., et al., *Biochemical properties of the ras-related YPT protein in yeast: a mutational analysis*. EMBO J, 1987. **6**(8): p. 2373-9.
215. Melen, K. and I. Julkunen, *Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP binding core domain is essential for anti-influenza A activity*. Virology, 1994. **205**(1): p. 269-79.
216. Melen, K., et al., *Enzymatic characterization of interferon-induced antiviral GTPases murine Mx1 and human MxA proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2009-15.
217. Toyoda, T., Y. Asano, and A. Ishihama, *Role of GTPase activity of murine Mx1 protein in nuclear localization and anti-influenza virus activity*. J Gen Virol, 1995. **76 ( Pt 7)**: p. 1867-9.
218. Kochs, G., et al., *MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures*. Methods, 1998. **15**(3): p. 255-63.
219. Kochs, G. and O. Haller, *GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae)*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4370-6.
220. Varne, A., et al., *Conformational analysis of the GTP-binding protein MxA using limited proteolysis*. FEBS Lett, 2002. **516**(1-3): p. 129-32.
221. Kochs, G., et al., *Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14172-6.
222. Flohr, F., et al., *The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures*. FEBS Lett, 1999. **463**(1-2): p. 24-8.
223. Ponten, A., et al., *Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 2591-9.
224. Di Paolo, C., et al., *Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32071-8.
225. Schumacher, B. and P. Staeheli, *Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28365-70.
226. Johannes, L., et al., *Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9792-5.



227. Janzen, C., G. Kochs, and O. Haller, *A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 8202-6.
228. Schwemmle, M., et al., *Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein*. Virology, 1995. **206**(1): p. 545-54.
229. Frese, M., et al., *Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3904-9.
230. Kochs, G. and O. Haller, *Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2082-6.
231. *Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Arch Virol Suppl, 1995. **10**: p. 1-586.
232. Griot, C., F. Gonzalez-Scarano, and N. Nathanson, *Molecular determinants of the virulence and infectivity of California serogroup bunyaviruses*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 117-38.
233. Peters, C.J., et al., *Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator*. Antiviral Res, 1986. **6**(5): p. 285-97.
234. Tamura, M., et al., *Effects of human and murine interferons against hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus (Hantaan virus)*. Antiviral Res, 1987. **8**(4): p. 171-8.
235. Frese, M., et al., *Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 915-23.
236. Miura, T.A., et al., *Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with LaCrosse virus replication*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 3001-3.
237. Hefti, H.P., et al., *Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6984-91.
238. Kochs, G., et al., *Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3153-8.
239. Haller, O. and G. Kochs, *Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity*. Traffic, 2002. **3**(10): p. 710-7.
240. Horisberger, M.A. and M.C. Gunst, *Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species*. Virology, 1991. **180**(1): p. 185-90.
241. Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs, *Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses*. Rev Sci Tech, 2009. **28**(1): p. 219-

- 31.
242. Plant, K.P. and R.L. Thune, *Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene*. Fish Shellfish Immunol, 2004. **16**(3): p. 391-405.
243. Trobridge, G.D. and J.A. Leong, *Characterization of a rainbow trout Mx gene*. J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(8): p. 691-702.
244. Robertsen, B., G. Trobridge, and J.A. Leong, *Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)*. Dev Comp Immunol, 1997. **21**(5): p. 397-412.
245. Lee, J.Y., I. Hirono, and T. Aoki, *Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus**. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(4): p. 407-15.
246. Jensen, V. and B. Robertsen, *Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(8): p. 701-10.
247. Yap, W.H., et al., *Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter*. Immunogenetics, 2003. **54**(10): p. 705-13.
248. Tafalla, C., et al., *Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA*. Fish Shellfish Immunol, 2004. **16**(1): p. 11-24.
249. Altmann, S.M., et al., *Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio**. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(4): p. 295-306.
250. Staeheli, P., et al., *A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 3117-21.
251. Larsen, R., T.P. Rokenes, and B. Robertsen, *Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 7938-44.
252. Caipang, C.M., I. Hirono, and T. Aoki, *In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx*. Virology, 2003. **317**(2): p. 373-82.
253. De Zoysa, M., et al., *First report of invertebrate Mx: cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*)*. Fish Shellfish Immunol, 2007. **23**(1): p. 86-96.
254. Charleston, B. and H.J. Stewart, *An interferon-induced Mx protein: cDNA*

- sequence and high-level expression in the endometrium of pregnant sheep.* Gene, 1993. **137**(2): p. 327-31.
255. Ellinwood, N.M., et al., *Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (Bos taurus) Mx protein.* J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(9): p. 745-55.
256. Muller-Doblies, D., M. Ackermann, and A. Metzler, *In vitro and in vivo detection of Mx gene products in bovine cells following stimulation with alpha/beta interferon and viruses.* Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1192-9.
257. Muller, M. and G. Brem, *Interferon-Inducible murine Mx homologs in swine.* Biotechnologia Aplicada, 1990. **7**(2): p. 6.
258. Muller, M., E.L. Winnacker, and G. Brem, *Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins.* J Interferon Res, 1992. **12**(2): p. 119-29.
259. Jung, K. and C. Chae, *Expression of Mx protein and interferon-alpha in pigs experimentally infected with swine influenza virus.* Vet Pathol, 2006. **43**(2): p. 161-7.
260. Rettenberger, G., et al., *Assignment of 19 porcine type I loci by somatic cell hybrid analysis detects new regions of conserved synteny between human and pig.* Mamm Genome, 1996. **7**(4): p. 275-9.
261. Horisberger, M.A., *Virus-specific effects of recombinant porcine interferon-gamma and the induction of Mx proteins in pig cells.* J Interferon Res, 1992. **12**(6): p. 439-44.
262. Zhang, X., et al., *Molecular responses of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.* Virology, 1999. **262**(1): p. 152-62.
263. Morozumi, T., et al., *Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene.* Biochem Genet, 2001. **39**(7-8): p. 251-60.
264. Asano, A., et al., *Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein.* J Vet Med Sci, 2002. **64**(12): p. 1085-9.
265. Palm, M., et al., *Differential anti-influenza activity among allelic variants at the Sus scrofa Mx1 locus.* J Interferon Cytokine Res, 2007. **27**(2): p. 147-55.
266. Staeheli, P., et al., *Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus.* Cell, 1986. **44**(1): p. 147-58.
267. Staeheli, P., et al., *Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a*

- large deletion or a nonsense mutation.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4518-23.
268. Kalderon, D., et al., *A short amino acid sequence able to specify nuclear location.* Cell, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 499-509.
269. Garber, E.A., et al., *Avian cells expressing the murine Mx1 protein are resistant to influenza virus infection.* Virology, 1991. **180**(2): p. 754-62.
270. Staeheli, P. and J.G. Sutcliffe, *Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4524-8.
271. Zurcher, T., J. Pavlovic, and P. Staeheli, *Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus.* Virology, 1992. **187**(2): p. 796-800.
272. Jin, H.K., et al., *Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus.* J Virol, 1999. **73**(6): p. 4925-30.
273. Jin, H.K., et al., *Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication.* Arch Virol, 2001. **146**(1): p. 41-9.
274. Gupta, S.L., B.Y. Rubin, and S.L. Holmes, *Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 4817-21.
275. Rubin, B.Y. and S.L. Gupta, *Interferon-induced proteins in human fibroblasts and development of the antiviral state.* J Virol, 1980. **34**(2): p. 446-54.
276. Staeheli, P. and O. Haller, *Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice.* Mol Cell Biol, 1985. **5**(8): p. 2150-3.
277. Horisberger, M.A. and H.K. Hochkeppel, *IFN-alpha induced human 78 kD protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effect of IFN-gamma.* J Interferon Res, 1987. **7**(4): p. 331-43.
278. Pavlovic, J. and P. Staeheli, *The antiviral potentials of Mx proteins.* J Interferon Res, 1991. **11**(4): p. 215-9.
279. Hinshaw, V.S., et al., *The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1980. **3**(1-2): p. 155-64.
280. Bazzigher, L., A. Schwarz, and P. Staeheli, *No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein.* Virology, 1993. **195**(1): p. 100-12.

281. Schumacher, B., et al., *The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells*. Virology, 1994. **203**(1): p. 144-8.
282. Bernasconi, D., U. Schultz, and P. Staeheli, *The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity*. J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(1): p. 47-53.
283. Wang, X., et al., *Transcriptome of local innate and adaptive immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection*. Viral Immunol, 2006. **19**(4): p. 768-74.
284. Wong, G.K., et al., *A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 717-22.
285. Berlin, S., et al., *Positive diversifying selection in avian Mx genes*. Immunogenetics, 2008. **60**(11): p. 689-97.
286. Hou, Z.C., et al., *Purifying selection and positive selection on the myxovirus resistance gene in mammals and chickens*. Gene, 2007. **396**(1): p. 188-95.
287. Ko, J.H., et al., *Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 595-601.
288. Balkissoon, D., et al., *Low frequency of the Mx allele for viral resistance predates recent intensive selection in domestic chickens*. Immunogenetics, 2007. **59**(8): p. 687-91.
289. Li, X.Y., et al., *Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations*. Poult Sci, 2006. **85**(7): p. 1327-9.
290. Sewalem, A., et al., *Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six, and nine weeks of age in a broiler layer cross*. Poult Sci, 2002. **81**(12): p. 1775-81.
291. Tatsuda, K. and K. Fujinaka, *Genetic mapping of the QTL affecting body weight in chickens using a F2 family*. Br Poult Sci, 2001. **42**(3): p. 333-7.
292. Wright, D., et al., *Quantitative trait loci analysis of egg and meat production traits in a red junglefowlxWhite Leghorn cross*. Anim Genet, 2006. **37**(6): p. 529-34.
293. Hillel, J., et al., *Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools*. Genet Sel Evol, 2003. **35**(5): p. 533-57.
294. Seyama, T., et al., *Population research of genetic polymorphism at amino acid position 631 in chicken Mx protein with differential antiviral activity*. Biochem Genet, 2006. **44**(9-10): p. 437-48.

295. Livant, E.J., et al., *MXI exon 13 polymorphisms in broiler breeder chickens and associations with commercial traits*. Anim Genet, 2007. **38**(2): p. 177-9.
296. Ko, J.H., et al., *Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631*. Anim Genet, 2004. **35**(2): p. 119-22.
297. Benfield, C.T., et al., *Asparagine 631 variants of the chicken Mx protein do not inhibit influenza virus replication in primary chicken embryo fibroblasts or in vitro surrogate assays*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7533-9.
298. Daviet, S., et al., *Induction of Mx and PKR failed to protect chickens from H5N1 infection*. Viral Immunol, 2009. **22**(6): p. 467-72.
299. Zur Hausen, H., *Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells*. J Virol, 1967. **1**(6): p. 1174-85.
300. Shein, H.M. and J.F. Enders, *Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1164-72.
301. Shein, H.M., J.F. Enders, and J.D. Levinthal, *Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1350-7.
302. Gaush, C.R., W.L. Hard, and T.F. Smith, *Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1966. **122**(3): p. 931-5.
303. Macfarlane, D.E. and R.G. Sommerville, *VERO cells (Cercopithecus aethiops kidney)--growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. (Brief report)*. Arch Gesamte Virusforsch, 1969. **27**(2): p. 379-85.
304. Emeny, J.M. and M.J. Morgan, *Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production*. J Gen Virol, 1979. **43**(1): p. 247-52.
305. Diaz, M.O., et al., *Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5259-63.
306. Kaaden, O.R., S. Lange, and B. Stiburek, *Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32*. In Vitro, 1982. **18**(10): p. 827-34.
307. Foster, D.N. and L.K. Foster, *Immortalized cell lines for virus growth*, R.o.t.U.o. Minnesota, Editor. 1997: United States of America.

308. Himly, M., et al., *The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses*. Virology, 1998. **248**(2): p. 295-304.
309. Dijkmans, R., et al., *Interferon-gamma is cytotoxic for normal mouse fibroblasts: enhancement by tumor necrosis factor and interleukin 1*. Lymphokine Res, 1989. **8**(1): p. 25-34.
310. Schwarz, H., et al., *Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(3): p. 179-84.
311. *National Center for Biotechnology Information*. 2010, U.S. National Library of Medicine
312. Richter, M.F., et al., *Interferon-induced MxA protein. GTP binding and GTP hydrolysis properties*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13512-7.
313. McGrew, M.J., et al., *Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 728-33.
314. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. Nature, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
315. Hughes, S.H., *The RCAS vector system*. Folia Biol (Praha), 2004. **50**(3-4): p. 107-19.
316. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Mol Immunol, 2010.
317. Arnheiter, H., et al., *Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus*. Cell, 1990. **62**(1): p. 51-61.
318. Fekete, D.M. and C.L. Cepko, *Replication-competent retroviral vectors encoding alkaline phosphatase reveal spatial restriction of viral gene expression/transduction in the chick embryo*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 2604-13.
319. Sharma, J.M. and I. Tizard, *Avian cellular immune effector mechanisms--a review*. Avian Pathol, 1984. **13**(3): p. 357-76.
320. Krohmann, C., *Der Einfluss des Interferonsystems bei der Infektion mit aviärer Influenza im Haushuhn*, in *Institut für Tierphysiologie*. 2010, Ludwig Maximilians Universität München: München; . p. 140.
321. Ewald, S.J., in *Avian Immunology Research Group meeting*. 2008, Sandra J Ewald: Brisbane.
322. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 343-9.

323. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
324. Tijsterman, M., R.F. Ketting, and R.H. Plasterk, *The genetics of RNA silencing*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 489-519.
325. Ullu, E., C. Tschudi, and T. Chakraborty, *RNA interference in protozoan parasites*. Cell Microbiol, 2004. **6**(6): p. 509-19.
326. Wu, Y.C., Y.F. Lu, and S.C. Chi, *Anti-viral mechanism of barramundi Mx against betanodavirus involves the inhibition of viral RNA synthesis through the interference of RdRp*. Fish Shellfish Immunol, 2009.
327. von der Malsburg, A., et al., *Structural insights in the antiviral MxA protein: Importance of MxA oligomerization for its function*. Cytokine, 2009. **48**(1-2): p. 84-84.
328. Rehwinkel, J., et al., *RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection*. Cell. **140**(3): p. 397-408.
329. Ni, L., et al., *[Mutagenesis modified of Mx gene from chicken and identification of its antiviral specificity]*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2008. **48**(6): p. 785-9.
330. Janik, D., *Expression von Mx im Gehirn von Hunden nach Infektion mit dem caninen Staupevirus*. 2009: München.
331. Marcus, P.I., C. Svitlik, and M.J. Sekellick, *Interferon induction by viruses. X. A model for interferon induction by Newcastle disease virus*. J Gen Virol, 1983. **64** (Pt 11): p. 2419-31.
332. Schmieder, S., *Persönliches Gespräch "Analyse des Transkriptoms der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten"*. 2010, Institut für Tierphysiologie: München.
333. Harpavat, S. and C.L. Cepko, *RCAS-RNAi: a loss-of-function method for the developing chick retina*. BMC Dev Biol, 2006. **6**: p. 2.
334. Mayr, U., et al., *RCAS-mediated retroviral gene delivery: a versatile tool for the study of gene function in a mouse model of pancreatic cancer*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(9): p. 896-906.



## 10 Anhang

### A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- 1 Charles River, Wilmington,/USA
- 2 Applichem, Darmstadt
- 3 Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
- 4 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- 5 Biochrom, Berlin
- 6 PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
- 7 Macherey-Nagel, Düren
- 8 Fermentas, St. Leon-Rot
- 9 Promega, Mannheim
- 10 Stratagene, La Jolla/USA
- 11 Solis BioDyne, Tartur/Estland
- 12 Qiagen, Hilden
- 13 Roche, Mannheim
- 14 PerkinElmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau
- 15 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 16 IMCD Deutschland GmbH, Köln
- 17 Linaris, Wertheim-Bettingen
- 18 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket/UK
- 19 Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
- 20 Carl Roth, Karlsruhe
- 21 Schleicher und Schull, Dassel
- 22 Ernst Christiansen GmbH, Planegg
- 23 GE Healthcare, Freiburg
- 24 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- 25 SouthernBiotech, Birmingham/USA
- 26 neoLab, Heidelberg
- 27 medite, Burgdorf
- 28 Hybridoma Bank of Iowa, University of Iowa, USA
- 29 Millipore, Billerica, USA

**B Geräte in alphabetischer Reihenfolge**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe	HLC, AF204	Heaep Labor Consult, Bovenden
Bakterienbrutschrank	Mini Inkubator	Labnet, Woodbrige, USA
Brüter	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Brutschrank	MCO-5AC	Sanyo, München
Durchflusszytometer	FACS Calibur Software: CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Gel Dokumentation	Image Quant 300 Software: Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, München
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Mikroskop	Leica DMIL Kamera: DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikroskop	Axiovision Kamera: Axioacam MRc5	Zeiss, Jena
Mikroskop	Axiovert 25 HBO-50/AC	Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Peristaltische Pumpe	Perstaltic Pump P-1	GE Healthcare, Garching
Platten Luminometer	GloMax®	Promega, Mannheim
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Plattenschüttler	WT17	Biometra, Göttingen
Power-Supply	Power Pac 300	BioRad, München
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Rotationsmikrotom	HM360	Microm, Walldorf
Schleifwerkzeug	Dremel MultiPro	Dremel, Leinfelden-Echterdingen
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gießkammer	Mini Potean III	BioRad, München
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS12	Heraeus Instruments, München
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
TankBlotter	Criterion Blotter	BioRad, München
Thermocycler	MJ Mini	BioRad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers und Frau Dr. Sonja Kothlow, die diese Arbeit betreuten. Sie halfen mir stets bei Problemen jeglicher Art, nahmen sich immer viel Zeit den Fortgang dieses Projektes zu besprechen und dies vor allem auch weit über die normalen Arbeitszeiten hinaus.

Durch diese exzellente Betreuung, das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und vor allem das reizvolle Gebiet der Immunologie, habe ich sehr viel Neues gelernt und ein sehr spannendes Arbeitsgebiet entdeckt.

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger bedanke ich mich herzlich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz

Für die Möglichkeit mit niedrig pathogenen Influenza Viren zu arbeiten danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter, Herrn Dr. Werner Eichhorn und Frau Bärbel Kötting vom Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Lehrstuhl Virologie, Tierärztliche Fakultät München.

Für die Zusammenarbeit und die Gelegenheit die Infektionsexperimente mit hoch pathogenen Viren durchzuführen, danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Staeheli, Frau Antje Reuter und Frau Nicola Penski vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Georg Kochs und Herrn Alexander von der Malsburg vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg, für die Hilfe beim GTPase-Assay danken.

Bei allen meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Kaspers möchte ich mich für die nette Atmosphäre und jegliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Frau Ingrid Riehl und Frau Marina Kohn danke ich hier besonders für die Hilfe bei manch einem Western Blot.

Ein großer Dank geht an meine Mitdoktoranden: Ute Breithaupt, Carsten Krohmann, Magdalena Schumacher, Stefan Schmieder, Susanne Hainke und Julia Korte.

Besonders Danken möchte ich hier auch Frau Katharina Schenk-Weibhauser welche über zwei Jahre Rücken an Rücken mit mir arbeitete. Danke für die konstruktive Kritik, deine Hilfe und vor allem viele lustige Stunden im Labor.

Ute, Carsten, Susi, Stefan, Kathrin und Julia vielen Dank, dass ihr das Projekt VetDocs mit mir gestartet habt und es zu so einem Erfolg gemacht habt. In diesem Zusammenhang auch nochmals Danke an Prof. Dr. Bernd Kaspers und Dr. Sonja Kothlow für die Unterstützung der VetDocs München e.V..

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, welche mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben, mich immer unterstützt haben und mir allzeit eine große Stütze waren.

Abschließend möchte ich mich noch bei Susanne Hainke bedanken, die mir immer Rückhalt gegeben hat, mich aufgemuntert hat, ein offenes Ohr für alle Probleme hatte und vor allem immer für mich da war. Danke!!