

Aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum der Philipps-Universität
Marburg

Institut für Virologie

Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

Adaption aviärer Influenzaviren vom Subtyp H5N1 an die Maus durch Mutationen in der Viruspolymerase



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Volker Czudai-Matwich, geb. Czudai

aus Frankfurt am Main

Marburg, Lahn 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 17.08.2012

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

1. Korreferent: Prof. Dr. Alexander Brehm

Für meine Familie

1 Einleitung	8
1.1 Allgemeine Biologie der Influenza-A-Viren.....	8
1.1.1 Taxonomie	8
1.1.2 Morphologie	9
1.1.3 Genomaufbau	10
1.2 Die virale Polymerase	12
1.2.1 Die Struktur des NP-Polymerase-Komplexes	12
1.2.2 Das Nukleoprotein NP	14
1.2.3 Das saure Polymeraseprotein PA.....	16
1.2.4 Das basische Polymeraseprotein PB2.....	18
1.2.5 Das basische Polymeraseprotein PB1.....	21
1.3 Replikationszyklus	22
1.3.1 Rezeptorvermittelte Endozytose.....	23
1.3.2 Membranfusion und Uncoating.....	23
1.3.3 RNA-Synthese	24
1.3.3.1 Transkription	24
1.3.3.2 Replikation	25
1.3.4 Translation viraler Gene	28
1.3.5 Virusreifung.....	29
1.4 Epidemiologie	29
1.4.1 Niedrigpathogene aviäre Influenza Viren.....	29
1.4.2 Hochpathogene aviäre Influenza Viren.....	31
1.4.3 Humane Influenza	34
1.4.3.1 Pathogenese der humanen Influenza.....	34
1.4.3.2 Epidemische und pandemische Influenza.....	35
1.4.3.4 HPAIV Infektionen beim Menschen	36
1.5 Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität.....	37
1.5.1 Die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase	37
1.5.1.1 Hämagglutinin	37
1.5.1.2 Neuraminidase	38
1.5.2 Die virale Polymerase	39
1.6 Fragestellung der Arbeit.....	40
1.6.1 Grundlage	40
1.6.2 Das Virus A/Thailand/1 (Kan-1)/04 (H5N1).....	40
1.6.3 Zielsetzung.....	41
2 Material	42
2.1 Chemikalien	42
2.2 Kits.....	43
2.3 Enzyme.....	44

2.4 Plasmide	44
2.5 Medien	45
2.5.1 Eukaryotische Zellen	45
2.5.2 Prokaryotische Zellen	45
2.6 Prokaryotische und Eukaryotische Zellen	46
2.7 Puffer und Lösungen.....	46
2.8 Primer	48
2.9 Geräte.....	49
3 Methoden	51
3.1 Molekularbiologische Methoden	51
3.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	51
3.1.2 Transformation	52
3.1.3 Plasmidpräparation	52
3.1.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	54
3.1.5 Sequenzierung viraler Gene.....	54
3.1.6 Sequenzierung von DNA.....	57
3.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	58
3.1.8 Zielgerichtete Mutagenese	58
3.1.9 Klonierung.....	60
3.1.10 Western-Blot	62
3.1.11 Mini-Replikon-Assay zur Bestimmung der Polymeraseaktivität.....	64
3.2 Virologische Methoden	67
3.2.1 HA-Titer Bestimmung	67
3.2.2 Bestimmung des Virustiters mittels Plaquetest	68
3.2.2.1 Plaquetest mit Kristallviolett.....	68
3.2.2.2 Immunhistochemische Anfärbung infizierter Zellen.....	69
3.2.3 Reverse Genetik von Influenza-A-Viren.....	71
3.2.3.1 Transfektion HEK293T-Zellen	71
3.2.3.2 Infektion von MDCK-Zellen.....	72
3.2.4 Plaque-Aufreinigung.....	72
3.2.5 Wachstumskurven.....	73
3.2.6 Wachstumskurven auf humanen tracheo-bronchialen Epithel-Zellen.....	74
3.3 Zellkultur	75
3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	75
3.3.2 Haltung differenzierter humaner tracheobronchealer Epithel-Zellen	76
3.3.3 Lagerung von Zellen.....	76
3.4 Tierversuche	77
3.4.1 Narkose und Infektion von Balb/c Mäusen	77
3.4.2 Bestimmung der MTZ.....	78

3.4.3 Töten der Mäuse und Organentnahme.....	78
3.4.4 Herstellung von Organhomogenisaten	78
4 Ergebnisse.....	79
4.0 Zielgerichtete Mutagenese der PB2-Untereinheit	79
4.1 in vitro Bestimmung der Aktivität der viralen Polymerase	80
4.1.1 Polymerase-Aktivität in Säugerzellen	80
4.1.1.1 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in HEK293T Zellen	80
4.1.1.2 Polymerase-Aktivität von A/Goose/Guangdong/1/96 in HEK293T Zellen	83
4.1.2 Polymerase-Aktivität in Vogelzellen.....	84
4.1.2.1 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in LMH Zellen.....	84
4.1.2.2 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in QT6 Zellen	85
4.2 Wachstumsverhalten der Virusmutanten in Zellen aus Vögeln und Säugern	87
4.2.1 Herstellung rekombinanter Viren mittels reverser Genetik	87
4.2.2 Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren in Säugerzellen	89
4.2.2.1 Vergleich der Plaquegrößen.....	89
4.2.2.2 Wachstumsverhalten von rKan1 auf MDCKII Zellen	91
4.2.2.3 Wachstumsverhalten von rKan1 auf A549-Zellen	94
4.2.2.4 Wachstumsverhalten von rKan1 auf Zellen aus dem humanen Atemwegsepithel.....	96
4.2.3 Wachstumsverhalten rekombinanter Viren in aviären Zellen	101
4.2.3.1 Wachstumsverhalten von rKan1 auf LMH-Zellen.....	101
4.2.3.2 Wachstumsverhalten von rKan1 auf QT6 Zellen.....	103
4.3 Pathogenität der rKan1-Mutanten für die Maus	104
4.3.1 Bestimmung der Infektionsdosis.....	104
4.3.2 Infektion 4-8 Wochen alter Balb/c Mäuse mit rekombinanten A/Thailand/1(Kan-1)/04 Viren	104
4.3.2.1 Virustiter in den Organen infizierter Mäuse.....	106
5 Diskussion	109
5.1 Die adaptive Mutation PB2 D701N	110
5.1.1 Einfluss der Mutation PB2 D701N in Zellkultur	110
5.1.2 Auswirkung der Mutation PB2 D701N auf die Virusreplikation.....	113
5.1.3 Auswirkung der Mutation PB2 D701N in aviären Zellen	116
5.1.4 Auswirkung der Mutation PB2 D701N auf die Pathogenität in Mäusen	117
5.1.5 Selektionsdruck auf die aviär-typischen Viren rKan1 PB2 701D.....	118
5.2 Einfluss der Mutationen PB2 S714I und S714R	119
5.2.1 Einfluss der Mutationen PB2 S714I und S714R in Zellkultur	121
5.2.2 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Virusreplikation in Säugerzellen	123

5.2.3 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Virus- replikation in Vogelzellen.....	125
5.2.3 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Pathogenität in der Maus	126
5.3 Schlussfolgerungen	129
5.4 HPAIV des Subtyps H5N1 im Menschen – ein Ausblick	131
6.1 Zusammenfassung.....	138
6.2 Summary	139
7 Literaturverzeichnis	140
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	152
9. Appendix.....	154

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Biologie der Influenza-A-Viren

1.1.1 Taxonomie

Influenza-A-Viren bilden zusammen mit den Influenza-B-, Influenza-C-, Thogoto- und Isa-Viren die Familie der Orthomyxoviridae. Alle Genera dieser Familie besitzen ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung. In der folgenden Tabelle sind die fünf Gattungen der Virusfamilie mit Beispielen für bekannte Wirte aufgeführt:

Genus	Wirtsspezies
Influenza-A-Virus	Mensch, Schwein, Ente, Huhn, Pute, Pferd
Influenza-B-Virus	Mensch, (Robbe)
Influenza-C-Virus	Mensch, Schwein
Thogotovirus	Schaf, Rind, Ziege, Nagetiere
Isavirus	Lachs

Tab. 1.1 die fünf Genera der Familie Orthomyxoviridae mit Beispielen für Wirtsspezies. Übernommen und modifiziert aus „Molekulare Virologie“, S. Modrow, 2. Aufl. 2003.

Das Genom der Influenza-A- und B-Viren ist aus acht, das der Influenza-C-Viren dagegen aus nur sieben Gensegmenten aufgebaut. Während A- und B-Viren zwei separate Oberflächenglykoproteine, Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), auf zwei Gensegmenten (Segmente 4 (HA) und 6 (NA)) kodieren, tragen Influenza-C-Viren nur das auf Segment 4 kodierte Hämagglutinin-Esterase-Funktionsprotein (HEF) auf der Oberfläche. Das HA ist für Rezeptorbindung (Adsorption) und Membranfusion verantwortlich, die NA ermöglicht neu gebildeten Viren die Ablösung von der Zellmembran durch Hydrolyse endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren. Bei Influenza-C-Viren übernimmt das HEF alle drei Aufgaben.

Influenza-A-Viren werden auf serologischer Ebene in 16 unterschiedliche HA, und 9 NA Subtypen (HA1-16 und NA1-9) eingeteilt. Von einem neuen Subtyp spricht man dann, wenn sich die Aminosäuresequenz um mehr als 30% von den bekannten Subtypen unterscheidet und es zu keiner Kreuzimmunität kommt. Um die Zuordnung und Charakterisierung der Viren zu vereinheitlichen, hat die Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) 1980 eine standardisierte Nomenklatur für alle Influenza-Viren eingeführt: Zuerst erfolgt die Nennung des Genus (A, B oder C),

dann die Spezies aus welcher das Virus isoliert wurde, gefolgt vom Ort der Isolation, der Isolat-Nummer, dem Jahr der Isolation und dem Subtyp. Das in dieser Arbeit verwendete Isolat z.B. heißt demnach: A/Thailand/1(Kan-1)/04 (H5N1). Die Nennung der Spezies entfällt, wie in diesem Fall, wenn das Isolat aus dem Menschen stammt.

1.1.2 Morphologie

Man unterscheidet bei Influenza-A-Viren zwei grundsätzliche Partikeltypen: sphärische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 120nm, sowie filamentöse die mehrere μm lang sein können. Zwei Aminosäuren (R95 und E204) im viralen Matrix-Protein 1 sind primär für die Ausbildung sphärischer oder filamentöser Partikel verantwortlich (Bourmakina and Garcia-Sastre, 2003). In der schematischen Darstellung (Abb. 1.1 A) ist ein sphärisches Partikel abgebildet:

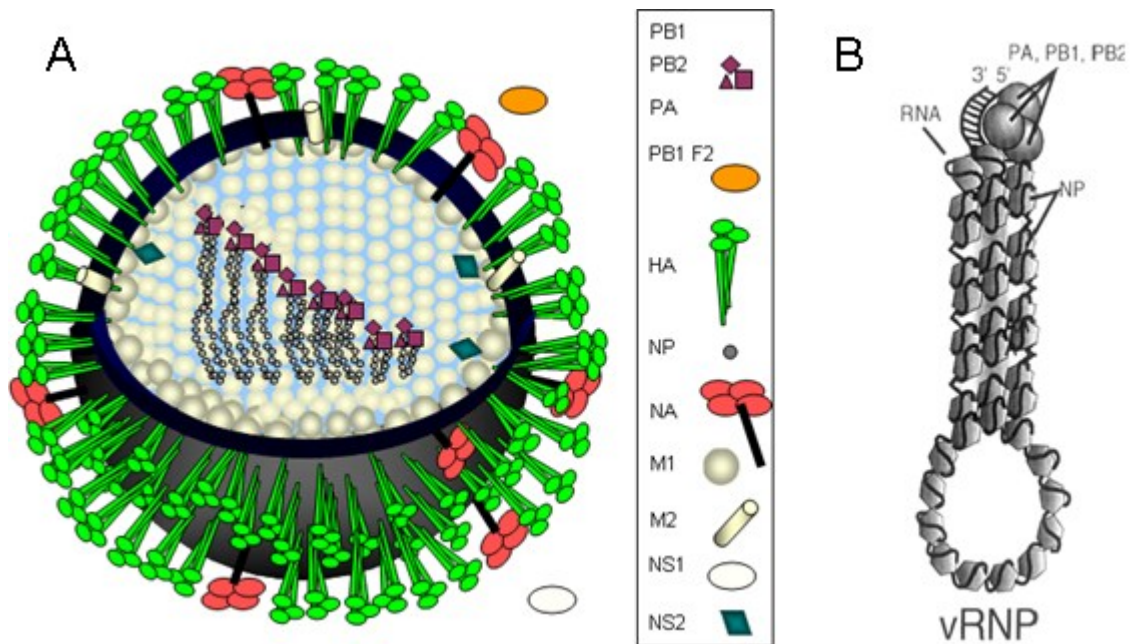


Abb. 1.1 (A) Graphische Darstellung eines sphärischen Influenza-A-Partikels (nach Klenk, 2005). Die Oberflächenproteine HA (grün) und NA (rot) liegen zusammen mit dem Ionenkanal M2 (weiß) in der viralen Hüllmembran (grau) eingelagert vor, das Innere ist mit dem Matrixprotein M1 ausgekleidet, an das die acht vRNP assoziiert sind. Die Nichtstruktur-Proteine NS1 und PB1-F2 werden nicht in Virionen verpackt. (B) Vergrößerte Darstellung eines vRNP mit der pfannenstiel-ähnlichen Form: die virale RNA ist mit dem Nukleoprotein NP assoziiert. Die beiden Enden der vRNA bilden Sekundärstrukturen aus, an die der virale Polymerase-Komplex aus PB2, PB1 und PA gebunden ist (Whittaker et al., 1996a).

In die Lipidhülle, die der Wirtszelle entstammt, sind die beiden viralen Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) als Homotrimer und Neuraminidase (NA) als Homotetramer eingelagert, sowie das als Ionenkanal fungierende tetramere

M2-Protein. Im Inneren des Partikels ist die Lipidhülle mit dem Matrix-Protein M1 ausgekleidet, an das durch Assoziation mit dem Nukleoprotein (NP) die acht Gensegmente des Virus angelagert liegen. Die negativsträngige RNA liegt vollständig mit dem Nukleoprotein komplexiert vor und bildet mit den beiden Enden eine so genannte pfannenstiel-ähnliche Struktur aus (Hsu et al., 1987), an die der virale Polymerase-Komplex, bestehend aus den Proteinen PB2, PB1 und PA gebunden ist (Abb. 1.1 B). Dieser Verbund aus viraler RNA, Nukleoprotein und Polymerase-Komplex wird als Ribonukleoprotein-Komplex bezeichnet und im Folgenden als vRNP abgekürzt.

1.1.3 Genomaufbau

Das Genom der Influenza-A-Viren umfasst acht Segmente (Palese and Shaw, 2007), die zusammen 13600 Basen enthalten (Abb. 1.1 A). Jedes einzelne Gen ist sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende durch gen-spezifische, nicht-kodierende Bereiche flankiert, die über alle Isolate stark konserviert sind. Die ersten 12, bzw. die letzten 13 Basen aller Segmente sind identisch, danach folgt für jedes Gen eine Sequenz von variabler Länge. In dieser Sequenz liegen Signalsequenzen, die für die Regulation der Transkription/Replikation sowie der späteren Verpackung in naszente Virionen an der Zellmembran von Bedeutung sind. In der unten stehenden Tabelle 1.2 sind die acht Gensegmente und die darin kodierten Proteine mit den bekannten Funktionen aufgelistet.

Die beiden kleinen Gene 7 (M) und 8 (NS) kodieren für je zwei Proteine, die von unterschiedlichen Spleiß-Produkten derselben mRNA translatiert werden. Da sich durch das Spleißen in beiden Fällen das Leseraster verschiebt, unterscheiden sich die Genprodukte beider Segmente nach der Translation. Das Gensegment 2 (PB1) trägt ebenfalls die genetische Information für zwei unterschiedliche Proteine, PB1 als Untereinheit der viralen Polymerase mit Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und PB1-F2. Dieses wird ab einem Start-Codon im +1 Leserahmen ab nt40 kodiert (Chen et al., 2001), aber aufgrund einer häufig vorkommenden Punktmutation, die zu einem Stop-Codon translatiert, wird das Protein in vielen Influenza-A-Isolaten nicht exprimiert. Da PB1-F2 ein mitochondriales Lokalisationssignal trägt und die Akkumulation dort nachgewiesen werden konnte, wird die Rolle als Pathogenitätsdeterminante diskutiert (Chen et al., 2001; Conenello and Palese, 2007; Conenello et al., 2007).

Segment	Länge (Basen)	Protein (kDa)	Funktion
1	2341	PB2 (80)	Untereinheit der viralen Polymerase. Funktion: bindet 5'-Cap-Strukturen naszenter, zellulärer mRNAs
2	2341	PB1 (90)	Untereinheit der viralen Polymerase. Funktion: RNA-abhängige RNA-Polymerase
		PB1-F2 (10)	PB1-F2. nicht in allen Isolaten exprimiert, alternativer Leserahmen (+1). Funktion: Akkumuliert in Mitochondrien, induziert Apoptose
3	2233	PA (83)	Untereinheit der viralen Polymerase. Funktion: Endonuklease
4	1778*	HA0 (77) HA1 (55) HA2 (26)	Oberflächenprotein. Wird durch zelluläre Serinproteasen in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten. Funktion: Rezeptorbindung, Membranfusion
5	1565	NP (55)	Nucleokapsid-Protein. Funktion: komplexiert virale RNA
6	1413*	NA (56, glykosiliert)	Oberflächenprotein. Funktion: Hydrolyse endständiger Neuraminsäuren zur Freisetzung naszenter Virionen von Wirtszelle, Auflösung der epithelialen Mucus-Schicht
7	1027	M1 (28)	Matrix-Protein 1. Funktion: Morphogenese, kleidet innen die virale Lipidhülle aus.
		M2 (15)	Matrix-Protein 2. Funktion: Ionenkanal, vermittelt Freisetzung des Genoms
8	890*	NS1 (26)	Nichtstruktur-Protein 1. Funktion: Reguliert Spleißen viraler Gene, Antagonist antiviraler Prozesse z.B. INF α / β -Induktion, Apoptose
		NS2 (11)	Nichtstruktur-Protein 2. Funktion: reguliert Export der vRNPs aus dem Zellkern

Tab. 1.2 Auflistung der viralen Gensegmente (1-8) und der darauf kodierten Proteine mit Angabe der Größe und bekannten Funktionen. Übernommen und modifiziert aus „Molekulare Virologie“, S. Modrow, 2. Aufl. 2003.

Aufgrund der segmentierten Genomstruktur können sich im Falle einer Ko-Infektion durch zwei unterschiedliche Virus-Subtypen die einzelnen Gene vermischen, und so Virusreassortanten entstehen, die neue Eigenschaften wie z.B. gesteigerte Pathogenität oder einen erweiterten Wirtstropismus aufweisen.

1.2 Die virale Polymerase

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (*RNA-dependent RNA-polymerase*; RdRp) der Influenza-A-Viren ist ein heterotrimerer Proteinkomplex mit einer Masse von etwa 250 kDa, der sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt: den beiden basischen Proteinen PB2 (kodiert auf Gensegment 1) und PB1 (Gensegment 2) sowie dem sauren Protein PA (Gensegment 3). Zusammen mit dem viralen Nukleoprotein NP und der viralen RNA (vRNA) bildet die Polymerase den Ribonukleoprotein-Komplex (vRNP, *viral ribonucleoprotein complex*). Diese funktionelle Einheit ist für die Transkription und Replikation der viralen Gene verantwortlich. Jeder der drei Untereinheiten fällt eine spezifische, für die Funktion des Enzyms essentielle Aufgabe zu:

In der PB2-Untereinheit befindet sich die Cap-Bindungstasche, in der die 5' 7-Methyl-Guanosin Cap (m⁷G-Cap) der zellulären mRNA gebunden wird (Guilligay et al., 2008; Li et al., 2001). Die PB1-Untereinheit übernimmt dabei die Polymerase-Funktion (Biswas and Nayak, 1994; Poch et al., 1989), die für die Elongation der RNAs verantwortlich ist, und die PA-Untereinheit besitzt Endonuklease-Aktivität, die die Hydrolyse der m⁷G-Cap von der zellulären mRNA durchführt (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009).

1.2.1 Die Struktur des NP-Polymerase-Komplexes

Die genaue Struktur der viralen Polymerase ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt, aber die verschiedenen Untersuchungen, die in den letzten Jahren unternommen wurden (z.B. Oberflächen-Analyse mittels spezifischer Antikörper (Martin-Benito et al., 2001; Masunaga et al., 1999; Ohtsu et al., 2002; Toyoda et al., 1996), EM (Area et al., 2004), Cryo-EM (Coloma et al., 2009) und Kristallisierung (Sugiyama et al., 2009; Tarendeau et al., 2007) ergeben ein relativ konkretes Bild wie die Polymerase-Untereinheiten interagieren, wo die Interaktionsflächen und reaktiven Zentren sitzen und wie diese aufgebaut sind (Abb. 1.2). So interagieren die drei Untereinheiten jeweils über die N- bzw. C-Termini miteinander (Ohtsu et al., 2002; Perez and Donis, 1995), wie in Abb. 1.2 schematisch dargestellt. Dabei liegt die PB1-Untereinheit in der Mitte des Proteinkomplexes (Toyoda et al., 1996) und interagiert über die 15 N-terminalen Aminosäuren (Perez and Donis, 2001) mit dem C-Terminus der PA-Untereinheit, und weiter über den C-Terminus mit dem N-Terminus der PB2-Untereinheit (Sugiyama et al., 2009).

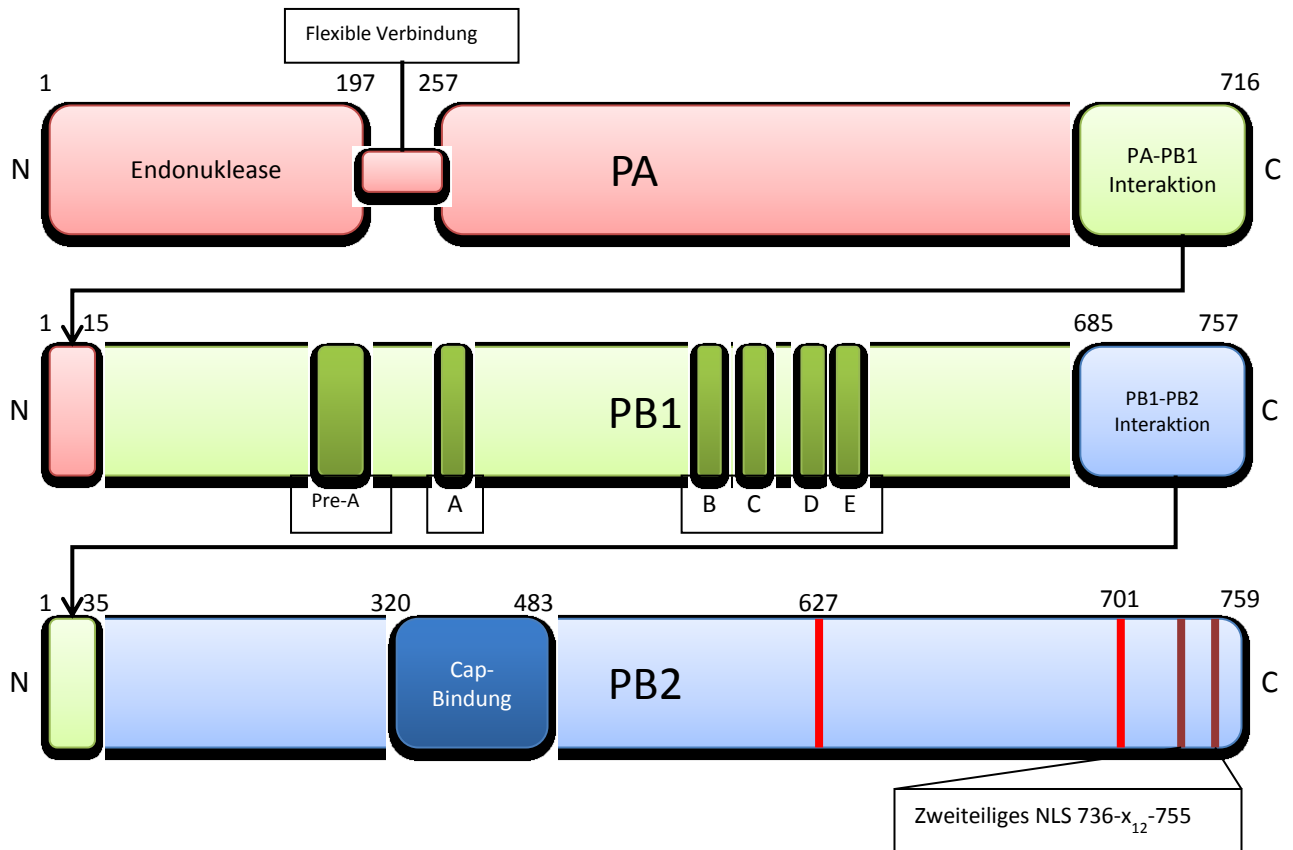
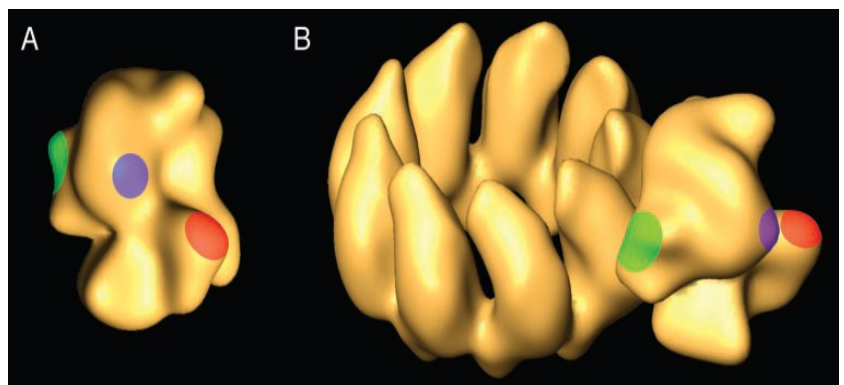


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der viralen Polymerase-Untereinheiten. Dargestellt sind die drei Untereinheiten und ihre Interaktionsdomänen (schwarze Verbindungen). Wichtige aktive Zentren und Aminosäuren sind hervorgehoben. Weitere Erklärung im Text. Übernommen und modifiziert aus (Ruigrok et al., 2010).

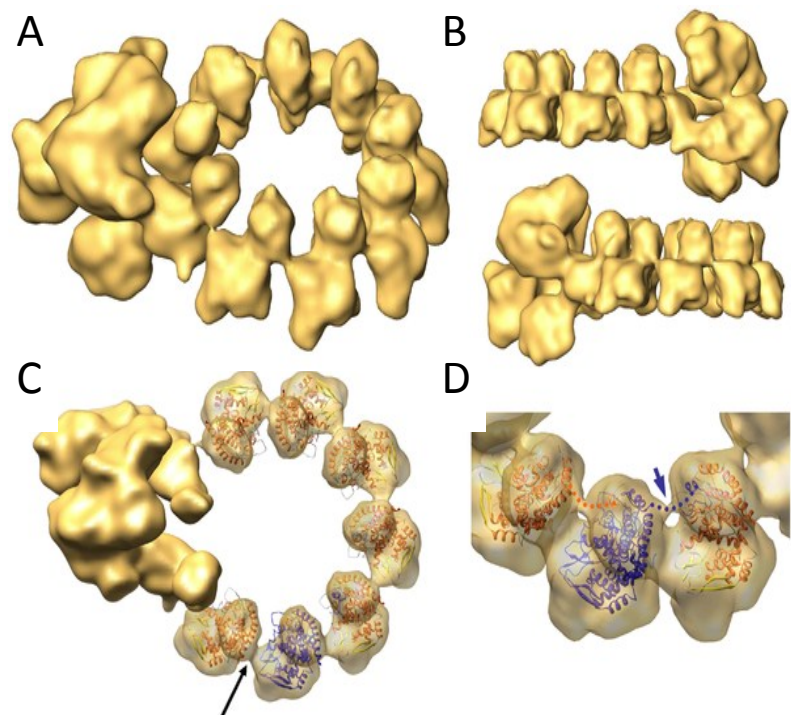
Die Ultrastruktur der viralen Polymerase konnte 2004 durch elektronenmikroskopische Studien genauer analysiert werden. Dazu wurde ein kurzes RNA-Stück von 248 Nukleotiden zusammen mit den Proteinen des RNP in Säugerzellen exprimiert und anschließend aufgereinigt (Area et al., 2004).

Abb. 1.3 Computermodell eines vRNP aus EM-Bildern. Die Polymerase sitzt am Rand des NP-Rings, der die kurze 248 Basen lange RNA komplexiert hat. Die Polymerase-Untereinheiten wurden mittels spezifischer Antikörper identifiziert (A und B): grün: PB1, blau: PA und rot: PB2. Quelle: Area et al., 2004.



Es zeigt sich, dass die drei Untereinheiten der Polymerase einen sehr engen Komplex bilden, der keine klare Begrenzung zwischen den Untereinheiten hat. Durch spezifische Antikörper konnte aber zumindest die grundsätzliche Organisation der Untereinheiten (Abb. 1.3) gezeigt werden. In dem verwendeten Modell ist zusätzlich zu erkennen, dass die 248nt lange RNA von neun Nukleoproteinen gebunden wird, womit die berechnete Stöchiometrie von 24 Nukleotiden pro NP-Molekül (Ortega et al., 2000; Ye et al., 2006) bestätigt wird. Durch verbesserte Präparationsmethoden konnte die Auflösung der Struktur der viralen Polymerase mittels Cryo-EM bis auf 12Å für den NP-RNA-Ring, bzw. 18Å für die Polymerase erhöht werden, Abb. 1.4 (Coloma et al., 2009).

Abb. 1.4 Cryo-EM Modellierung desselben vRNPs wie in Abb. 1.3 mit verbesserter Auflösung. (A) Blickwinkel von oben, (B) von der Seite. Die hohe Auflösung wurde durch separate Analyse des NP-Rings und der Polymerase ermöglicht. Beide Bilder wurden nachträglich zusammengefasst. (C) Überlagerung des Modells mit der bekannten Röntgenkristall-Struktur des NP, schwarzer Pfeil: vermutete RNA-Interaktion. (D) Vergrößerter Ausschnitt von C, gepunktete Linie und Pfeil: flexibler N-Terminus des blau gefärbten NP-Monomers interagiert mit dem nachfolgenden NP-Monomer (orange) und ermöglicht so die Oligomerisierung. Quelle: Coloma et al., 2009.



Im Folgenden werden die im Wesentlichen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Strukturen der einzelnen Protein-Untereinheiten beschrieben:

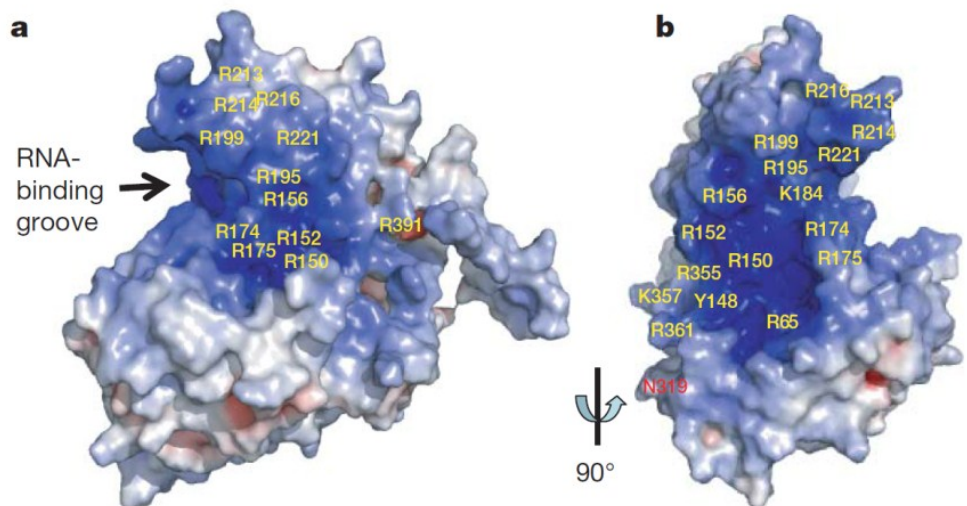
1.2.2 Das Nukleoprotein NP

Bislang konnten die Nukleoproteine von zwei Influenza A Subtypen kristallisiert werden: H1N1 NP (Ye et al., 2006) und H5N1 NP (Ng et al., 2008). In beiden Arbeiten wurde das NP in *E.coli* exprimiert und anschließend charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die NP-Monomere allein in der Lage sind, sich zu höhermolekularen Komplexen zusammen zu lagern und Trimere oder größere Oligomere zu bilden (Ye et al., 2006; Ng et al., 2008). In Anwesenheit von RNA organisieren sich die NP zu

größeren Oligomeren (Ng et al., 2008). Die Kristallstruktur des Nukleoproteins (Ye et al., 2006; Ng et al., 2008) zeigt das NP-Monomer in einer halbmondförmigen Form mit einer etwas kleineren „Kopf“- und einer größeren „Körper“-Domäne. Die Furche zwischen den beiden Domänen ist mit positiv geladenen Aminosäuren ausgekleidet, die eine RNA-Bindung ermöglichen können (Abb. 1.5). Diese Furche ist nach Oligomerisierung in Richtung Zytoplasma orientiert und lässt die gebundene RNA exponiert (Ye et al., 2006; Ng et al., 2008), was in Übereinstimmung mit der Beobachtung steht, dass die virale RNA im vRNP sensitiv für RNase-Verdau ist (Baudin et al., 1994). Ng et al. konnten zudem zeigen, dass die RNA-Bindung durch Alanin-Substitution der Arginine oder Deletion spezifischer Motive innerhalb der Furche drastisch reduziert oder sogar vollständig unterbunden wird. Abb. 1.6 zeigt die Motive innerhalb der Furche die von Ng et al. als essentiell für die RNA-Bindung identifiziert werden konnten. Nicht nur die Arginine (Abb. 1.6 B lila), sondern auch zwei flexible Bereiche (Abb. 1.6 B grün und blau) die eine Besonderheit des Influenza-NP darstellen, scheinen für die RNA-Bindung von Bedeutung zu sein.

Die einzelnen NP-Monomere interagieren über ein kurzes C-terminal gelegenes Helix-Motiv (Aminosäuren 402 – 428) miteinander. Das kurze Peptid (Abb. 1.6 A in rot) lagert sich in der „Körper“-Domäne (Abb. 1.6 A grau) des folgenden NP-Monomers und schafft so eine flexible Verbindung die unterschiedliche Konformationen, vom Trimer zum Oligomer, ermöglicht (Ye et al., 2006; Ng et al., 2008).

Abb. 1.5
Modellierung der Oberflächenladung eines H1N1 NP-Monomers. In blau die positive Ladung durch basische Aminosäuren, die entlang der Furche zwischen den beiden globulären Domänen verläuft (a) und (b) um 90° gedreht. Quelle: Ye et al., 2006.



Das N-terminal gelegene Kernlokalisierungssignal, verantwortlich für den Import der vRNP in den Zellkern (Cros et al., 2005; O'Neill et al., 1995), zeigt in dem NP-Oligomer nach außen und ist so für die zelluläre Import-Maschinerie zugänglich (Ye et al., 2006).

Interessanterweise ähnelt die Struktur des Nukleoprotein der Influenza A Viren den NP anderer negativ-strängiger RNA Viren wie VSV oder Rabies (Albertini et al., 2006; Green et al., 2006; Ng et al., 2008), obwohl sich die Sequenzen deutlich unterscheiden.

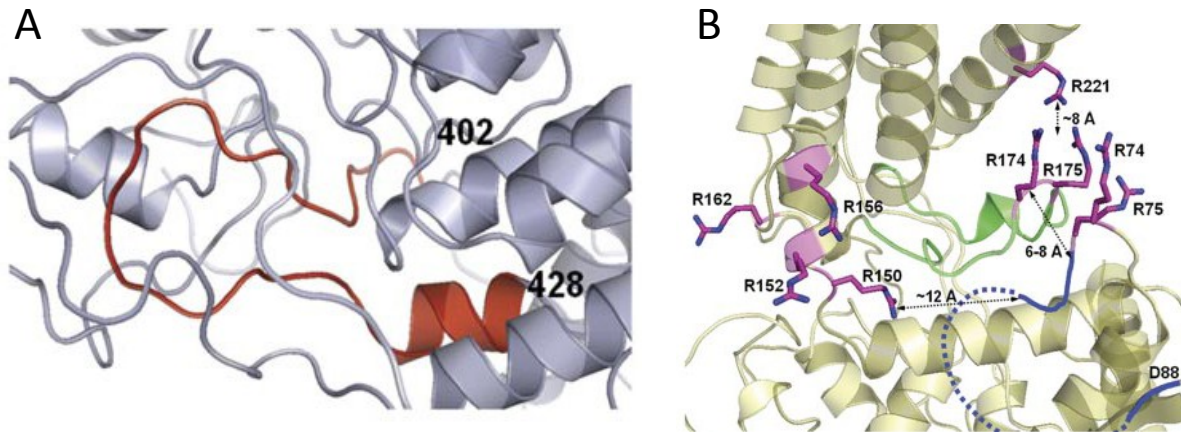


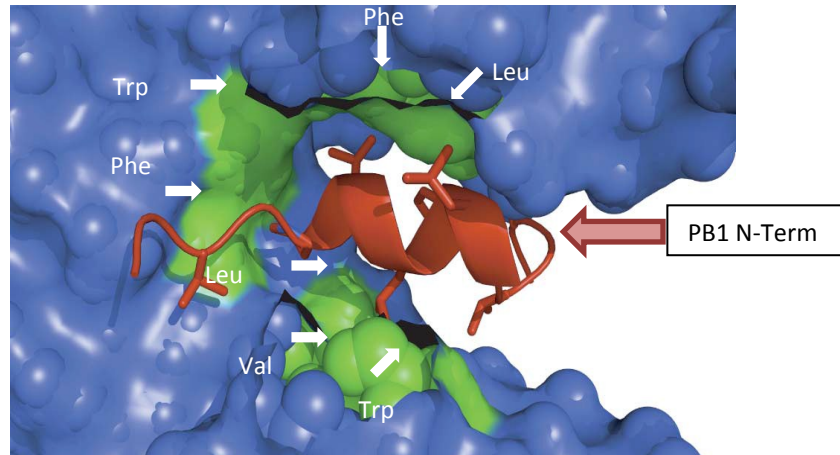
Abb. 1.6 (A) Das C-terminale Peptid eines NP-Monomers (rot) lagert sich in das benachbarte NP-Monomer (grau) und schafft so eine direkte Verknüpfung der beiden Moleküle. Aufgrund der ungeordneten Struktur ist die Verbindung sehr flexibel und erlaubt die Formation verschiedener Oligomerisierungsstufen (3- bis Oligomer). (B) Vergrößerte Darstellung der RNA-Bindungsfurche mit den essentiellen Motiven in lila (Arginine), grün (in die Furche ragender Bogen) und blau (beweglicher Bogen). Quelle: Ng et al., 2008.

1.2.3 Das saure Polymeraseprotein PA

Die weitere Aufklärung der drei Polymerase-Untereinheiten durch Röntgenkristallstruktur-Analyse gestaltet sich nach wie vor schwierig. Von den drei Untereinheiten lässt sich nur PA als Ganzes in löslicher Form kristallisieren. Das Protein unterteilt sich in zwei globuläre Domänen, einen 25 kDa großen N-terminalen „Kopf“ und den 55 kDa großen C-terminalen „Körper“. In der großen Domäne liegt die Interaktionsfläche zwischen PA und PB1 (He et al., 2008; Obayashi et al., 2008; Perez and Donis, 1995; Perez and Donis, 2001), wobei ein kurzes 12-15 Aminosäuren langes Peptid des PB1-N-Terminus in eine Tasche der PA-Untereinheit hineinreicht (Obayashi et al., 2008; Abb. 1.7). Ansonsten ist die Funktion der großen Domäne ungeklärt.

Die kleine globuläre Domäne des PA Proteins ist für die Spaltung von einzelsträngiger RNA (wie z.B. m^7G -Cap modifizierte mRNA) und einzelsträngiger DNA verantwortlich (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009). Zwei Arbeitsgruppen konnten fast zeitgleich die Kristallstruktur aufklären: Das aktive Zentrum ähnelt den Typ II-Restriktionsendonukleasen mit einem PD-(D/E)-x-K Motiv.

Abb. 1.7 Vergrößerter Ausschnitt aus der Kristallstruktur der großen PA-Domäne. Gezeigt ist die Bindungstasche (blau) mit den für die Interaktion wichtigen Aminosäuren in grün hervorgehoben. In rot dargestellt das N-terminale Verbindungsstück des PB1-Proteins (1-15). Quelle: Obayashi et al., 2008.



Jedoch ergibt sich zwischen den beiden postulierten Strukturen ein Unterschied bezüglich der Art der involvierten Metallionen. So zeigen Yuan et al., dass sich im katalytischen Zentrum ein Magnesium-Ion befindet, während Dias et al. zwei Manganionen beobachten (Abb. 1.8). Während die N-terminale Domäne auch *in vitro* katalytisch aktiv ist (Dias et al., 2009), konnten Yuan et al. zeigen, dass Mutationen die Koordination des Mg^{2+} beeinflussen können und so die Nuklease-Aktivität unterbinden, die replikativen Eigenschaften einer vollständigen Polymerase aber nicht. Chelatoren wie EDTA oder Dioxo-4-Phenylbutansäure, die vorwiegend zweiwertige Kationen binden, sind daher starke Inhibitoren der viralen Endonuklease (Tomassini et al., 1994).

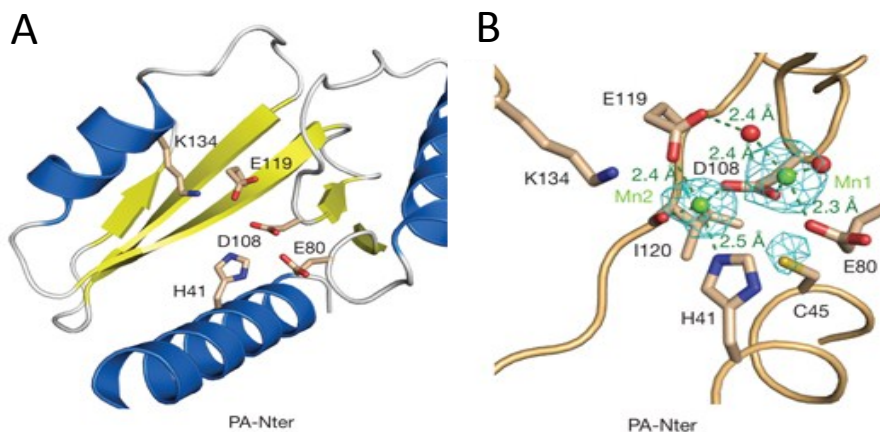


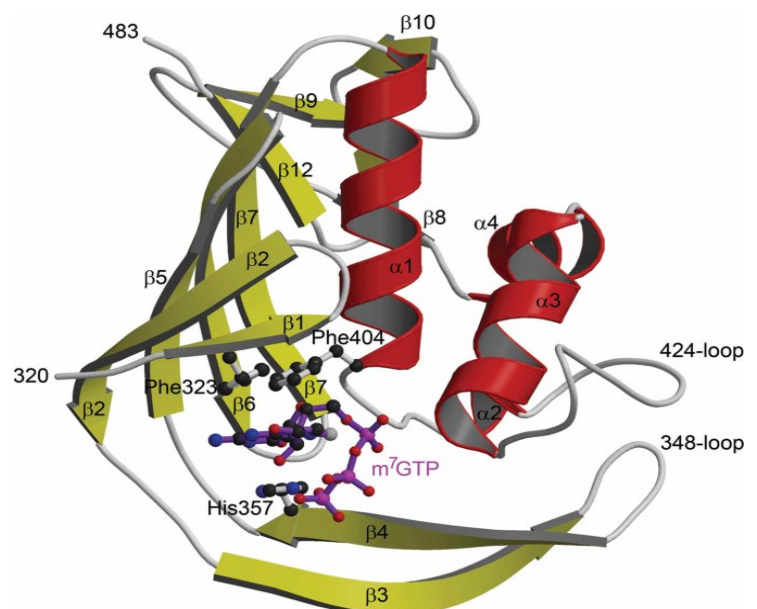
Abb. 1.8 Vergrößertes Modell des katalytischen Zentrums der PA-Untereinheit (A) als Bänder-Modell mit den Alpha-Helices (blau) und Beta-Faltblättern (gelb) die das katalytische Zentrum bilden. Die für die Interaktion mit RNA wichtigen Seitenketten sind eingezeichnet. (B) Das Katalytische Zentrum als Faden-Modell mit der berechneten Ladungsverteilung der Mn^{2+} -Ionen (grün). Quelle: Dias et al., 2009.

1.2.4 Das basische Polymeraseprotein PB2

Während PA als ganzes Protein in löslicher Form exprimiert werden kann, ist dies bei den beiden basischen Proteinen PB1 und PB2 nicht der Fall. Um die Struktur dennoch auch auf kristalliner Ebene aufklären zu können, wurde eine Hoch-Durchsatz-Methode entwickelt, die ESPRIT genannt wird (Tarendeau et al., 2007). Dadurch konnte die Kristallstruktur von drei Domänen der PB2-Untereinheit ermittelt werden: die als 627-Domäne bezeichnete Region (Aminosäuren 538-759; Abb. 1.10 und 1.11) (Tarendeau et al., 2008), benannt nach einer der prominentesten Aminosäuren (627), und ein zentraler Bereich von Aminosäure 320 bis 483 (Abb. 1.9)(Guilligay et al. 2008). Die dritte Domäne, der äußerste C-terminale Bereich (Aminosäuren 678-759, NLS-Domäne; Abb. 1.11 und 1.12), war die erste Region, deren Struktur aufgeklärt werden konnte (Tarendeau et al., 2007).

Die zentrale Region, von Aminosäure 320 bis 483, enthält das Cap-Bindungsmotiv, und konnte zusammen mit m^7GTP kristallisiert werden (Guilligay et al., 2008; Abb. 1.9). Es zeigt sich, dass das m^7G -Cap Erkennungsmotiv starke Ähnlichkeit zu bekannten mRNA-Interaktionspartnern wie dem *Cap-Binding-Complex* (CBC) (Mazza et al., 2002a; Mazza et al., 2002b) und dem Translations-Initiations-Faktor eIF4E (Marcotrigiano et al., 1997) aufweist. Zwei aromatische Aminosäuren (His 357 und Phe 404) flankieren die methylierte Base, während die Aminosäuren Glu 361 und Lys 376 über Wasserstoffbrücken die Spezifität für Guanosin bestimmen.

Abb. 1.9 Das Cap-Bindungszenrum der PB2-Untereinheit als Bändermodell. Die interagierenden Aminosäuren His 357, Phe 404, Glu 361 und Lys 376 sind eingezeichnet. In Lila das kokristallisierte m^7GTP ; es liegt in mitten der Bindungstasche die von insgesamt 12 Beta-Faltblättern (gelb) und zwei Alpha-Helices (rot) gebildet wird. Quelle: Guilligay et al., 2008.



Die 627-Domäne erstreckt sich über den Aminosäure-Bereich 538-759 und zeichnet sich wie das gesamte PB2-Protein durch eine einzigartige Struktur aus. Innerhalb dieser Domäne liegt die Aminosäure 627, die eine wichtige Rolle bei der Wirtsadaptation von aviären Influenza-Viren an Säuger spielt. Besonders bemerkenswert an dieser Domäne ist die große, positiv geladene Oberfläche, die

durch fünf basische Aminosäuren gebildet wird. In aviären Viren, deren PB2-Untereinheit ein Glutamat an Position 627 aufweist, wird diese Oberfläche von der sauren Seitenkette des Glu zerstört, da die Aminosäure fast genau in der Mitte dieser Fläche liegt (Abb. 1.10 B). In humanen Isolaten ist das Glutamat 627 durch ein Lysin ersetzt, wodurch die basische Oberfläche geschlossen wird (Abb. 1.10 A).

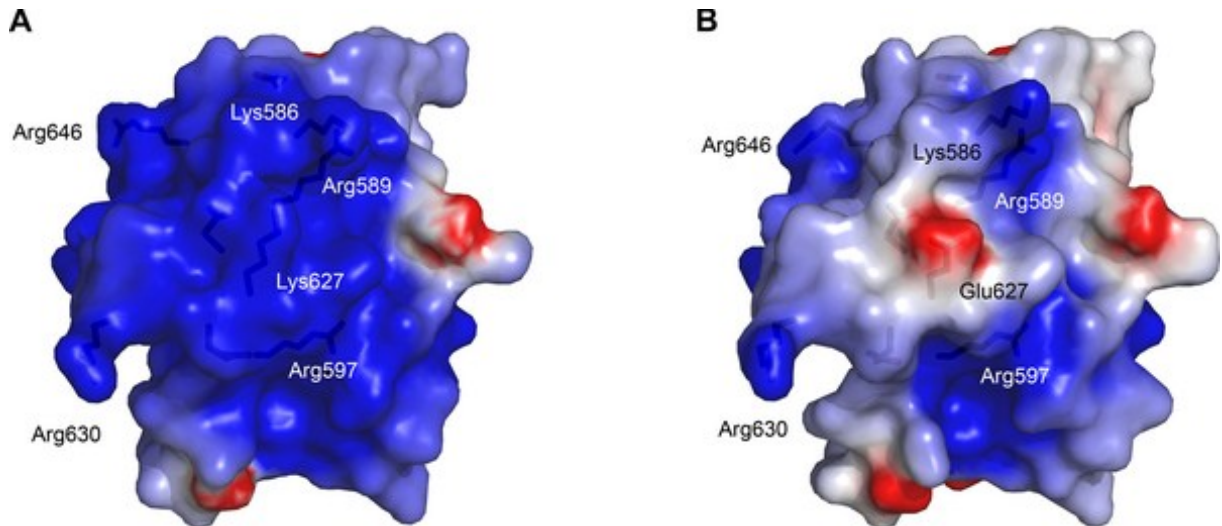


Abb. 1.10 Modellierung des elektrostatischen Potentials der 627-Domäne. In blau die basischen Aminosäuren, die im Fall des K627 eine vollständig positiv geladene Oberfläche entstehen lassen (A), wohingegen im aviär-typischen PB2 mit E627 diese Fläche durch das saure Glutamat durchbrochen wird (B). Quelle: Tarendeau et al., 2008.

Bereits 1993 konnte durch Subbarao et al. (Subbarao et al., 1993) gezeigt werden, dass der Austausch E627K wichtig für die Adaptation aviärer Viren an den Menschen ist. Allerdings konnte die genaue Bedeutung dieses Austauschs noch nicht eindeutig geklärt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass der Austausch die Temperatur-Sensitivität moduliert und es der Polymerase so ermöglicht, bei niedrigeren Temperaturen (33°C) effizient zu replizieren, wie sie im oberen Respirationstrakt des Menschen vorherrscht (Massin et al., 2001). Viren, die ein aviär-typisches E627 aufweisen, haben dagegen einen replikativen Vorteil bei 41°C, der Temperatur die typischerweise im Gastro-Intestinal-Trakt der Vögel herrscht. Doch scheint die Veränderung der Temperatur-Sensitivität als Erklärung nicht ausreichend; es konnte gezeigt werden (Mehle and Doudna, 2008), dass in heterokaryonten Zellen aus Vogel und Mensch die Polymerase mit PB2 E627 schlechter repliziert als eine Polymerase mit K627. Sie postulieren, dass es in humanen Zellen einen inhibitorischen Effektor gibt, der spezifisch mit dem aviären PB2 (E627) interagieren kann, nicht jedoch mit der humanen PB2-Variante (K627). Auf der anderen Seite postulieren Moncorgé et al., dass es in aviären Zellen einen positiven Effektor gibt, der in humanen Zellen fehlt, bzw. eine andere Spezifität aufweist – und dass die Mutation E627K als Anpassung an

den human-spezifischen positiven Effektor in humanen Zellen zu verstehen ist (Moncorge et al., 2010).

In der Modellierung der beiden C-terminalen Domänen (Abb. 1.11, 627-Domäne (hellgrau) und NLS-Domäne (dunkelgrau)) erscheint das Kernlokalisierungssignal durch die Faltung verdeckt (Tarendeau et al., 2008). Die Autoren postulieren hier, dass die Orientierung der einzelnen Domänen im Kontext des vollständigen Proteins und unter Berücksichtigung der flexiblen Verbindung zwischen den beiden Domänen so variieren kann, dass eine Interaktion des NLS mit Importin Alpha ermöglicht wird.

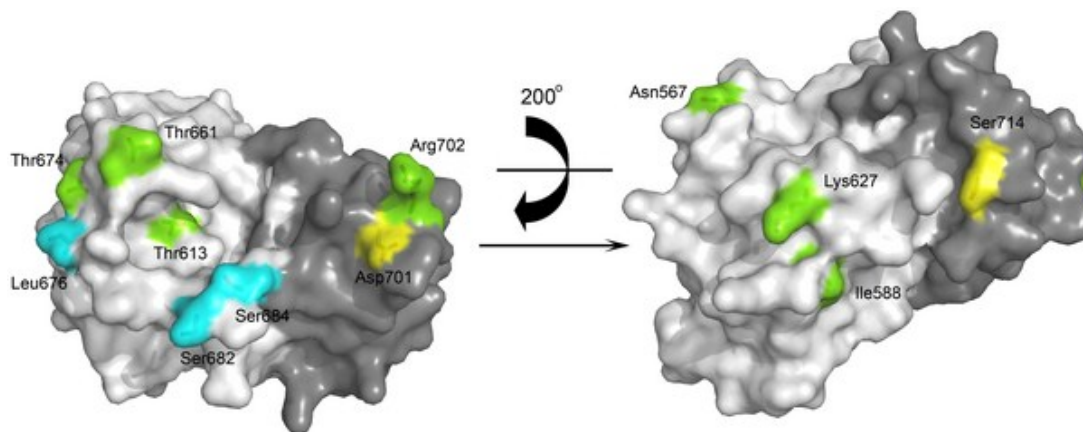


Abb. 1.11 Modell der beiden PB2-Domänen 627 (hellgrau) und NLS (dunkelgrau). Aminosäuren, die in adaptiven Prozessen eine Rolle spielen oder unter positivem Selektionsdruck stehen, sind farblich hervorgehoben (z.B. Lys 627, Asp 701, Arg 702 und Arg 714). Quelle: Tarendeau et al., 2008.

Die erste Kristallstruktur, die mittels ESPRIT analysiert werden konnte, war der äußerste C-terminale Bereich von PB2 (Tarendeau et al., 2007), kokristallisiert mit Importin $\alpha 5$ (Abb. 1.12). Hier liegt das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*; NLS) (736-X₁₂-755) und zwei weitere Aminosäuren, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind: Aminosäure D701 und S714. In der Kristallstruktur lässt sich erkennen, dass das NLS auf einem flexiblen Arm liegt. Diese Erkenntnis, kombiniert mit der Beobachtung, dass die Mutation D701N eine verstärkte Einwanderung von PB2 in den Zellkern von Säugerzellen verursacht (Gabriel et al., 2008; Resa-Infante et al., 2008) führte zu der Hypothese, dass die Aminosäuren D701 und R753 eine Salzbrücke ausbilden, welche das NLS maskiert und so für Importine von Säugern schlechter zugänglich macht (Tarendeau et al., 2007). Wird das Asp 701 zu Asn mutiert, so kommt es nicht zur Ausbildung der Salzbrücke; das NLS ist freizugänglich und der Kernimport wird dadurch erleichtert. Dass es in aviären Wirten nicht zu dieser Mutation kommt, lässt sich vorläufig mit Unterschieden in der Importin - Struktur erklären. Bislang aber ist die genaue Struktur der Importine, mit Ausnahme

des humanen Importin $\alpha 5$, nicht aufgeklärt, so dass diese Annahme auf den Sequenzunterschieden basiert, die bis zu 18% betragen (Importin $\alpha 1$ Human \leftrightarrow Huhn; (Gabriel et al., 2011)).

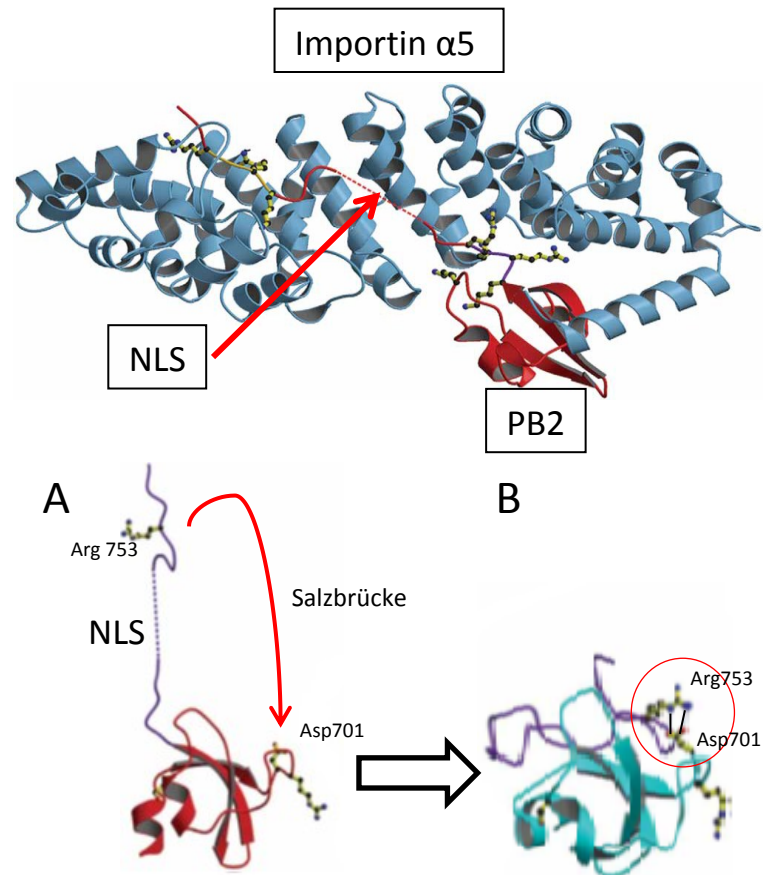


Abb. 1.12 Oben: äußerster C-Terminus der PB2-Untereinheit (rot), in direkter Interaktion mit Importin $\alpha 5$ (blau). Das NLS (roter Pfeil) liegt in der Interaktions-Furche des Importins. (A) Der PB2 C-Terminus ohne Importin in der geöffneten und geschlossenen (B) Form. Der rote Pfeil markiert die Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Arg 753 und Asp 701 (B roter Kreis). Übernommen und modifiziert nach Tarendeau et al., 2007.

1.2.5 Das basische Polymeraseprotein PB1

Über die PB1 Untereinheit gibt es bislang nur wenig strukturelle Informationen. Kristallographisch konnten bislang nur die beiden Termini (N- und C-Terminus) als Bindungsdomänen zu den Untereinheiten PA (Siehe Abb. 1.7) und PB2 (Abb. 1.13 (Sugiyama et al., 2009)) modelliert werden. Funktionell ist diese Untereinheit, wie eingangs erwähnt, für die RNA-Synthese verantwortlich. In der zentralen Region finden sich konservierte Motive, die typisch sind für RNA-abhängige Polymerasen (Motive A-D) (Poch et al., 1989; Biswas & Nayak 1994). Zusätzlich wird dieser Bereich von zwei Motiven flankiert (prä-A und E), die bislang nur in RNA-abhängigen RNA-Polymerasen anderer negativ-strängiger RNA-Viren (z.B. Rift Valley Fever Virus; (Muller et al., 1994)) identifiziert werden konnten.

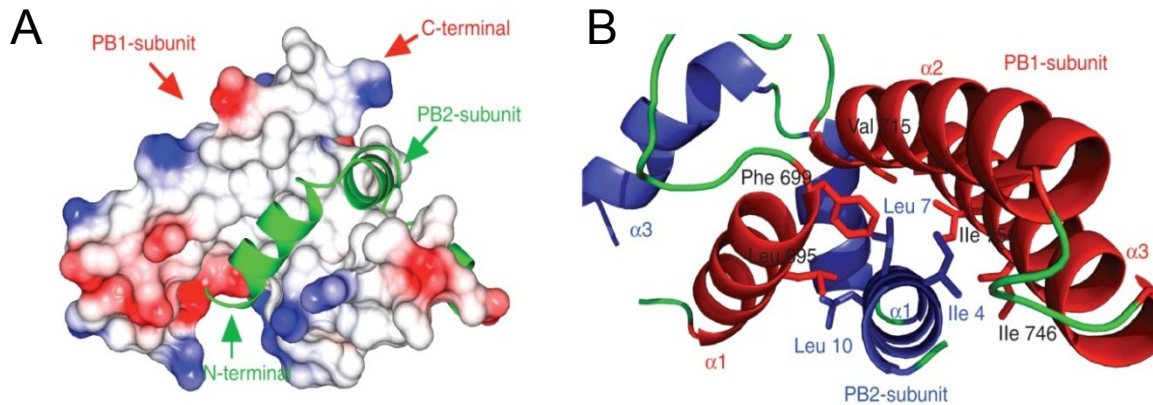


Abb. 1.13 Darstellung der PB1-PB2 Interaktionsdomäne. (A) der PB1 C-Terminus als raumfüllendes Modell mit elektrostatischem Potential (rot negative, blau positive Ladung). Der N-Terminus der PB2-Untereinheit als Bändermodell (grün) liegt mit den beiden Alpha-Helices in einer distinkten Furche. (B) Darstellung der beiden Interaktionsdomänen als Bändermodell, mit Hervorhebung der für die Interaktion wichtigen Aminosäuren (rot: PB1, blau: PB2). Quelle: Sugiyama et al., 2009.

1.3 Replikationszyklus

Der virale Replikationszyklus lässt sich grob in 5 Schritte unterteilen:

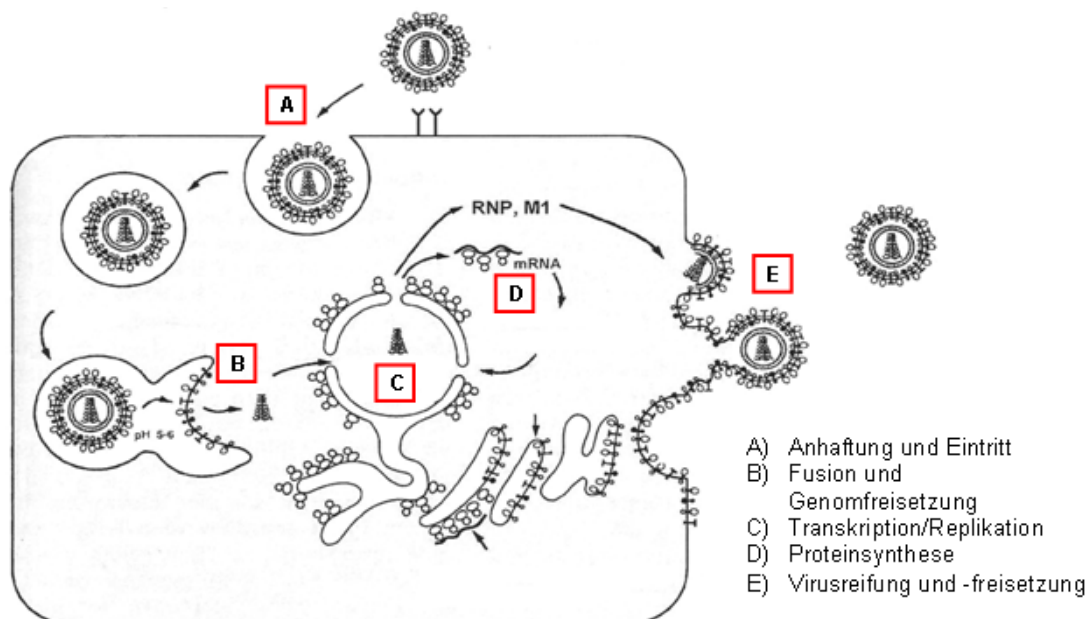


Abb. 1.14 Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus. (A) Das Virus adsorbiert an der Zellmembran und wird endozytotisch in die Zelle aufgenommen. (B) Nach Ansäuerung des Endosomeninnern erfolgt die Membranfusion und anschließende Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma. (C) Die Replikation und Transkription viraler RNAs erfolgt im Zellkern der infizierten Zelle. (D) Translation der viralen Proteine am rauen ER und freien Ribosomen, Reifung der Oberflächenproteine im Golgi-Netzwerk. (E) Assemblierung und Knospung neuer Viren an der Zellmembran (modifiziert nach (Köhler et al., 2001)).

1.3 1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Nachdem das virale Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin (HA) über endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäuren) an Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden hat, erfolgt die clathrin-vermittelte Endozytose des Partikels in das Zytoplasma der Zelle. Das Virus wird dabei in ein Endozytose-Vesikel aufgenommen, welches in der Folge mit Endosomen verschmilzt (Abb. 1.14 A).

1.3.2 Membranfusion und Uncoating

Während der Reifung des frühen Endosoms zum späten Endosom kommt es zur Ansäuerung des Lumens auf einen pH-Wert von 5-6. Dies führt zu einer Konformationsänderung des HA: das Fusionspeptid am N-Terminus der HA2-Untereinheit wird exponiert und kann in die endosomale Membran integrieren. Durch eine zweite Konformationsänderung werden virale und endosomale Membran in direkten Kontakt gebracht und können fusionieren (Abb. 1.15). Parallel zur Konformationsänderung des HA und der folgenden Membranfusion kommt es über den Ionenkanal M2 zu einem Einstrom von Protonen in das Virusinnere. Die Ansäuerung des Virusinnern führt zur Dissoziation der RNP vom Matrixprotein ((Whittaker, Bui, and Helenius, 1996a; Whittaker et al., 1996b) Abb. 1.14 B). Vermittelt durch ein Kernlokalisierungssignal auf den Nukleoproteinen erfolgt dann der Import der vRNPs in den Zellkern (O'Neill et al., 1995; Cros et al., 2005).

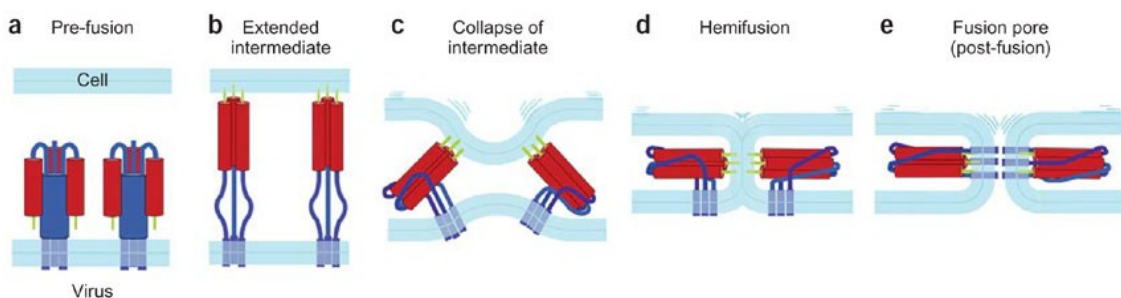


Abb. 1.15 Model des HA-vermittelten Fusionsprozesses. Der Fusionsprozess gliedert sich in 5 Abschnitte: A) das Virus liegt frei im Endosom. B) nach der pH-induzierten Konformationsänderung inseriert das Fusionspeptid in die endosomale Membran. C) durch die zweite Konformationsänderung zieht das HA die beiden Membranen zusammen. D) als intermediärer Zustand vor der vollständigen Fusion liegen die beiden äußeren Schichten der Lipiddoppelhülle hemifusioniert vor. E) die inneren Schichten der Lipiddoppelhülle fusionieren und die Membranfusion ist abgeschlossen. (Harrison, 2008).

1.3.3 RNA-Synthese

Im Gegensatz zu anderen negativ-strängigen RNA Viren erfolgt die Synthese viraler RNA-Spezies (mRNA und vRNA) der Influenza-A-Viren im Zellkern der infizierten Zelle.

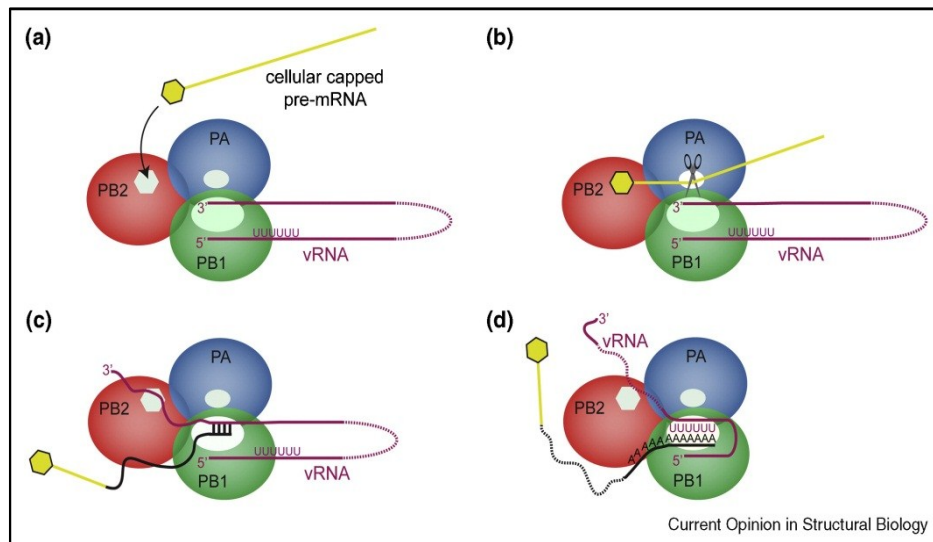


Abb. 1.16 Schematische Darstellung der Funktionen der viralen Polymerase-Untereinheiten bei der Transkription. (a) die PB2-Untereinheit bindet zelluläre mRNA über die m⁷G Cap. (b) die mRNA wird im katalytischen Zentrum der PA-Untereinheit gespalten und in direkte Nähe zum RNA-Synthese-Zentrum der PB1-Untereinheit gebracht. (c) im aktiven Zentrum der PB1-Untereinheit erfolgt nach Anlagerung des mRNA-Primers die Elongation der viralen RNA als mRNA bis zur oligo-U-Sequenz (d). Quelle: Ruigrok et al., 2010.

1.3.3.1 Transkription

Die Gensegmente werden als vRNP nach dem Freisetzen der vRNPs vom Matrix-Protein über Kernlokalisationssignale des NP (O'Neill et al., 1995; Cros et al., 2005) in den Zellkern transportiert. Hier erfolgt die initiale Transkription der negativ orientierten vRNA zu positiv orientierter mRNA (Abb. 1.14 C). Dieser Prozess ist primer-abhängig. Primer-abhängig bedeutet in diesem Fall, dass die virale Polymerase selbst nicht in der Lage ist, eine 5' 7-Methyl-Guanosin-Cap (m⁷G-Cap) zu synthetisieren, die für die Translation notwendig ist (Bouloy et al., 1978). Stattdessen „klaut“ sich die Polymerase die Cap-Struktur von zellulärer mRNA, mittels dem als *cap-snatching* (Shih and Krug, 1996) bezeichneten Vorgang: die virale Polymerase erkennt eine aktive zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Pol II) anhand der transienten Phosphorylierung von Serinen (Chan et al., 2006; Engelhardt et al., 2005; Rodriguez et al., 2007) innerhalb mehrerer sich wiederholender Sequenz-abschnitte, die aus sieben Aminosäuren bestehen und an den Positionen 2 und 5 ein Serin tragen (Corden, 1990). Je nachdem,

ob das 2te oder 5te Serin phosphoryliert ist, befindet sich die Pol II am Beginn oder mitten in der mRNA-Synthese. Ist die Pol II gerade am Beginn der Synthese, lagert sich die PB2-Untereinheit an die m⁷G-Cap der neugebildeten mRNA an (Abb. 1.16 (a)) (Blaas et al., 1982; Honda et al., 1999; Ulmanen et al., 1981) und bringt so die mRNA in direkte Nähe zum hydrolytischen Zentrum innerhalb der PA-Untereinheit. Hier wird die mRNA nach 10-13 Nukleotiden gespalten (Abb. 1.16 (b)), wobei die letzte Base meist ein Guanodin-Rest (seltener Adenosin) ist (Beaton and Krug, 1981; Caton and Robertson, 1980; Plotch et al., 1981). Dieses Guanodin dient nun der Zusammenführung von zellulärem mRNA-Rest mit Cap und der viralen RNA am zweiten Nukleotid des 3'-Endes (Plotch et al., 1981). Nach der Anlagerung erfolgt die Strangsynthese der viralen mRNA durch die Polymerase-Funktion der PB1-Untereinheit (Abb. 1.16 (c)) (Argos, 1988; Biswas and Nayak, 1994; Poch et al., 1989). Am Ende jedes Gens (15-22 Basen vor dem 5'-Ende) liegt eine oligo-U-Sequenz (Li and Palese, 1994), an der die virale Polymerase ins Stottern gerät und so ein Poly-A-Signal an die virale mRNA anhängt (Abb. 1.16 (d)) (Hsu et al., 1987). So erhält die virale mRNA die zwei für sie wichtigen translationsregulatorischen Elemente m⁷G-Cap am 5'-Ende und Poly-A-Signal am 3'-Ende und kann an den zellulären Ribosomen zu Proteinen translatiert werden.

1.3.3.2 Replikation

Die Synthese viraler RNA, die in neue Virionen verpackt wird, erfolgt in zwei Schritten und ist unabhängig von Primern (*de novo*) (Honda et al., 2002; Lee et al., 2002). Wie Deng et al. zeigen, beginnt die *de novo*-Synthese von cRNA und vRNA unterschiedlich. Während die cRNA intern am Promotor initiiert wird und das pppApG nach Synthese des Dinukleotid-Triphosphats an Position 3 bzw. 4 des Promotors nach hinten an Position 1 und 2 versetzt wird (der sogenannte *prime and realign* Mechanismus) wird die vRNA gleich von Position 1 ab synthetisiert (Deng et al., 2006).

- 1) Zuerst kopiert die virale Polymerase das Gen vollständig, d.h. inklusive der nicht-translatierten Sequenzbereiche an den Enden des Gensegments und generiert so positiv orientierte cRNA (*complementary RNA*).
- 2) Die cRNA dient in der Folge als Vorlage zur Synthese negativ orientierter vRNA, die dann als vRNP verpackt aus dem Zellkern exportiert und in neue Virionen eingebaut wird.

Der genaue Mechanismus, der die virale Polymerase dazu veranlasst, statt positiv orientierter mRNA mit m⁷G-cap und Poly-A-Signal die ebenfalls positiv orientierte aber

unmodifizierte und vollständig komplementäre cRNA zu synthetisieren, ist bislang nicht vollständig aufgeklärt; es gibt aber verschiedene Hypothesen, die im Folgenden beschrieben werden:

Akkumulation von neusynthetisiertem NP induziert Beginn der Replikation

Es konnte gezeigt werden, dass der Wechsel von Transkription zu Replikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* abhängig von ungebundenem NP ist (Beaton and Krug, 1986; Shapiro and Krug, 1988) und eine vollständige cRNA-Synthese nur in Gegenwart des NP erfolgen kann (Honda et al., 1988). Im Gegensatz zur mRNA liegen sowohl cRNA als auch vRNA in der Zelle mit NP komplexiert vor. Eine mögliche Erklärung für den Wechsel von mRNA zu cRNA Synthese wäre also, dass sich die akkumulierenden Nukleoproteine an die vRNA anlagern, dadurch das oligo-U-Signal verdecken und so das Stottern der Polymerase verhindern (Shapiro and Krug 1988). Somit könnte die Polymerase ungehindert über die Sequenz bis zum 5'-Ende fortfahren. Zusätzlich zur Rolle des NP konnten Beaton & Krug zeigen, dass die Synthese positiv orientierter RNA durch das Anfügen einer m⁷G-Cap auch in Anwesenheit von freiem NP zur Polyadenylierung führt, während die Synthese positiv orientierter RNA durch ein ApG-Dinukleotid eine vollständige cRNA-Synthese einleitet (Beaton and Krug 1986). Daraus folgt, dass schon der Beginn der Transkription (mit Primer oder ohne) über die Art der synthetisierten RNA-Spezies entscheidet.

Abhängigkeit des Wechsels von Nukleotid-Konzentration

Unterstützend zu den Daten über den Einfluss der Startbedingungen konnte durch *in vitro* Studien gezeigt werden, dass für einen Wechsel von mRNA- zu cRNA-Synthese die Konzentration der für die Initiation notwendigen Triphosphat-Nukleotide ATP, GTP und CTP hoch sein muss, während die primer-abhängige mRNA-Synthese davon nicht betroffen ist (Vreede and Brownlee, 2007; Vreede et al., 2008).

Regulation des Wechsels durch NS2/NEP

Es konnte gezeigt werden (Robb et al., 2009), dass das NS2/NEP (*nuclear export protein*), welches durch Spleißen der auf Gensegment 8 kodierten mRNA entsteht, einen starken Einfluss auf die relativen Mengen von mRNA und cRNA hat. Sowohl in Infektionsstudien, als auch im Mini-Replikon System wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von NEP/NS2 zu einer Zunahme der cRNA-Menge führt. Die Autoren diskutieren zwei mögliche Modelle: Einerseits könnte das NEP die cRNA vor zellulären Endonukleasen schützen. Die RNP-Struktur muss während der vRNA-Synthese lokal aufgelöst werden, um das Ablesen der cRNA möglich zu machen. Hier könnte ein

Angriffspunkt für Endonukleasen liegen, die Fremd-RNA spalten. Andererseits postulieren die Autoren ein Stabilisierungsmodell, bei dem der vRNP durch NEP stabilisiert und damit quasi kurzfristig inaktiviert wird und somit nicht für weitere Transkriptionsvorgänge zur Verfügung steht. Dadurch ließe sich der Rückgang der mRNA bei Akkumulation der vRNPs erklären.

Die von Robb et al. veröffentlichten Daten widersprechen in Teilen einer früheren Publikation von Bullido et al., die eine generelle Reduktion von viralen RNA-Spezies in Abhängigkeit der NEP/NS2-Menge beobachten konnten (Bullido et al., 2001). Allerdings wurde in dieser Arbeit mit einem Vaccinia-basierten System gearbeitet, und Robb et al. führen die unterschiedlichen Ergebnisse darauf zurück.

Nachdem die ursprüngliche vRNA in cRNA umgeschrieben wurde, dient diese im zweiten Schritt der Replikation als Matrize für die Synthese von Nachkommen-vRNA. Auch hier gibt es bislang nur Modelle, der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt. Gezeigt werden konnte bislang, dass das NP für die Akkumulation von vRNA *in vitro* und *in vivo* essentiell ist (Mena et al., 1999; Newcomb et al., 2009; Shapiro and Krug, 1988; Thierry and Danos, 1982) und dass die zellulären Faktoren UAP65 (Momose et al., 2001) und Tat-SF1 (Naito et al., 2007) bei der Assemblierung des vRNP eine wichtige Rolle spielen. In einer neueren Studie von Perez et al. wird ein weiterer Mechanismus beschrieben, der die Synthese kurzer, 22-27 Basen langer RNA Fragmente als Regulationsfaktor für den Wechsel von mRNA- zu cRNA- und vRNA-Synthese identifiziert. Sie spekulieren, dass die Interaktion der cRNA mit freiem NP erst zur Synthese vollständiger cRNA führen kann, und vorher die Synthese abbricht. Diese Fragmente dienen einer neuen Polymerase *in trans* als Promotor-Element um die Replikation der cRNA zu vRNA zu ermöglichen. Sie zeigen zudem, dass die Synthese der kurzen Fragmente in Anwesenheit des NEP/NS2 geschieht. Dieses Modell schließt somit die beschriebenen Faktoren, die für den Wechsel von Transkription zu Replikation essentiell sind, ein und erweitert es um die svRNA (*small viral RNA*) (Perez et al., 2010). 2009 postulierten Jorba et al. (Jorba et al., 2009) ein Modell zur vRNA-Replikation (Abb. 1.17, (Resa-Infante et al., 2011)): Demnach liegt die cRNA als cRNP im Zellkern vor, bis eine zweite, neue Polymerase (Abb. 1.17 B; *non-resident polymerase 1*, NRP 1) das 3'-Ende der RNA bindet und mit der Replikation zu vRNA beginnt. Die neu synthetisierte vRNA wird direkt von freien NP-Molekülen komplexiert. Sobald die Strangsynthese durch NRP 1 weit genug fortgeschritten ist, kann eine weitere NRP an die cRNA binden und ebenfalls vRNA synthetisieren. So entsteht aus einer cRNA in multicistronischer Weise eine Vielzahl von vRNA-Kopien (Abb. 1.17 B und C). Die neuentstandene vRNA wird noch während

der Synthese am 5'-Ende durch eine weitere NRP (NRP 2, Abb. 1.17 B) gebunden, die aufgrund der stärkeren Bindung an die 5'-Enden (Tiley et al., 1994) dort verbleibt und am Ende als neue parentale Polymerase des vRNP dient (Abb. 1.17 D). Nach vollständiger Strangsynthese und Verpackung durch NP kann die neue parentale Polymerase NRP 2 auch das 3'-Ende der vRNA binden, wodurch die RNP-Bildung abgeschlossen wird.

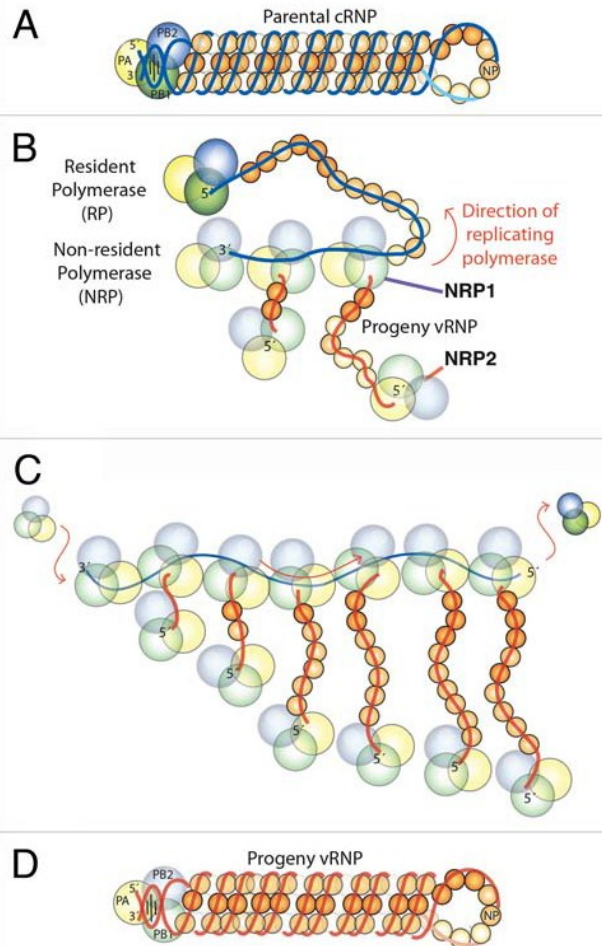


Abb. 1.17 Modell des zweiten Replikationsschrittes: die cRNA wird am 3'-Ende durch eine neue Polymerase gebunden (NRP 1 (B)), die in der Folge in trans die Strangsynthese zu vRNA durchführt. Dies ermöglicht multicistronisches Ablesen (C). Am Ende bindet eine weitere Polymerase NRP 2 an das freie 5'-Ende der vRNA, diese wird dann enkapsidiert und bildet einen neuen vRNP (D). Quelle: Resa-Infante et al., 2011.

1.3.4 Translation viraler Gene

Die Translation der viralen mRNA erfolgt an den zellulären Ribosomen. Lösliche Proteine wie das NP oder M1 werden an freien Ribosomen synthetisiert, membran-gebundene Proteine wie HA, NA oder M2 dagegen am rauen Endoplasmatischen Retikulum. Sie werden auf dem Weg zur Zellmembran über den Golgi-Apparat geführt und mit Zuckerseitenketten modifiziert (HA und NA) oder palmytoiliert (M2). Die Untereinheiten der viralen Polymerase werden in den Zellkern transportiert und unterstützen Transkription und Replikation, werden in Nachkommen-vRNPs verpackt und mittels NEP/NS2 aus dem Kern exportiert (O'Neill et al., 1998).

1.3.5 Virusreifung

Die exportierten vRNPs gelangen durch die zelluläre Transportmaschinerie an die Zellmembran, wo sie sich zusammen mit dem Matrixprotein 1 und den Oberflächenproteinen assoziieren. Nachdem durch die Signalsequenzen in den acht Gensegmenten ein komplettes Virusgenom zusammengelagert ist, kommt es zur matrixprotein-vermittelten Abschnürung der neuen Virionen von der Zellmembran. Die Neuraminidase spaltet durch Hydrolyse die um die Knospungsstelle befindlichen endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren ab und sorgt so dafür, dass die neugebildeten Virionen nicht an der Zellmembran verbleiben, sondern freigesetzt werden können.

1.4 Epidemiologie

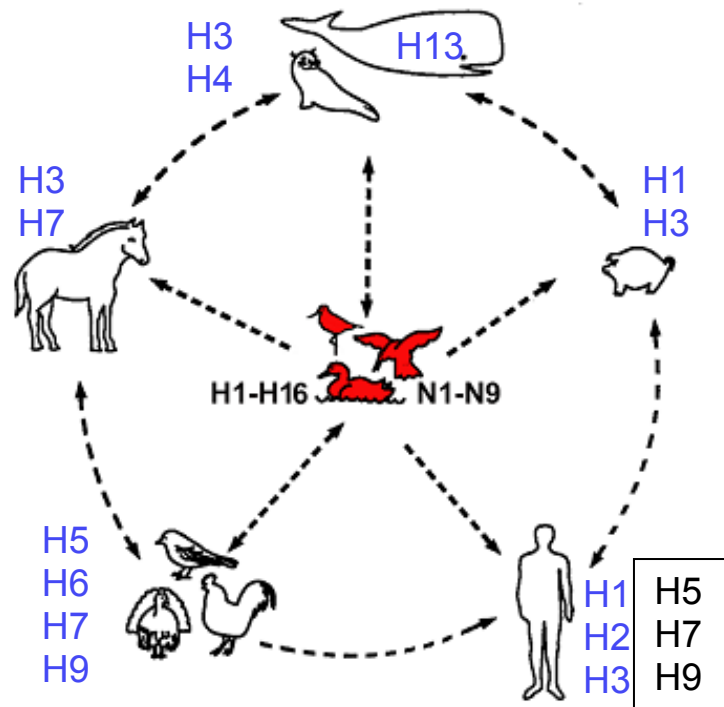
1.4.1 Niedrigpathogene aviäre Influenza Viren

Das natürliche Reservoir für Influenza-A-Viren sind wildlebenden Wasservögel unter anderem der Ordnungen *Anseriformes* (Enten, Gänse und Schwäne) und *Charadriiformes* (z.B. Möwen, Seeschwalben) (Hinshaw et al., 1980; Webster et al., 1992). In diesen Vogelspezies zirkulieren alle bislang bekannten 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidase-Subtypen in sämtlichen Kombinationen, die durch Ko-Infektion einzelner Vögel ihre Gensegmente reassortieren können. Influenza-A-Viren replizieren in Wasservögeln im Respirations- und Gastro-Intestinal-Trakt, die Übertragung findet über die fäkal-orale Route statt.

Die Infektion verläuft in der Regel mild, da sich die Viren nicht systemisch ausbreiten. Dies liegt vor allem an der lokalen Expression HA-spaltender Serinproteasen. Welche Proteasen *in vivo* an der Reifespaltung des HA beteiligt sind, und wo genau die Spaltung stattfindet (ob intra- oder extrazellulär), ist bislang nicht geklärt. Studien an human Atemwegs- und Intestinalzellen konnten allerdings zeigen, dass die Proteasen HAT (*human airway trypsin-like protease*), TMPRSS2 und TMPRSS4 (*transmembrane protease serine S1 member S2, bzw. member S4*) die Spaltung vermitteln können (Bertram et al., 2010; Bottcher-Friebertshäuser et al., 2010; Bottcher et al., 2006). Diese Proteasen erkennen und spalten wie Trypsin oder andere trypsin-ähnliche Proteasen (z.B. Blutgerinnungsfaktor Xa, Trypsin, mini-Plasmin oder auch bakterielle Proteasen (Kido et al., 1992; Klenk et al., 1975; Murakami et al., 2001) das monobasische Spaltmotiv (Minimalsequenz xR↓Gx) in der Protein-Sequenz. Die Reifespaltung des HA0 ist für die Infektiosität der Viren essentiell, da nur so das kurze

Fusionspeptid am N-Terminus der HA2-Untereinheit freigelegt wird (Steinhauer, 1999). Die beiden HA-Untereinheiten HA1 und HA2 bleiben nach der proteolytischen Spaltung über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden.

Abb. 1.18 Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren. Das natürliche Reservoir stellen wildlebende Wasservögel. Von diesen Tieren kommt es immer wieder zur Übertragung von Viren auf andere Tierspezies. In blau dargestellt, HA-Subtypen die sich dauerhaft in den jeweiligen Spezies etablieren konnten. In schwarz, HA-Subtypen die sporadisch und ohne weitere Mensch-zu-Mensch Übertragung im Menschen Infektionen hervorrufen können (Übernommen und modifiziert aus (Webster et al., 1992)).

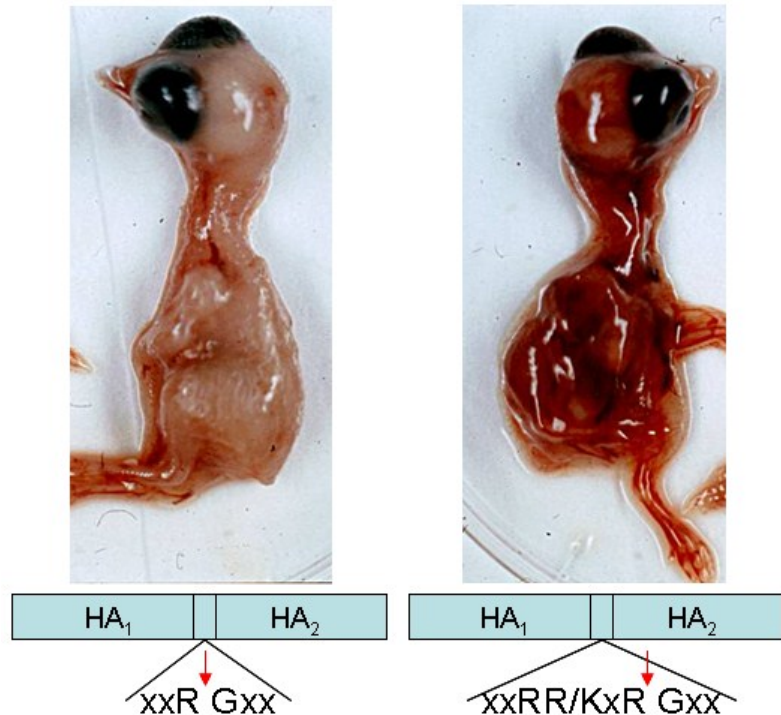


Viren mit einem monobasischen Spaltmotiv nennt man entsprechend ihrer geringen Pathogenität im Vogel LPAIV (*low pathogenic avian influenza virus*).

Gelegentlich kommt es zur Übertragung der Viren auf andere Vogelspezies. Von Bedeutung sind hier Infektionen von landlebendem Geflügel wie z.B. Hühnern, Wachteln oder Truthähnen. Neben der Übertragung von LPAIV auf landlebendes Geflügel werden auch sporadisch andere Tierspezies wie z.B. Schweine, Pferde oder Robben infiziert. Hier sind es aber nur wenige Subtypen, die sich erfolgreich an die neuen Wirte anpassen konnten und zur andauernden Zirkulation in diesen Spezies in der Lage sind (z.B. H1N1 & H3N2 im Schwein, H3N8 & H7N7 im Pferd und H7N7 in der Robbe).

1.4.2 Hochpathogene aviäre Influenza Viren

Abb. 1.19 Beispiel für eine Infektion von etwa 11 Tage alten Hühnerembryonen mit einem LPAIV (links) und einem HPAIV (rechts). Während das niedrig-pathogene Virus im Huhn aufgrund der monobasischen Spaltstelle im HA nur lokal zu einer Infektion führt, kommt es durch die Erweiterung der Spaltstelle zu einem multibasischen Motiv zur systemischen Ausbreitung der Viren. Es entwickeln sich schwere Hämorrhagien an denen das Geflügel in der Regel verstirbt. Adaptiert nach (Klenk, 2005).



Aus noch nicht geklärten Gründen, kann sich im Huhn aus dem monobasischen Spaltmotiv des HA durch Insertion von 3-5 Aminosäuren vor der Spaltstelle ein sogenanntes multibasisches Spaltmotiv (Minimalsequenz $xRxR/KR\downarrow Gx$ (Garten et al., 1991; Kawaoka and Webster, 1988; Vey et al., 1992) entwickeln, welches nicht nur von trypsin-ähnlichen Proteasen erkannt und gespalten werden kann, sondern auch von der ubiquitär exprimierten subtilisin-ähnlichen Protease Furin (Stieneke-Grober et al., 1992). Durch diese Mutation kommt es im Huhn zu einer systemischen Ausbreitung der Viren und Infektion diverser Organe (z.B. Gehirn, Milz), was schwere Hämorrhagien (Abb. 1.19) und den Tod des Geflügels zur Folge hat. Bislang ist der Erwerb einer solchen multibasischen Spaltstelle nur in den HA-Subtypen H5 und H7 beobachtet worden. Ein genauer Grund, warum es nur in diesen Subtypen zu dieser Veränderung kommt ist allerdings noch nicht bekannt. Viren mit einer multibasischen Spaltstelle nennt man entsprechend ihrer hohen Pathogenität HPAIV (*highly pathogenic avian influenza virus*).

1878 erkannte Perroncito, dass es sich bei der Geflügelpest um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt, das von anderen Erkrankungen der Hühner mit schweren Verlaufsformen unterschieden werden muss. 1901 konnte von Centanni und Savonuzzi gezeigt werden, dass der Erreger der Geflügelpest (*fowl plague*) filtrierbar ist (Daten entnommen aus den Reviews (Alexander and Brown, 2009; Lupiani and Reddy,

2009)). Es dauerte dann bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts, bis gezeigt werden konnte, dass die Geflügelpestviren (*fowl plague virus*, FPV) Influenza A Viren sind (Schäfer, 1955). Serologische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei den FPV um Viren des Subtyps H7 handelte. Erst 1959 konnte ein serologisch von der klassischen Geflügelpest unterschiedliches weiteres HPAI Virus aus einer Hühnerzucht in Schottland isoliert werden (Pereira et al., 1965), das dem Subtyp H5 zugeordnet wurde. Seit dieser Zeit konnten in sporadischen Abständen immer wieder Ausbrüche durch die HPAI der Subtypen H7 und H5 in Zuchtgeflügel, aber auch in wildlebenden Vögeln beobachtet werden. In den Jahren zwischen 1959 und 1995 kam es weltweit zu 14 Ausbrüchen von HPAIV (Alexander, 2000), die allerdings lokal beschränkt blieben. 1996 kam es dann zu einem Ausbruch hochpathogener H5N1 Viren auf einer Gänsefarm in der chinesischen Provinz Guangdong. Das isolierte Virus A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) gilt aufgrund phylogenetischer Studien als Ursprung für die darauf folgenden Epidemien in China, Südostasien und letztendlich der Welt, mit Ausnahme Amerikas und Australiens (Cheung et al., 2007; Duan et al., 2008; Guan et al., 2002; Hoffmann et al., 2000b; Neumann et al., 2010; Xu et al., 1999).

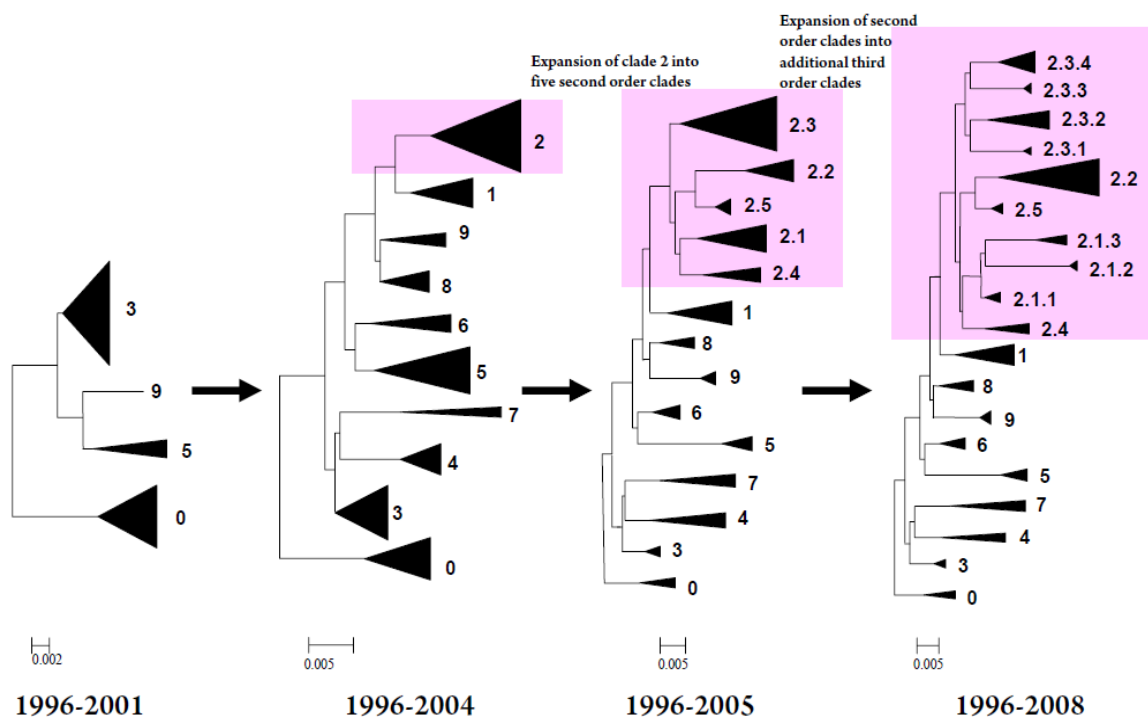


Abb. 1.20 Phylogenese der hochpathogenen H5N1-Viren nach 1996. Der gemeinsame Ursprung aller derzeit kursierenden HPAIV des Subtyps H5N1 ist A/Goose/guangdong/1/96. Sobald die Sequenz eines HA um mehr als 1,5% vom Ursprung abweicht, wird es in eine neue Klade sortiert. Quelle: WHO http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/#.

Die derzeit kursierenden H5N1 Viren lassen sich aufgrund ihrer genetischen Konstellation in mehr als 30 Genotypen differenzieren (Neumann et al., 2010). Da sich aber das HA von A/Goose/Guangdong/1/96 als einzige Konstante in allen Genotypen identifizieren lässt, führte die WHO 2008 eine einheitliche Klassifizierung basierend auf der HA-Phylogenie ein. Sie sieht die Gliederung der Viren nach Veränderungen in der HA-Sequenz vor, und definiert eine neue HA-Klade, sobald sich die Sequenz um mehr als 1,5% von der Referenz unterscheidet (Abb. 1.20). Nachdem es im Jahr 2005 zu einem großen Ausbruch hochpathogener H5N1 Viren unter wildlebenden Wasservögeln am Qinghai-See in China kam, breitete sich der damals vorherrschende Genotyp Z₁ in Richtung Europa und Afrika aus (Tabelle 1.3).

Asien		Europa		Afrika	
1996	China	2005	Russland	2006	Nigeria
2003	Südkorea	2005	Rumänien	2006	Ägypten
2004	Vietnam	2005	Kroatien	2006	Niger
2004	Japan	2005	Ukraine	2006	Kamerun
2004	Thailand	2006	Bulgarien	2006	Burkina Faso
2004	Kambodscha	2006	Griechenland	2006	Sudan
2004	Laos	2006	Italien	2006	Elfenbeinküste
2004	Indonesien	2006	Slowenien	2006	Dschibuti
2004	Malaysia	2006	Deutschland	2007	Ghana
2005	Kasachstan	2006	Frankreich	2007	Togo
2005	Mongolei	2006	Österreich	2007	Benin
2005	Türkei	2006	Bosnien-Herzegowina		
2005	Kuwait	2006	Slowakei		
2006	Irak	2006	Ungarn		
2006	Iran	2006	Serbien		
2006	Indien	2006	Schweiz		
2006	Israel (Gaza)	2006	Polen		
2006	Aserbaidshan	2006	Albanien		
2006	Georgien	2006	Dänemark		
2006	Pakistan	2006	Schweden		
2006	Birma	2006	Tschechien		
2006	Afghanistan	2006	England		
2006	Israel	2006	Spanien		
2006	Jordanien				
2007	Bangladesch				
2007	Saudi-Arabien				
2009	Nepal				
2010	Bhutan				

Tab. 1.3 Auflistung der gemeldeten Erst-Isolierungen von hochpathogenen H5N1-Viren weltweit seit 1996 nach Jahreszahl und Kontinent. Innerhalb eines Jahrgangs folgt die Aufzählung der Meldung an die WHO (modifiziert aus http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html).

Die Viren, die derzeit in Europa und vor allem Nordafrika kursieren, tragen in der Regel ein HA der Klade 2.2, bzw. davon abgeleitete Kladen zweiter Ordnung (Ducatez et al., 2007; Kiss et al., 2006; Salzberg et al., 2007; Starick et al., 2008). Von besonderem Interesse sind diese Viren auch deshalb, weil sie seit 2005 die bekannte säugeradaptive Mutation PB2 E627K aufweisen (Chen et al., 2005; Liu et al., 2005) und möglicherweise einen weiteren Schritt zu einem neuen pandemischen Virus darstellen.

Die Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über den jeweils ersten gemeldeten Ausbruch von H5N1 Viren in den aufgelisteten Ländern. Spätere Ausbrüche (z.B. 1997, 2001 und 2002 in Hong Kong, (Duan et al., 2008; Guan et al., 2002; Li et al., 2004)) in den aufgelisteten Ländern sind aufgrund der großen Anzahl nicht berücksichtigt.

1.4.3 Humane Influenza

Wie andere Säugetiere auch, ist der Mensch empfänglich für die Infektion durch Influenza-A-Viren. Im Menschen haben sich im Laufe der letzten 100 Jahre drei HA- und zwei NA-Subtypen dauerhaft etablieren können: H1, H2 und H3 sowie N1 und N2, in den Kombinationen H1N1, H2N2 und H3N2. Allen humanen Influenza-A-Viren ist gemein, dass sie ein monobasisches Spaltmotiv im Hämagglutinin besitzen.

1.4.3.1 Pathogenese der humanen Influenza

Die Übertragung der Viren erfolgt über Aerosole, das heißt kleine Tröpfchen, die beim Husten oder Niesen in die Umgebung versprüht werden. Die Infektion erfolgt dann im oberen Atemwegstrakt. Hier werden die Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut infiziert, es kommt zur Virusvermehrung und Ausbreitung in den unteren Respirationstrakt. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen kommt es zum Ausbruch der ersten Symptome: Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Husten und Schnupfen. Während dieser Zeit werden Viren ausgeschieden. Die Infektion dauert in der Regel etwa ein bis zwei Wochen, danach hat das Immunsystem die Viren aus dem Körper eliminiert. In seltenen Fällen kommt es zu schwereren Verläufen der Infektion, der primären viralen Lungenentzündung: gelangen Viren tief in die Lunge, können Zellen des Lungenparenchyms infiziert werden, was zur Zerstörung des Gewebes und so zu Blutungen (Hämorrhagien) führt. Außerdem kann es in der Folge einer Influenza-Infektion zu Überinfektionen durch Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* kommen, die zu einer sekundären, bakteriellen Lungenentzündung führen. Diese Verlaufsformen

nehmen oft lebensbedrohliche Ausmaße an, und sind vor allem bei sehr jungen oder alten Patienten zu beobachten (Nach (Modrow et al., 2003)).

1.4.3.2 Epidemische und pandemische Influenza

Der Begriff Epidemie beschreibt die zeitliche und örtliche Häufung einer Krankheit in der menschlichen Population durch einen infektiösen Erreger. Tritt ein Krankheitserreger neu oder nach längerer Zeit wieder in der menschlichen Bevölkerung auf, und überschreitet die Infektionswelle Landes- und Kontinentalgrenzen, so spricht man von einer Pandemie.

Diese allgemeine Begriffsdefinition trifft auf Influenza-Viren nur bedingt zu, da Influenza-Viren weltweit und ganzjährig zirkulieren, mit saisonalen Hochzeiten im Frühjahr und Herbst. Stattdessen unterscheidet man epidemische und pandemische Influenza-Viren anhand ihrer antigenischen Eigenschaften: während ein Virus-Stamm in der menschlichen Bevölkerung zirkuliert, sammeln sich in den viralen Genen kontinuierlich Mutationen an, die die antigenen Epitope verändern und es den Viren so ermöglichen, die vorhandene Herdenimmunität zu umgehen. Dieser Vorgang wird als *antigenic drift* bezeichnet und beruht auf dem Zusammenspiel von Mutationsrate der viralen RNA-Polymerase und positivem Selektionsdruck durch das Immunsystem. Die virale Polymerase selbst besitzt keine Korrekturfunktion, wodurch sich eine Fehlerrate von etwa 10^{-5} ergibt (Nobusawa and Sato, 2006; Wong et al., 2011). Ermöglicht eine Mutation die Umgehung des Immunsystems, so kann sich ein solches Virus effizienter vermehren und ausbreiten, man spricht dann von einer Influenza-Epidemie.

Neben den regelmäßig auftretenden, saisonalen Influenza-Epidemien kam es im Verlauf der vergangenen 100 Jahre zu mehreren großen Influenza-Pandemien: 1890, 1918, 1957, 1968 und 2009. Zu einer solchen Pandemie kann es kommen, wenn ein Virus mit neuen Oberflächenproteinen HA und NA (der sogenannte *antigenic shift*) auf eine immunologisch naive Bevölkerung trifft, und die vorhandenen protektiven Antikörper nicht mit den neuen Antigenen kreuzreagieren können. Diese Viren werden entweder *in toto* vom Tier auf den Menschen übertragen, oder sie entstehen durch Austausch einzelner Gene (Reassortation). So wurde im Jahr 1918 ein Virus vom Subtyp H1N1 entweder vom Vogel direkt, oder über das Schwein als Zwischenwirt, auf den Menschen übertragen. Die als „spanische Grippe“ bezeichnete Pandemie, die im Herbst/Winter 1918-1919 weltweit für 20-50 Millionen Todesfälle verantwortlich war (Johnson and Mueller, 2002), war eine der schwersten und größten Pandemien der neueren Geschichte.

Die Viren vom Subtyp H1N1 zirkulierten in der Folge bis zum Jahr 1957. Durch Reassortation mit einem aviären Virus (Scholtissek et al., 1978) wurden im Jahr 1957 die beiden Oberflächenproteine H1 und N1 durch die Subtypen H2 und N2, sowie das ursprüngliche PB1-Protein durch ein anderes ersetzt. Die als „Asiatische Grippe“ bezeichnete Pandemie durch den Subtyp H2N2 forderte 1-1,5 Millionen Tote. 1968 kam es zum erneuten Austausch des Oberflächenproteins H2 durch ein H3 aviären Ursprungs, sowie des PB1-Proteins. Die so entstandenen Reassortanten führten zur dritten großen Pandemie im 20. Jahrhundert, der „Hong Kong-Grippe“ mit etwa 1 Millionen Todesopfern. Die Viren des Subtyps H3N2 verdrängten in der Folge die H2N2 Viren vollständig und zirkulieren seit dem in der menschlichen Bevölkerung. Im Jahr 1977 kam es zu einer Renaissance der ehemals pandemischen Viren des Subtyps H1N1, vermutlich aus dem russischen Raum. Aufgrund der noch vorhandenen Immunität in großen Teilen der Bevölkerung kam es aber hier zu keiner schweren Pandemie. Da die Viren aber bereits über etliche Jahrzehnte an den Menschen angepasst waren, konnten sie sich als zweite Viruslinie dauerhaft etablieren. So zirkulierten bis 2009 Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 in Menschen und verursachten die saisonalen Influenza-A-Infektionen. Die sogenannten saisonalen Viren vom Subtyp H1N1 wurden schließlich im Jahr 2009 vollständig durch eine Vierfach-Reassortante aus dem Schwein (der sogenannten „Schweinegrippe“), ebenfalls Subtyp H1N1 verdrängt. Dieses neue Virus trägt Gene von humanen (PB1 aus H3N2 stammend), aviären (PB2 und PA), klassischen Schweineinfluenza-Viren (HA, NP und NS) sowie Viren der eurasischen Schweineinfluenza-Linie (NA und M) (Garten et al., 2009; Smith et al., 2009), und verbreitete sich innerhalb kürzester Zeit weltweit und verursachte so die letzte Pandemie. Der Pandemie-Status wurde im August 2010 durch die WHO als beendet erklärt.

1.4.3.4 HPAIV Infektionen beim Menschen

Anders als eine Infektion durch ein saisonales, humanes Influenza-A-Virus der Subtypen H1N1 oder H3N2, bei der die Erkrankung auf den Atemwegstrakt lokal beschränkt bleibt und in der Regel mild verläuft, führen Infektionen durch HPAIV des Subtyps H5 meistens zu sehr schweren Krankheitsverläufen, die oft tödlich enden (de Jong et al., 1997; de Jong et al., 2006; Kandun et al., 2006; Shinya et al., 2005). Hochpathogene Viren des Subtyps H7, die in der Vergangenheit von Geflügel auf Menschen übertragen wurden, verursachten dagegen in der Mehrzahl milde Symptome oder Konjunktivitis (Banks et al., 1998; Fouchier et al., 2004; Lang et al., 1981). Durch die Veränderung im Spaltmotiv des HA sind HPAIV in der Lage, sich über den Respirationstrakt hinaus im Organismus zu verbreiten und andere Organe wie

Leber, Milz oder das Gehirn zu infizieren (Claas et al., 1998). Wie im Huhn führt die systemische Ausbreitung der Viren im Menschen in der Folge zu multiplem Organversagen durch Zerstörung der Gewebe und Hämorrhagien. Des Weiteren verursachen hochpathogene Influenza-A-Viren des Subtyps H5N1 oft eine überschießende Reaktion des Immunsystems, den so genannten Zytokin-Sturm (*cytokine storm* bzw. *cytokine burst*) (Carter, 2007; Cheung et al., 2002; de Jong et al., 2006; Seo et al., 2002).

1.5 Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität

Die Pathogenität von Influenza-A-Viren wird durch etliche virale Faktoren beeinflusst. Neben dem NS1-Protein, das eine wichtige Rolle bei der Modulation der interferon-abhängigen Immunantwort spielt (Billharz et al., 2009; Gack et al., 2009; Garcia-Sastre et al., 1998; Nemeroff et al., 1998; Stasakova et al., 2005) und dem PB1-F2 Protein, für das eine Funktion als apoptose-induzierender Faktor (Conenello and Palese, 2007; McAuley et al., 2007) beschrieben wurde, sind die wichtigsten Determinanten für das Wirtsspektrum und die Pathogenität die beiden Oberflächenglykoproteine HA und NA sowie die virale Polymerase.

1.5.1 Die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase

1.5.1.1 Hämagglutinin

Eine wichtige Determinante für das Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren ist das Hämagglutinin. Zum einen ist es für die Erkennung der zellulären Rezeptoren und somit für das erfolgreiche Anhaften eines Virus an die Zelle und das Eindringen von essentieller Bedeutung. Zum anderen ist das HA Ziel der humoralen Immunantwort und wird durch spezifische Antikörper inhibiert.

Die Adsorption eines Virus an eine Zelle kann nur dann erfolgreich sein, wenn die Rezeptor-Erkennungs-Stelle (*receptor binding site*; RBS) die passende Rezeptor-Spezifität aufweist. In Vögeln sind die Rezeptorproteine auf den Epithelzellen des Gastro-Intestinal-Trakts durch α 2-3 glykosidisch gebundene N-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäuren) bedeckt (Baum and Paulson, 1990), weshalb aviäre Influenza-A-Viren diese besonders effizient, wenn nicht sogar ausschließlich, erkennen und binden können. Die Epithelzellen des oberen menschlichen Respirationstrakts dagegen tragen hauptsächlich α 2-6 glykosidisch gebundene N-Acetyl-Neuraminsäuren (Couceiro et al., 1993), wodurch eine Infektion durch aviäre Viren möglich, wenn auch erschwert ist (Beare and Webster, 1991). Matrosovich et al. konnten jedoch zeigen, dass auch im

humanen Atemwegsepithel Zellen mit α 2-3-gebundenen Sialinsäuren vorkommen, die entsprechend effizienter von aviären Viren infiziert werden können (Matrosovich et al., 2004). Kommt es zur Mutation der RBS, ermöglicht dies den ursprünglich vogeltypischen Viren auch im Menschen erfolgreich zu replizieren. Hierfür sind nur wenige Aminosäuresubstitutionen in oder in der Nähe der RBS nötig: im H3 ist der Austausch Q226L und G228S ausreichend um die Rezeptorspezifität von α 2-3- zu α 2-6-gebundenen Sialinsäuren zu verändern (Connor et al., 1994). Als Bindeglied für die Übertragung aviärer Influenza-A-Viren auf den Menschen wird das Schwein betrachtet (Scholtissek, 1990), da auf dem Atemwegsepithel des Schweins sowohl α 2-3- als auch α 2-6-Sialinsäuren vorhanden sind (Ito et al., 1998). Die Viren können also während einer Infektionsphase durch Mutation die Fähigkeit zur Erkennung der humanen α 2-6-Sialinsäuren erwerben und vom Schwein auf den Menschen übertreten.

Neben der Rezeptorbindung ist die Spaltung des HA0 in die Untereinheiten HA1 und HA2 von essentieller Bedeutung, wie unter 1.4.1 und 1.4.2 beschrieben.

1.5.1.2 Neuraminidase

Die Neuraminidase ist maßgeblich für die erfolgreiche Freisetzung neugebildeter Virionen von der infizierten Zelle verantwortlich. Durch die Sialidase-Aktivität des Enzyms werden endständige Sialinsäure-Reste von Proteinen auf der Zelloberfläche abgespalten, und so können naszente Viren nicht erneut an derselben Zelle oder aneinander anhaften (Palese and Compans, 1976; Palese et al., 1974). Von besonderer Bedeutung für die Virulenz ist aber nicht nur die Aktivität der Neuraminidase, sondern vielmehr die Balance zwischen der Adsorptions-Effizienz des HA und der Hydrolyse der Sialinsäuren (Matrosovich et al., 1999; Wagner et al., 2002): ist die NA zu aktiv, werden die Sialinsäuren zu schnell abgespalten und es kann keine effiziente Adsorption mehr stattfinden. Ist die NA nicht aktiv genug, kommt es nach Knospung der Virionen zur erneuten Adsorption, und die Viren bleiben auf der Zelloberfläche „kleben“. Des Weiteren wird die hydrolytische Aktivität der Neuraminidase zur Auflösung der Mucus-Schicht über dem Atemwegsepithel benötigt. Die im Mucus enthaltenen Sialinsäuren binden Viren und verhindern so ihre Ausbreitung (Matrosovich and Klenk, 2003).

Und gleich dem Hämagglutinin ist die Neuraminidase Ziel NA-spezifischer neutralisierender Antikörper, die als Teil der humoralen Immunantwort der Bekämpfung der Viren dienen.

Auf therapeutischer Ebene ist die Neuraminidase das Ziel von Neuraminidase-Hemmern wie z.B. Oseltamivir (Tamiflu®, Roche), die das aktive Zentrum des Enzyms

sterisch blockieren und eine Freisetzung neuer Viren verhindern. Allerdings kommt es hier oft zu Resistenzbildung durch Mutationen im aktiven Zentrum, wodurch die Wirksamkeit der Medikamente herabgesetzt wird.

1.5.2 Die virale Polymerase

Neben der erfolgreichen Adsorption und Fusion eines Viruspartikels mit der Zelle müssen Influenza-A-Viren noch eine zweite Barriere überwinden, die Zellkernmembran. Da die Viren außerdem zur Replikation auf die zelluläre Transkriptionsmaschinerie angewiesen sind, ist auch eine Anpassung an die speziesspezifischen Bedingungen im Nukleus notwendig. Dass die Polymerase einen wichtigen Einfluss auf den Wirtstropismus von Influenza-A-Viren hat, konnte bereits 1977 von J.W. Almond (Almond, 1977) gezeigt werden. Die Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten adaptiven Mutationen innerhalb der viralen Polymerase.

Virus	Wirtswechsel	PB1 13	627	PB2 701	714	PA 615	NP 319	
H3N2	a - c		E - K					Subbarao et al., 1993
H5N1	a - m		E - K					Hatta et al., 2001
H7N7	a - m			D - N				Yao et al., 2001
H5N1	a - h		E - K					Naffakh et al., 2002
H5N1	a - m			D - N				Li et al., 2005
SC35/M (H7N7)	a - m	L - P		D - N	S - R	K - N	N - K	Gabriel et al., 2005
H5N1	a - h	L - P	E - K	D - N		K - R		de Jong et al., 2006

Tab. 1.4 Auflistung der Aminosäuresubstitutionen bei Wirtswechsel in den Polymerase-Proteinen und NP. Wirtswechsel: a, aviär; h, human; m, murin; c, canin. Die Erstbeschreibung ist in den angegebenen Publikationen zu finden.

Wie im Abschnitt über die Polymerase beschrieben, gibt es einige Untersuchungen zu den Austauschen PB2 E627K (Hatta et al., 2001; Mehle and Doudna, 2008; Moncorge, Mura, and Barclay, 2010) und PB2 D701N (Gabriel et al., 2007; Gabriel et al., 2005; Li et al., 2005) und ihre Rolle beim Wirtswechsel. Die Rolle der anderen Mutationen (PB1 L13P, PB2 S714R, PA K615N/R und NP N319K) ist dagegen noch weitgehend unbekannt. Für alle Substitutionen konnte nachgewiesen werden, dass sie die Pathogenität der Viren für Mäuse steigern (Hatta et al., 2001; Gabriel et al., 2007; Li et al., 2005). Nachdem He et al. die Kristallstruktur der N-terminalen PA Domäne zusammen mit dem C-Terminus der PB1 Untereinheit aufklären konnten, vermuten sie,

dass der Austausch PB1 L13P die Interaktion der beiden Proteine verändert und so zur Steigerung der Pathogenität beiträgt (He et al., 2008). Für NP N319K konnte gezeigt werden, dass der Kernimport des NP gesteigert wird (Gabriel, Herwig, and Klenk, 2008).

1.6 Fragestellung der Arbeit

1.6.1 Grundlage

In der Vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, in wie weit sich die im Modellsystem SC35/SC35M gewonnenen Erkenntnisse zur Anpassung aviärer Influenza-A-Viren an den Säuger auf natürliche Isolate hochpathogener Viren übertragen lassen. Das SC35/SC35M-Modellsystem beruht auf dem Isolat A/Seal/Mass/1/80 (H7N7), welches zuerst durch serielle Passage in primären Hühnerzellen an das Huhn adaptiert wurde (SC35). Während der seriellen Passage erwarb das Virus durch Mutation eine multibasische Spaltstelle im HA (Li et al., 1990) (siehe dazu auch 1.4.2). Das jetzt hochpathogene Virus SC35 wurde anschließend durch Passage in der Mauslunge an die Maus adaptiert (SC35M)(Scheiblaue et al., 1995). SC35 ist hochpathogen für Hühner aber apathogen in der Maus, während SC35M auch hochpathogen für Mäuse ist. Anhand von Sequenzvergleichen konnten neun Aminosäureaustausche identifiziert werden, von denen sechs für den erweiterten Wirtstropismus und die gesteigerte Pathogenität in der Maus verantwortlich sind (Tabelle 1.4). Die Charakterisierung dieser Mutationen erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Gülsah Gabriel (Gabriel et al., 2005).

1.6.2 Das Virus A/Thailand/1 (Kan-1)/04 (H5N1)

Um die im Modellsystem erworbenen Erkenntnisse auch auf hochpathogene Viren des Subtyps H5N1 übertragen zu können, wurde das humane Isolat A/Thailand/1 (Kan-1)/04 (H5N1) (im Folgenden als Kan-1 bezeichnet) als Basis zur Erstellung eines reversen Genetik Systems genommen. Das Kan-1 Virus wurde im Jahr 2004 während einer Ausbreitungsphase von 2003-2004 in Thailand isoliert (Puthavathana et al., 2005). Die Viren, die sich damals vermutlich von Süd Korea aus in süd-ost Asien ausbreiteten (siehe auch Tabelle 1.3, sowie „CDC/WHO Avian Influenza Response Team, 2004“ <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5305a1.htm>), führten aber nur in Vietnam und Thailand zu Infektionen in Menschen. In Thailand erkrankten damals vier Kinder im Alter von 6-7 Jahren und eine 58 jährige Frau. Das in dieser

Arbeit verwendete Isolat Kan-1 stammt aus einem 6-jährigen Jungen, der wie alle anderen Erkrankten an der Infektion verstarb.

1.6.3 Zielsetzung

Das Kan-1 Virus wurde vermutlich direkt vom Vogel auf den Menschen übertragen. Es weist aber, trotz der Replikation im Menschen und hohen Pathogenität, nach wie vor aviär-typische Gensequenzen auf – mit einer Ausnahme: Im PB2-Protein erfolgte ein Austausch von Aspartat zu Asparagin an Position 701 (D701N). Dieser Austausch steht, wie weiter oben beschrieben, im Zusammenhang mit der Anpassung aviärer Viren an Säuger. Da diese Mutation bislang aber nur in Kombination mit anderen Mutationen beobachtet werden konnte, und nicht alle der 2004 in Thailand isolierten Viren diese Mutation aufwiesen, stellte sich die Frage, inwieweit der Austausch D701N allein möglicherweise zu einem erweiterten Wirtstropismus und einer gesteigerten Pathogenität von H5N1-Viren beitragen kann.

Dies ist vor allem deshalb interessant, da die Substitution D701N unabhängig auch in weiteren humanen Isolaten des Subtyps H5N1 identifiziert werden konnte, alternativ zu der bekannten Substitution E627K, die ebenfalls in vielen humanen H5N1 Isolaten aufgetreten ist (z.B. A/Vietnam/1203/04; (Salomon et al., 2006)). Diesen Virusisolaten ist gemein, dass sie oft aus Patienten mit schweren oder tödlichen Krankheitsverläufen gewonnen wurden.

Des Weiteren sollte eine zweite Substitution in der PB2-Untereinheit untersucht werden, die im SC35/SC35M Modell identifiziert wurde, aber keine Entsprechung in natürlichen Isolaten hat: der Austausch S714R im PB2-Protein (Tabelle 1.4). Eine phylogenetische Untersuchung diverser hoch- und niedrigpathogener Isolate ergab (Gabriel et al., 2005), dass in der Folge des H5N1-Ausbruchs von 1996 in Guangdong eine Reihe verwandter H5N1-Isolate aufgetreten ist, die aufgrund ihrer genetischen Komposition als goose-guangdong-ähnliche Viren bezeichnet werden (Guan et al., 2002). Diese Viren zeigten in den Untersuchungen einen erweiterten Wirtstropismus, sie sind hochpathogen für Hühner und Mäuse. Hier konnte in den PB2-Sequenzen unter anderem ein Austausch von S714 zu Isoleucin beobachtet werden, ohne dass andere bekannte Marker-Aminosäuren wie 627 oder 701 mutiert waren. Die Frage, die sich zu Beginn der Arbeit stellte, war, ob diese zweite Substitution einen unabhängigen Beitrag zur Adaptation aviärer Influenza-A-Viren an den Säugerwirt leistet, und welchen Einfluss sie auf die Pathogenität der Viren hat.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel-30

Adenosintriphosphat

Agarose, SeaKem LE

Ampicillin (Na-Salz)

Amidoschwarz 10B

Ammoniumpersulfat (APS)

Avicel

Bacto-Agar

Borsäure

Bromphenolblau (Na-Salz)

Calciumchlorid (CaCl₂)

N'N' Dimethylformamid (NN-DMF)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dithiothreitol (DTT)

dNTP-Mix [10mM]

Essigsäure (HAc)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Ethanol abs. (EtOH)

Ethidiumbromid (EtBr)

Fetal Calf Serum (FCS)

Formaldehyd 37%

Glutamin

Glycerin

Glycin

Glycogen

Hefeextrakt

Hühnerserum

Isopropanol

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

Kristalviolett

LipofectAmin2000

Luziferin

Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Roth, Karlsruhe

Fermentas, St. Leon-Rot

Lonza, USA

Sigma-Aldrich, Steinheim

Merck, Darmstadt

Bio-Rad, USA

FMC Biopolymer, USA

BD, USA

Fisher Scientific, UK

Sigma-Aldrich, Steinheim

Merck, Darmstadt

Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

Boehringer, Mannheim

Fermentas, St. Leon-Rot

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

Bio-Rad, USA

Gibco/Life Technologies, USA

Acros Organics, Belgien

Gibco/Life Technologies, USA

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roche, Mannheim

Merck, Darmstadt

Gibco/Life Technologies, USA

Sigma-Aldrich, Steinheim

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich, Steinheim

Invitrogen/Life Technologies, USA

Promega, USA

Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Milchpulver	Saliter, Obergünzburg
Natriumacetat (NaOAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
OptiMEM	Gibco/Life Technologies, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin	Gibco/Life Technologies, USA
Pepton (aus Casein)	Merck, Darmstadt
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Polyethylenglykol 4000 (PEG 4000)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA) 98% Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA) 30% Sol.	PAA, Cölbe
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Sodiumdodecylsulphat (SDS)	Merck, Darmstadt
Stop & Glo Substrat	Promega, USA
Streptomycin	Gibco/Life Technologies, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Belgien
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
True Blue Peroxydase Substrat	KPL, USA
Tryptose Phosphat Broth (TPB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco/Life Technologies, USA
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2 Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
Supersignal Chemiluminiszenz Kit	Thermo Scientific, USA
Taq-Master Mix Kit	Qiagen, Hilden

2.3 Enzyme

T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Esp3I	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA Polymerase	NEB, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
RNase A	Qiagen, Hilden

2.4 Plasmide

<u>pHW2000</u>	Bi-direktionales Expressionsplasmid. Enthält den Promotor für die humane RNA-Polymerase I und den Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor für die RNA-Polymerase II. Dieses Plasmid dient zur Generation rekombinanter Influenza-Viren nach dem Acht-Plasmid-System (Hoffmann et al., 2000). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Erich Hoffmann.
<u>pCAGGS</u>	Expressionsplasmid. Enthält zusätzlich zum RNA-Polymerase II-Promotor des CMV Verstärkerelemente des Aktin-Promotors aus dem Huhn.
<u>pCAGGS-blue</u>	wie pCAGGS. Die multiple cloning site (MCS) wurde durch die LacZ-Untereinheit der β -Galaktosidase und zwei flankierende Esp3I-Schnittstellen ersetzt um eine blau/weiß-Auswahl positiver Klone zu ermöglichen. Modifiziert von Dr. Olaf Pinkenburg.
<u>pPoll-NP-Luc</u>	enthält den Promotor der humanen RNA-Polymerase-I und Glühwürmchen-Luziferase als Reportergen (Zugangsnummer in der Datenbank: AF053462), das von Influenzaspezifischen 3'- und 5'-Enden der nicht-kodierenden Regionen des A/WS/33 Virus flankiert wird (Zugangsnummer in der Datenbank: M30746); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Wolff.
<u>MG3</u>	wie pPoll-NP-Luc aber mit dem Promotor der RNA-Polymerase I aus dem Huhn. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Schwemmler

2.5 Medien

2.5.1 Eukaryotische Zellen

<u>Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)</u>	10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
<u>2x Modified Eagle Medium (2xMEM)</u>	0,2% BSA 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
<u>RPMI 1640</u>	8% FCS 2% Hühnerserum 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
<u>HAM F10 Nutrient Solution</u>	10% FCS 2% Tryptose Phosphate Broth 1% Hühnerserum 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin

Overlay-Medium für Plaqueteste

Mit Bacto-Agar	Bacto-Agar 1,8% 1:1 mit 2x MEM
Mit Avicel	Avicel 2,5% 1:1 mit 2x MEM

Infektionsmedien

Wie Zellkulturmedien, nur das FCS bzw. Hühnerserum durch 0,2% BSA ersetzt wurde.

2.5.2 Prokaryotische Zellen

LB-Medium	NaCl	10g
	Hefe-Extrakt	5g
	Peptone	10g
	dH ₂ O	ad 1L, autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium	200ml
	Bacto-Agar	3g autoklavieren

LB-Agar mit Ampicillin

Zugabe von 200µl Ampicillin
(100mg/ml) nach Abkühlen des LB-
Agars auf ca. 42°C. In Petrieschalen
20ml/100mm Ø

2.6 Prokaryotische und Eukaryotische Zellen**Prokaryotische Zellen**

Escherichia Coli, Stamm XL-1 blue

Stratagene, La Jolla (USA)

Eukaryotische Zellen

HEK 293T (Human Embryo Kidney Cells)

Humane Nierenzelllinie

MDCK (Mardin Darby Canine Kidney Cells)

Epithelzelllinie aus der Hundeniere

LMH (Chicken Hepatocarcinoma Cells)

Hepatokarzinomzelllinie aus dem Huhn

QT-6 (Quail Japanese Fibrosarcoma Cells)

Fibrosarkomzelllinie aus der Wachtel

HTBE (Human Tracheo-Bronchial Epithelial Cells)

Primäre Zellen aus dem humanen Atem-
wegsepithel

2.7 Puffer und Lösungen

Avicel 2,5%	Avicel	2,5g
	dH ₂ O	100ml
Amidoschwarz (3x)	Amidoschwarz 10B	3,3g
	Formaldehyd 37%	324ml
	Essigsäure	70ml
	dH ₂ O	ad 1L
Bacto-Agar 1,8%	Bacto-Agar	1,8g
	dH ₂ O	100ml
Blot-PBS	NaCl	12g
	TWEEN-20	1ml
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	3,4g
	KH ₂ PO ₄	0,3g
	dH ₂ O	ad 1L
Entfärberlösung Amidoschwarz	Essigsäure	70ml
	dH ₂ O	ad 1L
Kristallviolett	Formaldehyd 37 %	270 ml
	Kristallviolett	1 g
	dH ₂ O	730 ml

Paraformaldehyd (PFA) 4%	PFA	40g
	PBS ^{def}	<i>ad</i> 1L
Permeabilisierungspuffer	Triton X-100 0,3%	1,5ml
	Glycin 20mM	0,75g
	PBS ^{def}	500ml
PBS++ (phosphate buffered saline)	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	MgCl ₂	0,1 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	CaCl ₂	0,13 g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1 l
PBSdef	wie PBS++, jedoch ohne MgCl ₂ und CaCl ₂	
SDS Laufpuffer	SDS	10g
	Glycin	144g
	Tris	30g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1L
SDS Protein-Ladepuffer (4x)	1M Tris/HCl pH6,8	2ml
	2% Bromphenol-Blau	0,5ml
	β-Mercaptoethanol	2ml
	SDS	0,8g
	Glycerin	4ml
	dH ₂ O	1,5ml
TAE (50x)	Tris	242g
	EDTA pH 8.0	0,5M
	Eisessig	100ml
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1L
TBE-Puffer (10x), pH 8, 3	TRIS	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,3 g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 100 ml
Transfer-Puffer	Tris	5,8g
	Glycin	2,9g
	Ethanol	200ml
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1L

TSS-Puffer (transformation and storage solution)	85 % LB-Medium	85 ml
	10 % PEG 4000	10 g
	5 % DMSO	5 ml
	50 mM MgCl ₂ pH 6,5	1,0165 g
	dH ₂ O	<i>ad</i> 100 ml
X-Gal Lösung (40mg/ml)	X-Gal	40mg
	N,N' DMF	1ml

2.8 Primer

Alle angegebenen Primer sind in 5' → 3' Orientierung dargestellt.

Zielgerichtete Mutagenese

Gs_Gd_D071N_F	ATT CTA GGC AGA GAG AAC AAA AGA TAT GGA CCA
Gs_Gd_D071N_R	TGG TCC ATA TCT TTT GTT CTC TCT GCC TAG AAT
Kan1_N701D_F	ATT CTA GGC AAG GAG GAC AAA AGG TAT GGA CCA
Kan1_N701D_R	TGG TCC ATA TCT TTT GTC CTC TCT GCC TAG AAT
GD/Kan1 S714I_F	AGC ATC AAT GAA CTG ATC AAT CTT GCA AAA GGG
GD/Kan1 S714I_R	CCC TTT TGC AAG ATT GAT CAG TTC ATT GAT GCT
GD/Kan1 S714R_F	AGC ATC AAT GAA CTG AGG AAT CTT GCA AAA GGG
GD/Kan1 S714R_R	CCC TTT TGC AAG ATT CCT CAG TTC ATT GAT GCT

Sequenzierung

pCAGGS-46-Rev	ATAATTTTTGGCAGAGGG
pCAGGS-46-For	ACGTGCTGGTTATTGTGC
pCM_Gs_NP_1118_F	CCCCTCGGAATGTTGCC
pCM_Gs_NP_2802_R	ACCTCCCGGCCCGGGGG
pHW-50_F	CTCACTATAGGGAGACCC
pHW-50_R	GAGGTATATCTTTCGCTCC
H5 HA 16F	AAA TGG AGA AAA TAG TGC
H5 HA 1185R	CTA TTG CCT TTT GAG TGG
PB2-52F	AGTCCCGCACTCGCG
PB2-1928-F	GAA TGT GAG AGG CTC
PB2-2215R	TAT GCT AGA GTC CCG
PB2-R1559	TCGCTGACCTCTTCGGG
PB2 940Fo	ATATGCAAGGCAGCAATGGG

Gs_NP_304_F	AAGGACCCAAAGAAAAGCTG
Gs_NP_799_F	GAGATTGAAGATCTCAT
Gs_NP_1297_F	CTTCCCTTCGAAAGAGCG
Sq_Gs_PB1_357F	GGA TAA ACT GAC CCA AGG
Sq_Gs_PB1_760F	TTT GTC GAA ACA CTA GCG
Sq_Gs_PB1_1164F	AAT CGA GAA AAT AAG ACC
Sq_Gs_PB1_1562F	CTG ACA TGA GCA TTG GTG
Sq_Gs_PB1_1961F	GCA TGG AAT ACG ATG CAG
Sq_Gs_PA_348F	ATT TAT TGA AAT TGG AGT GAC
Sq_Gs_PA_700F	GAT GGA TTC GAA CCG AAC GGC
Sq_Gs_PA_1127F	CAG AGA AAG TAG ACT TTG AGG
Sq_Gs_PB2_90_F	AAT CAA GAA ATA CAC ATC AGG
Sq_Gs_PB2_370_F	AGG TTA AAA CAT GGA ACC TTC
Sq_Gs_PB2_691_F	GTA TTG CAT TTG ACT CAA GGG
Sq_Gs_PB2_1084F	GAA TTC ACA ATG GTT GGG
Sq_Gs_PB2_1496F	ACC GTT TCT TGA GGG TCC

Klonierung in pCAGGS

In Fett: die zur Klonierung verwendete **Esp31-Erkennungssequenz**

Bm_PB2_pCAGGS_F	TATT CGTCTC AGGGAATGGAGAGAATAAAAGAA
Bm_PB2_pCAGGS_R	ATAT CGTCTC GTATTCTAATTGATGGCCATCCG
Bm_NP_pCAGGS_F	TATT CGTCTC AGGGAATGGCGTCTCAAGGCACC
Bm_NP_pCAGGS_R	ATAT CGTCTC GTATTTCAATTGTCATACTCCTCTGC
Bm_PA_pCAGGS_F	TATT CGTCTC AGGGAATGGAAGACTTTGTGCG
Bm_PA_pCAGGS_R	ATAT CGTCTC GTATTCTATTTTCAGTGCATGTGTGAGG
Bm_PB1_pCAGGS_F	TATT CGTCTC AGGGAATGGATGTCAATCCGACTTTAC
Bm_PB1_pCAGGS_R	ATAT CGTCTC GTATTCTATTTTTGCCGTCTGAGC

RNA-Extraktion

OUni12	AGCGAAAGCAGG
--------	--------------

2.9 Geräte

Gel Doc 2000	Bio-Rad, USA
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge MIKRO 22-R	Hettich, Tuttlingen
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad

Mikrowellengerät	Siemens, München
Optimax 2010	Protec GmbH, Oberstenfeld
PCR-Cycler GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems/Life Technologies, USA
PCR-Cycler GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems/Life Technologies, USA
Sterilbank HeraSafe KS 12	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, USA
Stickstoff-Tank Cryo 200	Thermo Fisher Scientific, USA
Stromquelle Electrophoresis Power Supply	Amersham Biosciences/GE Healthcare, UK
Thermoblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Waage Sartorius Excellence	Sartorius, Göttingen
Zellinkubator HeraCell 150	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Avanti J-25/J-26 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

Software

MicroWin 2000	Berthold Technologies, USA
BioEdit v.7.0.5.3	Ibis Biosciences, USA
Microsoft Office 2003-2010	Microsoft, USA
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA in großen Mengen zu erhalten, benötigt man Bakterien, die die Kompetenz besitzen, DNA aufzunehmen. Dazu werden am häufigsten zwei unterschiedliche Methoden angewandt, zum einen kann die DNA durch Elektroporation eingebracht werden, zum anderen auf chemischem Weg. In dieser Arbeit wurden ausschließlich chemisch-kompetente Bakterien der Stämme *E.coli* K12, TOP10 und XL-1 verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Protokolle zur Erzeugung der Kompetenz, eignen sich die jeweiligen Bakterien für ganz bestimmte Zwecke. Grundsätzlich müssen alle Schritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt werden, da ansonsten die Aufnahme-Kompetenz der Bakterien deutlich abnimmt.

CaCl₂-kompetente Bakterien:

5ml einer Übernachtskultur *E.coli* zu 45ml LB-Medium ohne Antibiotikum geben und ca. 2h bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 wachsen lassen. Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase und nehmen DNA am leichtesten auf. Die Kultur 5-10' auf Eis kühlen und in ein 50ml Zentrifugations-röhrchen überführen. Für 7' bei 7000rpm pelletieren und Überstand abgießen. Bakterienpellet in 10ml eiskaltem 0,1M CaCl₂ aufnehmen und 10' auf Eis inkubieren. Anschließend erneut bei 6500rpm für 7' zentrifugieren und Pellet in 10ml eiskaltem 0,1M CaCl₂ resuspendieren. Es folgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis, und Zentrifugation für 10' bei 4000rpm. Überstand verwerfen und Pellet in 2ml 0,1M CaCl₂-Lösung mit 16% Glycerin resuspendieren. In 1,5ml Zentrifugenröhrchen á 200µl aliquotieren und bei -80°C bis zur Verwendung lagern. Diese Art der kompetenten Bakterien eignet sich für schnelle Transformationen von fertigen Plasmiden.

TSS-kompetente Bakterien:

Aus einer frischen 5ml Übernachtskultur *E.coli* XL-1 blue werden 400µl in einen 250ml Erlenmeyerkolben mit 20ml LB-Medium überführt. Da die Bakterien an diesem Punkt

noch über keine natürliche Resistenz gegen Antibiotika besitzen, ist sauberes Arbeiten an der Flamme wichtig. Außerdem darf dem Medium kein Antibiotikum zugesetzt werden.

Die Bakterien werden für ca. 2h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8. Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase und nehmen DNA am leichtesten auf. Der Kolben wird nun für 30' auf Eis gelagert und anschließend die Kultur bei 4000rpm für 10' und 4°C zentrifugiert. Der Medienüberstand wird abgegossen und die Bakterien in 2ml TSS-Puffer langsam resuspendiert. Nach vollständiger Resuspendierung werden die 2ml á 200µl in 1,5ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bis zur Verwendung auf Eis gelangert. Die so erzeugten Bakterien erhalten ihre Kompetenz bis zu 8 Stunden. Der Vorteil frisch aufbereiteter Bakterien liegt hier in der besseren Aufnahmefähigkeit und des geringeren Stress für die Bakterien. So sind TSS-kompetente Bakterien besonders für die Transformation mit linearer DNA aus der Mutagenese-PCR geeignet.

3.1.2 Transformation

Eingefrorene Bakterien ($CaCl_2$) auf Eis auftauen lassen, frische Bakterien (TSS) gleich verwenden. Zu 200µl Bakterien wird eine geeignete Menge DNA gegeben (z.B. fertige Plasmide 10ng, Quikchange® - Ansatz 10-20µl, Klonierungsansatz nach StarGate® 10µl) und die Kultur für 30' auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 30'' bei 42°C im Wasserbad und eine erneute kurze Lagerung auf Eis für 2'. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide die Resistenz gegen Ampicillin vermitteln, wurde auf die folgende Vorinkubation der Kultur mit 900µl LB-Medium bei 37°C für eine Stunde verzichtet.

Die 200µl Bakterienkultur können nun auf vorbereitete LB-Agar Platten mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen, und bei 37°C über Nacht gelagert werden. Um zu vermeiden, dass die Kolonien zu dicht wachsen, wird der Ansatz auf 2 Platten á 150µl/50µl aufgeteilt.

3.1.3 Plasmidpräparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden in dieser Arbeit kommerziell erhältliche Kits der Firmen QIAGEN (QIAfilter Plasmid Maxi Kit) und PeqLab (peqGold

Plasmidprep Mini Kit I) verwendet. Die Präparation erfolgt nach Angaben der Hersteller.

Plasmid Minipräp

Um Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aufzureinigen, wird das peqGold Plasmidprep Mini Kit I von PeqLab verwendet. Eine Kolonie transformierter Bakterien wird mit einem sterilen Holzstift von der LB-Agar-Platte gepickt und in 5ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Die Bakterien werden für 12-16h bei 37°C unter stetem Schütteln wachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgt die Präparation der Plasmide. Dazu werden 4ml der Kultur in ein frisches 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000rpm für 5' zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet in 250µl Puffer I resuspendiert. Anschließend wird der Ansatz vollständig in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen überführt und 250µl Puffer II dazugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren des Röhrchens erfolgt die Vermischung der Lösungen und die Bakterien werden innerhalb weniger Minuten chemisch lysiert (alkalische Lyse). Nach einigen Minuten wird die Lyse durch Zugabe von 350µl Puffer III abgestoppt. Proteine und Lipide fallen durch die Behandlung aus und können durch zehnminütige Zentrifugation bei 10.000rpm pelletiert werden. Der Überstand wird nun auf eine Säule gegeben und die DNA kann an der Säulenmatrix binden. Es folgen zwei Waschschrte mit ethanolhaltigen Puffern. Anschließend wird die DNA aus der Matrix in 30-50µl dH₂O oder Elutionspuffer eluiert und in einem frischen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wird anschließend photometrisch (3.1.4) bestimmt.

Plasmid-Maxipräp

Um Plasmid-DNA in großem Maßstab (mehrere hundert µg) zu erhalten, verwendet man das Maxipräp Kit von QIAGEN. Hierzu werden 200µl der Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur in 200ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben und unter konstantem Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wird die gesamte Kultur für 15' bei 6000rpm zentrifugiert und so die Bakterien pelletiert. Das Pellet wird dann in 10ml Puffer P1 (enthält RNase A) resuspendiert und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen und die Gefahr von Protein-Verunreinigungen zu minimieren, empfiehlt es sich, die Kultur in P1 durch starkes Schütteln aufzuschäumen. Anschließend werden die Bakterien mittels Puffer P2 alkalisch lysiert (mehrfaches Invertieren des Röhrchens zur Vermischung) und die

Reaktion nach längstens 5' durch eiskalten Puffer P3 abgestoppt. Nun folgt, abweichend vom Protokoll des Herstellers, eine Zentrifugation der Probe für 15' bei 4000rpm. Jetzt haben sich die Protein- und Lipidreste, die nach der Lyse ausgefallen sind, als weißer Niederschlag von der Flüssigkeit abgetrennt, und das gesamte Volumen kann weiter durch die Aufreinigungssäule gegeben werden. Die weiteren Schritte folgen wieder dem Protokoll des Herstellers. Das Lysat wird in präparierte Säulen geschüttet und die DNA bindet an die Säulenmatrix. Nach zweimaligem Waschen mit ethanolhaltigem Puffer GQ erfolgt die Elution in 15ml Elutionspuffer. Nach Zugabe von 10,5ml Isopropanol und 1µl Glycogen wird die Probe für 1h bei 6000g zentrifugiert. Die DNA bildet nun ein milchig-weißes Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und die DNA mit 5ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 15-30' bei 6000rpm liegt die DNA wieder als festes Pellet am Gefäßboden vor, der Überstand wird vorsichtig abgegossen und die DNA an der Luft getrocknet. Sobald das weiße Pellet vollständig durchsichtig geworden ist, kann die DNA in 200-500µl dH₂O oder Elutionspuffer resuspendiert und die Konzentration bestimmt werden.

3.1.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Reine, doppelsträngige DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260nm. Um die Konzentration einer DNA in Lösung zu bestimmen, wird die Probe in einem Spektralphotometer mit Licht der Wellenlänge 260nm durchleuchtet und die Absorption gemessen. Mittels der bekannten Verdünnungsstufe, der Pfadlänge (der Tiefe der Küvette) und der Absorptionskonstante für doppelsträngige DNA von 50µg/ml kann daraus die Konzentration der DNA in der Probe errechnet werden ($c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50\mu\text{g/ml}$). Die Bestimmung der DNA erfolgte am NanoDrop 1000 (PeqLab).

3.1.5 Sequenzierung viraler Gene

Um die Sequenz der viralen Gene auf die eingefügten Mutationen oder unerwünschte Austausche zu überprüfen, wird die virale RNA aus einer Probe extrahiert (QIAamp Viral RNA Mini Kit) und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Omniscript RT Kit, QIAGEN). Diese wird durch PCR amplifiziert (Phusion Polymerase, Taq Polymerase) und anschließend sequenziert. Die Aufreinigung erfolgt strikt nach

Protokoll des Herstellers. Grundsätzlich gilt für Arbeiten mit RNA auf Sauberkeit zu achten, und RNase-freie Pipettenspitzen und Zentrifugenröhrchen zu verwenden.

RNA-Extraktion

140µl virushaltiger Flüssigkeit werden zu 560µl Puffer AVL (mit 5,6µl carrier-RNA [1µg/µl]) gegeben und durch vortexen gemischt. Nach 10' Inkubation bei RT erfolgt die Zugabe von 560µl Ethanol abs., vortexen. Jeweils 630µl der Probe werden auf die Säulenmatrix gegeben und bei 8000rpm für 1' zentrifugiert. Es folgen zwei Waschschrte mit den Puffern I und II, wobei Puffer II durch Zentrifugation für 3' bei 14.000rpm aus der Säule entfernt wird. Die RNA wird in 30µl TVE-Puffer eluiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Reverse Transkription

Die im Omniscript RT Kit eingesetzte RNA-abhängige-DNA-Polymerase ist ein rekombinant in *E.coli* hergestelltes Enzym. Sie dient wie andere Reverse Transkriptase zur Transkription von RNA zu copy-DNA (cDNA), die nach der Reaktion als einzelsträngige DNA vorliegt. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

RNA	3-5µl
10x RT Puffer	2µl
dNTPs [5mM]	2µl
Primer [20µM]	2µl
RNase Inhibitor [10U/µl]	1µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1µl
	Ad 20µl dH ₂ O (RNase frei)

Der Ansatz wird für 1h bei 37°C im PCR-Cycler inkubiert, gefolgt von einer Inaktivierungsphase von 3' bei 93°C. Anschließend kann der Ansatz bei -20°C gelagert werden.

PCR zur genspezifischen Amplifizierung

Damit die viralen Gene sequenziert werden können, muss die cDNA durch eine PCR in dsDNA umgewandelt und amplifiziert werden. Um Fehler bei der Synthese neuer

DNA-Stränge zu vermeiden, wird eine Polymerase mit 3'-5' Exonuklease-Aktivität (so genanntes *proof-reading*) eingesetzt, in dieser Arbeit die Phusion Polymerase.

Reaktionsansatz

cDNA aus RT	5µl
5x Reaktionspuffer	20µl
dNTP-Mix [10mM]	2,5µl
Primer forward [20µM]	2µl
Primer reverse [20µM]	2µl
Phusion Polymerase [2,5U/µl]	1µl
	<i>ad</i> 100µl dH ₂ O

PCR-Konditionen

Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	20 sec	
Primer-Annealing	55°C	10 sec	30 Zyklen
Elongation	72°C	1-3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Abkühlung	8°C	∞	

Abhängig von der Länge des PCR-Produkts ist die Zeit der Strang-Synthese variabel. Laut Hersteller synthetisiert die Phusion Polymerase 1kb/min, für längere Gene wie PB2, PB1 und PA von ca. 2,4kb empfiehlt sich eine etwas verlängerte Zeitspanne von 3 Minuten.

Alternativ zur PCR mit Phusion ist die PCR mit der Taq-Polymerase für kürzere Teilfragmente möglich. Da diese Polymerase nicht über die Möglichkeit der Korrektur falsch eingesetzter Nukleotide verfügt, ist eine Fehlerrate von 1/9000 Nukleotide beschrieben (Tindall and Kunkel, 1988). Hier wurde in der Arbeit das Taq-Mastermix Kit von QIAGEN verwendet. Dieses Kit enthält einen vorgefertigten Mix aus Polymerase und dNTPs in 2x Puffer, dem nur Primer, DNA und Wasser zugegeben werden müssen. Der Vorteil dieser Alternative liegt in der benötigten Zeit, da die Taq-Polymerase neue DNA Stränge mit bis zu 6000 Nukleotide pro Minute bildet.

Reaktionsansatz

cDNA aus RT	5µl
2x Taq-Master Mix	50µl
Primer forward [20µM]	2µl
Primer reverse [20µM]	2µl
	<i>ad</i> 100µl dH ₂ O

PCR-Konditionen

Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	
Denaturierung	94°C	20 sec	
Primer-Annealing	52°C	10 sec	30 Zyklen
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Abkühlung	8°C	∞	

Das PCR-Produkt wird durch präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion (3.1.7) aufgereinigt und bei ausreichender Konzentration für die Sequenzierung vorbereitet (3.1.6).

3.1.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung des viralen Genoms erfolgt nach der von Sanger et al. 1977 (Sanger et al., 1977) etablierten Methode des Kettenabbruchs durch didesoxy-Ribonucleosid Triphosphate bei der Firma Seqlab (Seqlab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen).

Kurz, die zur Sequenzierung benötigte Menge DNA (Plasmid-DNA 0,6-0,7µg, PCR-Produkt ca. 200-250ng Gesamtmenge) wird in 6µl Probenvolumen zusammen mit 1µl des Sequenzierprimers [20µM] vorbereitet und per Kurierdienst an die Firma geschickt. Dort erfolgt die PCR mit BIGDYE-Terminator Mix und anschließende Kapillargelelektrophorese und Datenanalyse.

Zum Prinzip der Sequenzierung durch Kettenabbruch:

Die DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang in 5'- 3' Orientierung, und hängt dabei das Folgenukleotid an die freie 3'OH-Gruppe des jeweils letzten Nukleotids in der Kette. Im Reaktionsmix anteilig enthalten sind Nukleotide, denen die 3'OH-Gruppe fehlt (dideoxy-Nucleotide). Somit kommt es statistisch nach jedem Nukleotid zum Abbruch der Strangsynthese, wodurch Fragmente fortlaufender Länge entstehen. An jede ddNTP-Art ist ein bestimmter Fluorophor gekoppelt, der bei Anregung durch Licht der spezifischen Wellenlängen die Detektion des endständigen Nukleotids während der Auftrennung im Gel ermöglicht.

3.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um spezifische DNA-Banden aus einem Reaktionsgemisch, z.B. einer PCR, aufzureinigen, lässt man die Probe elektrophoretisch durch ein 1% Agarosegel laufen. Nach einer geeigneten Laufzeit, wird das Gel in eine Kammer mit Ethidiumbromid-TBE-Puffer für einige Zeit auf einem Schüttler gelegt. Das Ethidiumbromid kann in dieser Zeit durch die Agarose diffundieren und in die DNA interkalieren. Beleuchtet man das Gel nun mit einer UV-Lampe, wird die DNA durch die Fluoreszenz des EtBr sichtbar. Mit Hilfe eines Skalpells wird nun die DNA-Bande der gewünschten Länge ausgeschnitten und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Weitere Extraktion folgt dem Protokoll des QIAquick Gel Extraktion Kit von QIAGEN: Das Gelstück wird gewogen und das dreifache Gewichtsvolumen GQ-Puffer dazugegeben. Die Agarose wird nun aufgelöst. Optimal ist eine Temperatur von 42-50°C, bei RT dauert es länger. Nachdem die Agarose vollständig aufgelöst ist, wird die Lösung á 700µl durch die Säule zentrifugiert. Dabei bindet die DNA in der Säulenmatrix. Sobald die Probe vollständig abzentrifugiert wurde, wird die Säule noch einmal mit 500µl GQ-Puffer beladen und kurz bei RT inkubiert. Dadurch werden letzte Agarose-Reste entfernt. Es folgt ein Waschschrift und die Elution der DNA in Elutionspuffer in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen.

3.1.8 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange® von Stratagene erlaubt es, *in vitro* an definierten Positionen eines Plasmids einzelne oder mehrere Nukleotide auszutauschen oder zu deletieren bzw. zu inserieren. Dafür werden zwei

komplementäre Primer verwendet, die in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen und diese so in die durch PCR neusynthetisierten Kopien des Plasmids einbringen. Nach der PCR liegen im Reaktionsmix zwei unterschiedliche DNA-Spezies vor: das zirkuläre, parentale Plasmid und das lineare PCR-Produkt. Da die parentale DNA aus einem dam⁺ Bakterienstamm gewonnen wird ist sie methyliert, während das PCR-Produkt nicht methyliert ist. Dies kann man sich zur Aufreinigung des PCR-Produkts nutzbar machen, in dem man den Reaktionsmix im Anschluss an die PCR einem Restriktionsverdau durch eine m6-sensitive Endonuklease wie z.B. DpnI unterzieht. DpnI erkennt die Sequenz 5'-Gm6-ATC-3' und da dieses Motiv in der Regel häufig in Plasmiden vorkommt, wird die parentale DNA in etliche Stücke zerteilt, während das PCR-Produkt aufgrund der fehlenden Methylierung von der Endonuklease nicht angegriffen wird. Durch den Verdau wird also die parentale DNA aus dem Reaktionsmix entfernt. Im Anschluss an den DpnI-Verdau wird der Reaktionsmix in chemisch-kompetente Bakterien (z.B. TSS-kompetente *E.coli* XL-1 blue) transformiert, die das lineare PCR-Produkt zirkularisieren, Einzelstrangbrüche reparieren und das Plasmid vervielfältigen können. Die Selektion auf erfolgreiche Transformation erfolgt durch Antibiotikaresistenz, die durch das transformierte Plasmid vermittelt wird.

Reaktionsansatz

Plasmid-DNA [50ng/μl]	1μl
5x Reaktionspuffer	10μl
dNTP-Mix [10mM]	2,5μl
Primer forward [20μM]	3μl
Primer reverse [20μM]	3μl
Phusion Polymerase [2,5U/μl]	0,5μl
	ad 50μl dH ₂ O

PCR-Konditionen

Initiale Denaturierung	98°C	3 min	
Denaturierung	98°C	30 sec	
Primer-Annealing	55°C	20 sec	30 Zyklen
Elongation	72°C	5 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Abkühlung	8°C	∞	

3.1.9 Klonierung

Die Gene der viralen Polymerase wurden für die Messung der Aktivität im Mini-Replikon-Assay in den Vektor pCAGGS aus den vorhandenen pHW2000-Plasmiden umklontiert. Dazu wurden genspezifische Primer verwendet, die am jeweiligen Start- und Stopcodon ansetzen und zudem eine Esp3I-Erkennungssequenz tragen. Zuerst erfolgt die Amplifikation der Gene durch PCR und anschließend die Restriktion/Ligation der PCR-Produkte in den Vektor. Als Restriktionsenzym wird Esp3I statt BsmBI eingesetzt. Esp3I ist ein Isoschizomer zu BsmBI, erkennt also die gleiche Sequenz (CGTCTC) und erzeugt den gleichen Überhang (1/5), allerdings liegt das Temperatur-Optimum bei 37°C statt 55°C, wodurch das Zusammenspiel von Restriktion und Ligation überhaupt möglich wird.

Reaktionsansatz

Plasmid-DNA [50ng/μl]	1μl
5x Reaktionspuffer GC	10μl
dNTP-Mix [10mM]	2,5μl
Primer forward [20μM]	2μl
Primer reverse [20μM]	2μl
Phusion Polymerase [2,5U/μl]	0,5μl
	<i>ad</i> 50μl dH ₂ O

PCR-Konditionen

Initiale Denaturierung	98°C	3 min
Denaturierung	98°C	30 sec
Primer-Annealing	55°C	20 sec
Elongation	72°C	2,5 min
Finale Elongation	72°C	10 min
Abkühlung	8°C	∞

Auf die PCR folgt eine präparative Gelelektrophorese über ein 1% Agarose-Gel und Extraktion des PCR-Produkts mittels QIAquick Gelextraktion-Kit nach Protokoll des Herstellers (3.1.7). Die Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA wird photometrisch ermittelt (3.1.4).

Anschließend an die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgt dann die Klonierung in das Zielplasmid nach der StarGate[®] Methode (IBA BioTAGnologies GmbH, Göttingen). Hierfür wurde das pCAGGS-Plasmid auf der Basis des pHW2000-Plasmids mit zwei Esp3I-Erkennungsstellen ausgestattet. Zudem liegt zwischen den beiden Restriktionsstellen das Gen für die LacZ α -Untereinheit, um ein blau/weiß-Screening zu ermöglichen.

Die Restriktion/Ligation erfolgt dann in einem Reaktionsansatz parallel nach folgendem Protokoll:

Plasmid-DNA [10ng/ μ l]	1 μ l
PCR-Produkt [10ng/ μ l]	1 μ l
10x Tango Yellow Puffer	2,5 μ l
DTT [100mM]	0,5-1 μ l
ATP [100mM]	0,25-1 μ l
Esp3I	0,5 μ l
T4-DNA Ligase	1 μ l
	ad 25 μ l dH ₂ O

Der Reaktionsansatz wird für 60' bei 37°C inkubiert, anschließend folgt eine Inaktivierungszeit von 20' bei 65°C.

10 μ l des Reaktionsansatzes können nun in chemisch-kompetente E.coli Bakterien transformiert und auf eine LB-Agar-Platte ausplattiert werden. Die Agar-Platten werden vor dem Ausstreichen der Bakterien mit X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) vorbehandelt, welches als Substrat für die β -Galaktosidase dient und von dieser in Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol gespalten wird. Durch Oxidation des Indols entsteht ein blauer, unlöslicher Farbstoff, der die betreffenden Bakterien anfärbt. Im Falle einer erfolgreichen Umklonierung wird die LacZ α -Untereinheit aus dem Plasmid herausgeschnitten und durch das gewünschte Gen ersetzt (siehe auch Abb. 3.1). Somit fehlt den Bakterien eine funktionelle β -Galaktosidase. Die mit dem so veränderten Plasmid transformierten Bakterien können das Substrat X-Gal nicht umsetzen und bleiben entsprechend weiß.

Die Klonierung kann auch dann erfolgreich verlaufen, wenn das zu ligierende Gen selbst interne Esp3I-Erkennungssequenzen enthält. Durch erneute Zugabe von 1 μ l ATP und 0,5 μ l T4-Ligase nach dem Inaktivierungsschritt werden während einer

weiteren Inkubation von mehreren Stunden bis über Nacht bei Raumtemperatur die offenen DNA-Überhänge geschlossen und die Anzahl positiver Klonen steigt.

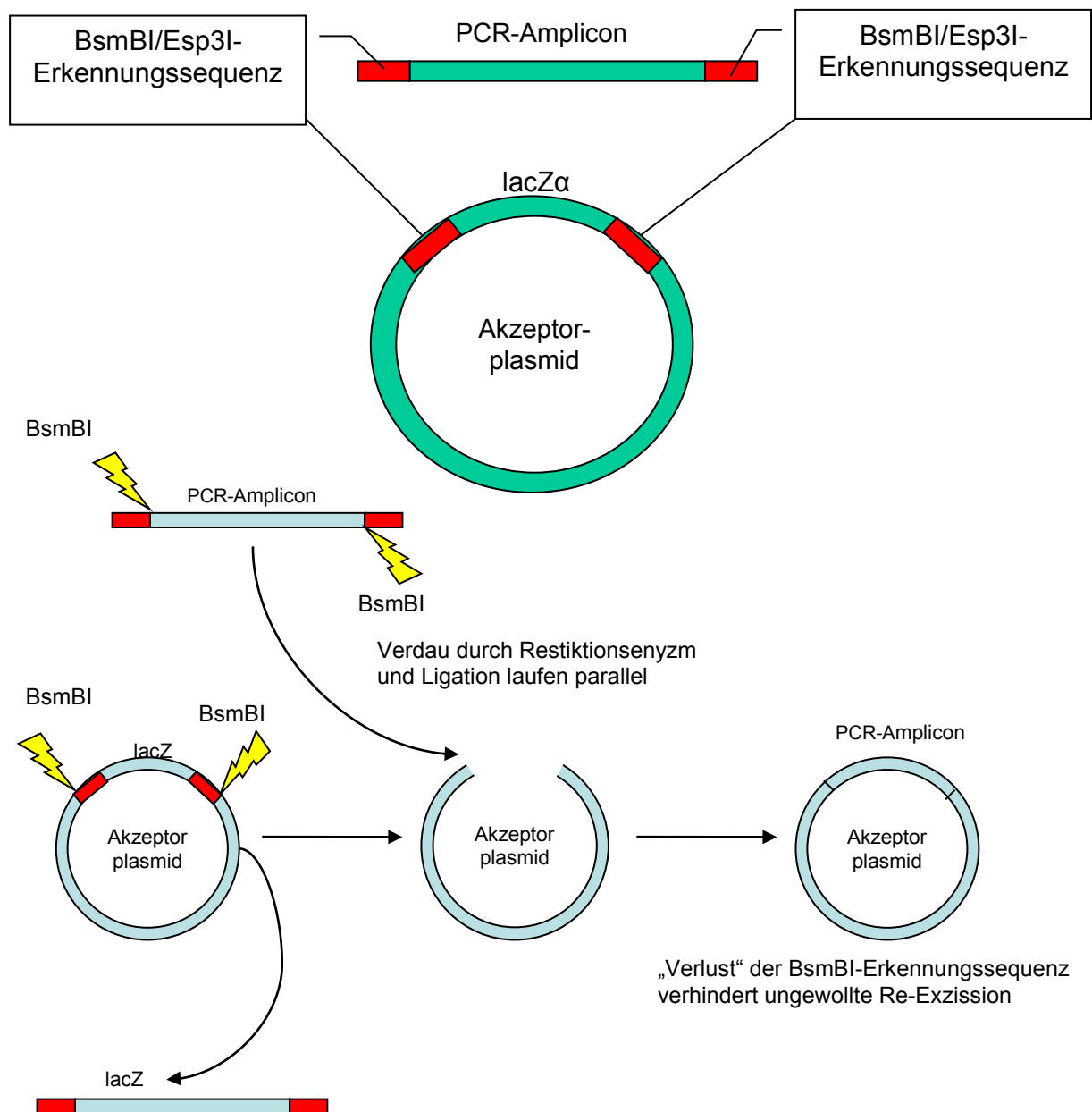


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Klonierung nach Stargate®. Im Reaktionsgemisch erfolgen Restriktionsverdau und Ligation der freien DNA-Enden parallel. Das LacZ-Operon wird durch das Zielgen ersetzt und erlaubt so, positive Bakterienkolonien nach der ausbleibenden Blaufärbung zu selektieren.

3.1.10 Western-Blot

Zum Nachweis der Expression der viralen Polymerase-Proteine wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurden HEK293T Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transfiziert und 24h nach Transfektion das Zelllysat analysiert.

Die Transfektion erfolgt wie unter 3.2.3.1 beschrieben. 24 Stunden nach Transfektion werden die Zellen für 15' auf Eis inkubiert und anschließend 2x mit raumtemperiertem PBS^{def} gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gekratzt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach folgt ein Zentrifugationsschritt für 10' bei 1000rpm, um die Zellen sanft zu pelletieren. Der PBS-Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und durch 100µl PBS mit Protease-Inhibitor ersetzt. Die Zellen werden durch kurzes Vortexen resuspendiert und anschließend für 15' im Ultraschallbad mechanisch zerstört.

Nach der Lyse der Zellen werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 2' bei 14.000rpm pelletiert und der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 33µl 4x SDS-Proteinladepuffer werden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der viralen Proteine nach Expression erfolgt in einem 10%igen Polyacrylamid-Gel mit SDS (Polyacrylamid-Gelelektrophorese, PAGE) für 1h bei 70-100V.

Trenngel		Sammelgel	
dH ₂ O	3,9ml	dH ₂ O	2,9ml
30% Acrylamid	3,4ml	30% Acrylamid	750µl
1,5M Tris-HCl 0,4% SDS pH 8,8	2,6ml	0,5M Tris-HCl 0,4% SDS pH 6,8	1,3ml
10% APS [100mg/ml]	80µl	10% APS [100mg/ml]	80µl
TEMED	20µl	TEMED	20µl
		Pyronin G [1mg/ml]	20µl

Zuerst wird das Trenngel gegossen und bis zur Auspolymerisierung der Acrylamid-Lösung mit dH₂O überschichtet. Anschließend wird das Wasser abgenommen und das Pyronin G gefärbte Sammelgel auf das Trenngel gegeben.

Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgt die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Hierzu wird das Gel vorsichtig aus der Apparatur gelöst und auf die Membran gelegt. Beides wird von oben und unten durch, in Transfer-Puffer getränkte Whatman-Papier-Stücke bedeckt und zwischen zwei

Plattenelektroden gespannt. Die Übertragung der negativ geladenen Proteine erfolgt in Richtung des elektrischen Stroms für 1h bei 43mA ($\sim 0,8\text{mA}/\text{cm}^2$).

Anschließend wird die Membran in Blot-PBS mit 0,3% BSA bei 4°C für 1h bis über Nacht unter konstantem Schwenken inkubiert (blocken). Dies dient vor allem dazu, die Membran mit Protein abzusättigen um unspezifische Antikörper-Bindungen zu minimieren. Die Membran sollte vollständig von Flüssigkeit bedeckt sein.

Entwicklung

Nach dem Blocken der Membran erfolgt die erste Inkubation mit dem primären Antikörper. Hierzu wird der Antikörper in einer geeigneten Verdünnung (z.B. 1:1000 – 1: 10.000) in Blot-PBS mit 1% BSA auf die Membran gegeben und für 1h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wird die Membran 3-mal für je 10 Minuten mit Blot-PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem sekundären, hier HRP-gekoppelten Antikörper, ebenfalls für 1h bei RT in Blot-PBS mit 1% BSA (1:1000). Nach dreimaligen Waschen wie beschrieben folgt die Detektion der Proteine durch ein Peroxydase-Substrat (Supersignal Chemiluminiszenz Kit, Thermo Fisher). Die Belichtung eines geeigneten Photofilms und Entwicklung des Films finden in der Dunkelkammer am ECL statt. Die Belichtungsdauer ist dabei abhängig von Proteinmenge und Substrat und kann zwischen einer halben Minute bis mehrere Stunden dauern.

3.1.11 Mini-Replikon-Assay zur Bestimmung der Polymeraseaktivität

Die Messung der Aktivität der viralen Polymerase erfolgt mittels eines so genannten Mini-Replikon-Systems, unter den Bedingungen des „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ von Promega. Dazu werden die Gene des viralen Polymerasekomplexes PB2, PB1 und PA zusammen mit dem Nukleoprotein NP über Expressionsplasmide in die Zelle transfiziert. Als Reporter gen fungiert das Gen der Firefly-Luziferase (FFL) aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Dieses liegt in negativer Orientierung im Plasmid pPol I-NP-luc vor und wird von den nichtcodierenden Regionen des Nukleoproteins der Influenza-A-Viren flankiert. Ebenfalls in negativer Orientierung folgt dem Gen ein speziesspezifischer Pol I-Promotor, der in der Zelle die Synthese der vRNA-ähnlichen Luziferase-RNA durch die DNA-abhängige-RNA-Polymerase I ermöglicht. Die so gestaltete Firefly-Luziferase-RNA imitiert native vRNA und kann,

vom Nukleoprotein encapsidiert, so von der viralen Polymerase erkannt und in mRNA transkribiert werden.

Nach der Transkription aus vRNA zu mRNA erfolgt im Zytoplasma der Zelle die Translation und Proteinsynthese. Über ein geeignetes Substrat kann nun die synthetisierte FFL indirekt nachgewiesen werden. Durch eine interne Kontrolle (hier Renilla-Luziferase, RenL, aus *Renilla reniformis*) wird die gemessene Substratumsetzung standardisiert. Der Test ist sehr sensitiv und die Menge der eingesetzten Plasmide sollte möglichst genau bekannt sein, da Abweichungen in der Relation der einzelnen Plasmide zu großen Differenzen im Ergebnis führen können. Die Durchführung des Assays erfolgt in Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen und unter Verwendung der entsprechenden pCAGGS-Expressionsplasmide.

Zur Durchführung eines Assays werden die zu transfizierenden Zellen (z.B. HEK293T) am Vortag in Zellkultur-Schalen so ausgesät, dass sie zu Versuchsbeginn 80% Konfluenz erreicht haben. Pro Probe sind mindestens zwei, besser drei bis vier parallele Ansätze unter gleichen Bedingungen durchzuführen, um Variationen in Transfektionseffizienz, Zellzahl und anderer Faktoren auszumitteln. Die Transfektion erfolgt wie unter 3.2.3.1 beschrieben mit LipofectAmin2000. Pro transfizierter Vertiefung ist vorzubereiten:

Plasmid-Mix (P-Mix) pro Vertiefung

pCAGGS-PB2	50ng
pCAGGS-PB1	50ng
pCAGGS-PA	50ng
pCAGGS-NP	50ng
pPoll-NP-Luc	200ng
pGL4.73	25ng
	In 125µl OptiMEM

LipofectAmin-Mix (LF-Mix) pro Vertiefung

LipofectAmin 2000	1,5µl/µg DNA
OptiMEM	125µl

Der LF-Mix wird für 5' bei RT inkubiert, anschließend erfolgt die Zusammenführung von 125µl P-Mix und 125µl LF-Mix und eine weitere Inkubation für 20' bei RT.

Während der Inkubationszeit werden die Zellen vorbereitet. Dazu wird das Wachstumsmedium langsam abgesaugt und 1ml OptiMEM am Rand auf die Zellen gegeben. Die Zellen vor Transfektion nicht waschen. 250µl Transfektionsansatz vollständig und vorsichtig am Rand zu den Zellen pipettieren und für 4-6h im Brutschrank inkubieren. Danach erfolgt der Medienwechsel zu 2ml normalem Wachstumsmedium und weitere Inkubation für 18-20h.

24h nach Transfektion erfolgt die Ernte und Lyse der Zellen. Dazu werden die Zellen für 10' auf Eis gestellt und 2x langsam mit RT warmem PBSdef gewaschen. PBS absaugen und 150µl 1x Passive Lysis Buffer (aus 5xPLB-Konzentrat in dH₂O) auf die Zellen geben. Die Lyse erfolgt innerhalb 15' bei RT und konstantem schütteln. Nach der Inkubation wird das Lysat aus den Vertiefungen vollständig, inklusive Zelltrümmern in ein vorbereitetes 1,5ml Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis oder bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Luziferase-Aktivitäten erfolgt am Luminometer (Berthold). Das Gerät verfügt über zwei separate Injektoren, die die Substrate für beide Luziferasen getrennt applizieren können. Zu je 20µl Probenvolumen in einer geeigneten Mikrotiterplatte werden zuerst 50µl FFL-Substrat (Luciferase Assay Reagent II, LARII) gegeben, die Messung der Substratumsetzung erfolgt über 5sec. Durch die Zugabe des zweiten Substrats (Stop & Glo, S&G) für die Renilla-Luziferase wird die Aktivität der Firefly-Luziferase chemisch inhibiert, und es kann im zweiten Schritt der Messung direkt die Substratumsetzung der RenL über 5sec gemessen werden. Die Auswertung der Messung erfolgt mit der Software MikroWin2000.

Zur Berechnung der relativen Aktivität der Polymerase, wird der Wert für die FFL in Relation zum Wert der RenL gesetzt ($[\text{Wert}] \text{ FFL} / [\text{Wert}] \text{ RenL}$). Anschließend wird aus allen Werten einer Probe der Mittelwert bestimmt. Der Mittelwert einer Probe (z.B. die aviär-typische Polymerase) dient bei der Auswertung als Referenz, und wird als 100% Aktivität festgelegt. Alle anderen Proben der Messung werden dann dazu in Relation gesetzt (als % relative Aktivität).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 HA-Titer Bestimmung

Das Hämagglutinin auf der Oberfläche von Influenzaviren bindet endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren, die in der Regel an Oberflächenproteinen fast aller Zellen, unter anderem auch von Erythrozyten, vorkommen. Aufgrund der vielseitigen Adsorptionsmöglichkeiten, können Viruspartikel so gleichzeitig mehrere Erythrozyten binden und so miteinander vernetzen (Agglutination). Mit zunehmender Virusverdünnung kann diese Vernetzung bei gleich bleibender Erythrozytenkonzentration nicht mehr zu einer vollständigen Agglutination führen, und die Blutkörperchen sinken nach unten. Da auch HA-tragende Membrantrümmer und di-Partikel (von *defective interfering*) Erythrozyten agglutinieren können, erlaubt der Hämagglutinationstest (HA-Test, HAT) nur eine eingeschränkte quantitative Aussage über die Viruskonzentration. Da es sich hierbei aber um eine schnelle und leicht durchzuführende Methode handelt, um eine Probe auf Influenzaviren zu testen, wird sie standardmäßig bei vielen Untersuchungen komplementär eingesetzt.

Zur Durchführung werden in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen die V-förmig zulaufende, Virusverdünnungen von 2^{-1} – 2^{-12} in 4°C kaltem PBS^{def} hergestellt. Dazu wird in jede Vertiefung $50\mu\text{l}$ PBS^{def} vorgelegt. Anschließend pipettiert man in die erste Vertiefung $50\mu\text{l}$ der virushaltigen Flüssigkeit. Davon ausgehend, überführt man dann je $50\mu\text{l}$ in die nächste Vertiefung und verwirft die letzten $50\mu\text{l}$. So entsteht eine 1:2 Verdünnungsreihe. In Richtung der aufsteigenden Viruskonzentration fügt man nun $50\mu\text{l}$ einer 1%igen Suspension von Erythrozyten in 0,9% NaCl-Lösung hinzu. Für die anschließende Inkubation für 20-30 Minuten muss die Platte auf Eis oder bei 4°C gelagert werden, um die Aktivität der Neuraminidasen auf der Virusoberfläche zu unterdrücken. Nach der Inkubationsphase sind die nicht vernetzten Erythrozyten auf den Boden der Vertiefung abgesunken und bilden einen klar abgegrenzten Punkt (so genannte „Knöpfchenbildung“), während die vernetzten Erythrozyten weiterhin gleichmäßig verteilt bleiben. Eine Hämagglutinationseinheit (HAU) oder auch „HA-Wert“ entspricht dem reziproken Wert, bei dem die Virusverdünnung noch zur Agglutination führt. Dieser Wert ist ein Maß für den Virustiter.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters mittels Plaquetest

Bei der Bestimmung der Viruskonzentration mittels Plaquetest handelt es sich um eine quantitative Methode zum Nachweis infektiöser Partikel. Hierfür werden MDCK Zellen mit einer ansteigenden Virusverdünnung infiziert, und nach einer Inkubationszeit die Entstehung runder Löcher im Zellrasen (Plaques) kontrolliert. Die Zellen werden nach der Infektion mit einer Agar/Medium-Mischung überschichtet, um so die Beweglichkeit neu freigesetzter Viren einzuschränken. Dadurch können die Viren nur die nächstliegenden Zellen infizieren und es entstehen kreisrunde Infektionsorte die aufgrund des zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) als Löcher im Zellrasen sichtbar werden. Zur Auswertung berechnet man die Anzahl infektiöser Partikel aus dem reziproken Wert der entsprechenden Verdünnungsstufe, unter Berücksichtigung des Inokulum-Volumens. Beispiel:

	Verdünnungsstufe	
	10^{-6}	10^{-7}
Plaques	30	3

Daraus ergibt sich für 500µl Inokulum folgende Rechnung:

$$((30 \text{ Plaques} \times 10^6 + 3 \text{ Plaques} \times 10^7) / 2) / 0,5\text{ml} = 60.000.000 = 6 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

Zur sicheren Ermittlung des tatsächlichen Virus-Titers muss ein Plaquetest mindestens zweimal unabhängig bestimmt werden.

3.2.2.1 Plaquetest mit Kristallviolett

Zur Durchführung werden MDCK-Zellen auf Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen am Vortag so ausgesät, dass sie zu Versuchsbeginn zu 80-90% konfluent gewachsen sind (typischer Weise 1:3 bis 1:5).

Zur Bestimmung des Anteils infektiöser Partikel in der Probe werden die Viren in 1:10 Verdünnungsschritten bis zu der gewünschten Verdünnungsstufe in PBS⁺⁺ verdünnt. Dann werden die Zellen 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 333-500µl virushaltigem Inokulum für 30-60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Platte wird während der Zeit in regelmäßigen Intervallen leicht geschwenkt um die Viren gleichmäßig zu verteilen. Im Anschluss an die Inkubation wird das Inokulum

abgesaugt und die Zellen mit 3ml 42°C warmem Overlay-Medium überschichtet. Die weitere Inkubationsdauer von 48-72h ist abhängig vom Virus und der Ausprägung des CPE. Im Fall von A/Thailand/1(Kan-1)/2004 kann der Plaquetest nach 40h durch Fixierung und Färbung mit Kristallviolett abgestoppt werden. Hierzu übergießt man den Agar in der Vertiefung direkt mit 3ml Kristallviolett und lässt die Platte dann bei Raumtemperatur über Nacht stehen. In dieser Zeit diffundieren Formaldehyd und Kristallviolett durch den Agar und fixieren/färben die Zellen. Kristallviolett ist ein Lebendzellaufleuchtstoff, das heißt es werden nur lebende Zellen angeleuchtet, wodurch tote Zellen ungeleuchtet bleiben. Diese sind dann im Fall einer Virusausbreitung als kreisrunde Löcher im Zellrasen sichtbar.

Nach 24h Inkubation wird der Flüssigkeitsrest abgesaugt und als flüssiger organischer Abfall entsorgt. Der Agar wird vorsichtig mit Hilfe eines Spatels aus der Vertiefung gelöst und entsorgt, die Zellen mit Wasser gewaschen und die Plaques ausgezählt.

Wird der Plaquetest mit Avicel-Overlay durchgeführt (Matrosovich et al., 2006), empfiehlt es sich, die Virusverdünnungen in 1x Infektionsmedium vorzubereiten. Das Overlay-Medium kann dann direkt nach der Inkubation auf die Zellen gegeben werden ohne das Inokulum abzusaugen. Färbung und Fixierung verlaufen wie oben beschrieben.

Als zeitsparende Alternative zu dem oben beschriebenen Protokoll kann die Platte vor der Färbung für 15-20 Minuten bei 4°C gelagert werden. Anschließend wird der Agar vorsichtig mit Hilfe eines Spatels abgelöst und 1ml Kristallviolett direkt auf die Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten bei 4°C kann der Farbstoff abgesaugt werden. Zellen mit Wasser waschen und Plaques zählen.

Die Entsorgung organischer Abfälle aus dem BSL-3 Sicherheitslabor ist aufwendig, daher wurde hier für die Färbung der Farbstoff Amidoschwarz10B statt Kristallviolett verwendet. Das Protokoll ist identisch, die Entsorgung des Farbstoffs kann mit dem normalen Flüssigmüll geschehen.

3.2.2.2 Immunhistochemische Anfärbung infizierter Zellen

Als Alternative zum Nachweis infektiöser Partikel durch die Visualisierung des CPE kann eine immunhistochemische Anfärbung der Virusproteine durchgeführt werden. Die grundsätzliche Durchführung gleicht dem klassischen Plaquetest, der direkte

Nachweis viraler Proteine birgt jedoch einige Vorteile. So können mit dieser Methode auch Viren titriert werden, deren CPE nur schwach ausgeprägt ist. Des Weiteren verkürzt sich die Zeit der Virusausbreitung auf 8-48h und man kann ein kleineres Zellkulturformat bis zu Platten mit 96-Vertiefungen verwenden, was den Material- und Zeitaufwand deutlich reduziert. Das folgende Protokoll ist für Platten mit 24 Vertiefungen ausgelegt.

Die Zellen werden am Vortag zu 80-90% Konfluenz am Versuchstag ausgesät. Die Virusverdünnung erfolgt in 1x Infektionsmedium in 1:10 Schritten. Vor Infektion werden die Zellen 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen und dann mit 250µl Inokulum bedeckt. Anschließend werden die Zellen für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert und in regelmäßigen Abständen leicht geschwenkt. Nach der Inkubation gibt man 400µl Avicel-Overlay auf die Zellen und lässt die Infektion für 24-48h ablaufen. Der Zeitrahmen bemisst sich nach der Geschwindigkeit der viralen Replikation. Nach der Inkubationszeit wird der gesamte Medienüberstand abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS^{def} gewaschen. Dann erfolgt die Fixierung der Zellen mit 300µl 4% PFA für 30 Minuten bei 4°C. Nach der Fixierung erfolgt die Permeabilisierung der Zellen durch Permeabilisierungspuffer. Dazu wird die PFA-Lösung abgenommen und durch 300µl Puffer ersetzt und die Zellen für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Nach der Permeabilisierung erfolgt die Detektion viraler Protein durch spezifische Antikörper. Hierzu werden die Zellen mit 150µl Antiserum (z.B. anti-FPV Serum aus Kaninchen) für 1h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen 3x für je 10 Minuten mit Blot-PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit 150µl des zweiten Antikörpers (anti-Kaninchen) für 1h bei RT auf dem Schüttler. Nach der zweiten Inkubationszeit werden die Zellen erneut 3x für je 10 Minuten mit Blot-PBS gewaschen. An die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase (*horse-radish peroxydase*, HRP) gekoppelt. Um die viralen Proteine nun indirekt über die gebundenen Antikörper nachweisen zu können, werden die Zellen nach dem Waschen mit 120µl eines Peroxidasesubstrats (z.B. TrueBlue (KPL)) inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT stellt sich eine sichtbare Blaufärbung ein. Sobald die Färbung intensiv genug ist, wird das restliche Substrat entfernt und die Zellen gründlich mit dH₂O gewaschen. Die Platten können nun getrocknet, ausgewertet und im dunklen gelagert werden.

3.2.3 Reverse Genetik von Influenza-A-Viren

Um den Einfluss von bestimmten Mutationen auf die viralen Eigenschaften im Virus-Kontext zu untersuchen, kann man diese Virusmutanten gezielt mittels dem von Hoffmann et al. 2000 (Hoffmann et al., 2000a) beschriebenen Protokoll zur reversen Genetik von Influenza-A-Viren erzeugen. Dazu werden HEK293T-Zellen mit den Pol I- Pol II-Plasmiden aller 8 Virusgene transfiziert (pHW-PB2, pHW-PB1, pHW-PA, pHW-HA, pHW-NP, pHW-NA, pHW-M und pHW-NS von Kan-1), von diesen werden dann durch den zellulären Syntheseapparat mRNA und virale Proteine (Pol II) sowie vRNA (Pol I) synthetisiert und zu neuen Viren zusammengebaut. Um die Produktion viraler Partikel zu unterstützen, kann zusätzlich die virale Polymerase durch reguläre Expressionsplasmide cotransfiziert werden.

Zur Erzeugung definierter Mutanten wird statt des entsprechenden wild-typischen Gens die durch zielgerichtete Mutagenese veränderte Plasmidvariante eingesetzt (z.B. statt pHW-PB2wt das mutierte pHW-PB2 N701D).

Da sich Viren in 293T-Zellen nur ineffizient vermehren können, wird ein Teil des Medienüberstands nach einer 24-48 stündigen Inkubationsphase auf MDCK-Zellen überführt, um eine bessere Vermehrung der neu entstandenen Viren zu ermöglichen. Anschließend werden die Viren zwei Mal Plaque-gereinigt (3.2.4), um eine weitgehend homogene Viruspopulation zu erhalten. Danach erfolgt die Anzucht der Virusstammsuspension und Plaque-Titration zur Bestimmung des viralen Titers.

3.2.3.1 Transfektion HEK293T-Zellen

Die Transfektion von 293T-Zellen erfolgt mittels LipofectAmin2000 (LF). Hierbei handelt es sich um ein Transfektionsagens auf Basis kationischer Lipide. Diese Lipide bilden durch ihren hydrophoben Anteil kleine Mycellen, die auf ihrer Außenseite positiv geladene Ionen tragen. Diese können an negativ geladene Moleküle wie z.B. DNA binden und diese so in Zellen einbringen.

Die Zellen werden am Vortag so in 6cm Schalen ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 80% konfluent gewachsen sind. Zur Transfektion einer 6cm Schale werden je 1µg der Plasmide pHW-PB2, pHW-PB1, pHW-PA, pHW-HA, pHW-NP, pHW-NA, pHW-M und pHW-NS von Kan-1 zusammen mit je 1 µg pCAGGS-PB2, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PA und pCAGGS-NP von Kan-1 in 250µl OptiMEM

aufgenommen. Parallel wird für den Ansatz 20µl LF zu 230µl OptiMEM gegeben und 5' bei RT inkubiert. Im Anschluss führt man die beiden Gemische zusammen und inkubiert weitere 20' bei RT. Währenddessen werden die Zellen vorbereitet: Das Medium wird abgesaugt, und langsam 2ml OptiMEM auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wird der gesamte Transfektionsansatz von 500µl langsam auf die Zellen pipettiert, die Schale kurz geschwenkt. Die Zellen werden für 4-6h im Brutschrank inkubiert. Danach folgen ein Medienwechsel zu 3ml Infektionsmedium und die weitere Inkubation für 24-48h.

3.2.3.2 Infektion von MDCK-Zellen

Die Zellen werden am Vortag so in 6cm-Schalen gesät, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion 80-90% konfluent gewachsen sind. Zur Vorbereitung werden die Zellen 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 3ml Infektionsmedium (DMEM mit 0,2% BSA) versehen und bis zu 500µl des 293T Überstands auf die Zellen pipettiert. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei 37°C für 24-72h bis ein deutlicher zytopathischer Effekt zu beobachten ist. Während dieser Zeit vermehren sich die Viren, der Nachweis erfolgt mittels HA-Test.

Der Medienüberstand wird vollständig in 15ml PP-Röhrchen überführt und die Zelltrümmer bei 4000rpm für 5' pelletiert. Anschließend wird der Überstand zu je 250µl in Cryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Plaque-Aufreinigung

Typischerweise enthält ein natürliches Virusisolat nicht nur Viren mit einer vollkommen identischen Gensequenz, sondern variante Viren die einzelne Mutationen tragen können (so genannte Quasispezies). Im Falle vorteilhafter Mutationen, können diese Virusspezies im Verlauf einer Passagierung die anderen Varianten verdrängen, und so die Analyse der Isolat-Eigenschaften erschweren. Die Methode der Plaque-Aufreinigung dient der Isolierung und Charakterisierung einzelner Virusvarianten aus einem solchen Gemisch verschiedener Viren.

In der Theorie des Plaque-Testes, wird ein Plaque durch ein infektiöses Partikel verursacht, das nach Replikation und Freisetzung die umliegenden Zellen infiziert. Um also einen Überblick über die Virusvarianten eines Isolates zu erhalten, wird ein

Plaquetest auf MDCKII-Zellen durchgeführt. Nach der Replikationsphase sind durch den Agar-Overlay die typischen, kreisrunden Löcher im Zellrasen mit bloßem Auge zu erkennen. Bevor der Assay aber mittels Zellfärbung abgestoppt wird, wobei die Viren durch PFA auch inaktiviert werden, sticht man mit einer 1ml-Pipettenspitze den Agar direkt über einem Plaque aus und überführt den virushaltigen Agar durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in ein 2ml Zentrifugenröhrchen mit 1ml PBS⁺⁺. Das Gefäß wird nun für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C gelagert, in dieser Zeit können die Viren aus dem Agar in die Flüssigkeit diffundieren.

Die Probe kann nun entweder für einen weiteren Plaquetest und eine erneute Plaqueaufreinigung verwendet werden, oder zur Anzucht einer Virusstammsuspension. Dazu werden 25-50µl des virushaltigen PBS in eine 75cm² Zellkultur-Flasche mit MDCK II-Zellen in Infektionsmedium gegeben und bis zum Eintreten eines deutlichen CPE im Brutschrank inkubiert.

3.2.5 Wachstumskurven

Um die replikativen Eigenschaften eines Virus oder den Einfluss bestimmter Mutationen auf die virale Vermehrung zu untersuchen, wird eine Wachstumskinetik durchgeführt. Dazu werden Zellen mit einer definierten Anzahl infektiöser Partikel, der sogenannten *Multiplicity of Infection* (MOI) infiziert und anschließend die Freisetzung neugebildeter Viruspartikel in den Überstand über die Zeit bestimmt.

Die Zellen werden am Vortag in 6cm-Schalen zu 80-90% Konfluenz ausgesät. Zu Beginn des Versuchs wird aus dem Virusstock das Inokulum mit der entsprechenden MOI vorbereitet. Die MOI berechnet sich hierbei aus der Anzahl infektiöser Partikel (pfu/ml) im Verhältnis zu der Anzahl der Zellen:

MOI: Virustiter [pfu/ml] * X = Anzahl Zellen * MOI

$$x = \frac{\text{Anzahl Zellen} * \text{MOI}}{\text{Virustiter [pfu/ml]}}$$

Beispielrechnung für die Infektion einer 6cm-Zellkulturschale mit einer MOI von 1 bei $2,5 \times 10^6$ Zellen und $7,5 \times 10^7$ pfu/ml:

$$x = \frac{2500000 \text{ Zellen} * 1 * 1000\mu\text{l}}{75000000 \text{ pfu}}$$

$$x = 33,3\mu\text{l}$$

Für eine MOI von 1 werden nach diesem Beispiel 33,3µl Virussuspension in einem geeigneten Inokulum-Volumen eingesetzt. Soll die MOI niedriger sein, empfiehlt es sich, die Virusstammuspension vorher in 1:10 Verdünnungsschritten zu verdünnen.

Die Wachstumskinetiken für Kan-1 wurden mit einer MOI von 0,00001 durchgeführt, bezogen auf MDCKII-Zellen (~ 2,5x10⁶ Zellen / 20cm² Schalenfläche). Das bedeutet, es werden 25 pfu eingesetzt, bzw. initial wird 1/100.000 Zellen infiziert. Die Zellen werden vor der Infektion 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend das Inokulum am Rand in die Schale pipettiert. Nach gleichmäßiger Verteilung der Flüssigkeit durch leichtes Schwenken, werden die Zellen für 1h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Inokulum abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Nach dem Waschen gibt man 4ml Infektionsmedium auf die Zellen und inkubiert für die gesamte Periode im Brutschrank. Nach 0, 12, 16, 24, 48, 72 und 96 Stunden wird jeweils 50-100µl des Überstands abgenommen, in beschriftete Cryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C bis zur Bestimmung des Titers mittels Plaque-Assay (3.2.2) gelagert.

3.2.6 Wachstumskurven auf humanen tracheo-bronchialen Epithel-Zellen

Die Infektion von humanen tracheo-bronchialen Epithelzellen (HTBE) erfolgt unter ähnlichen Bedingungen wie die anderer Zellen. Da diese Zellen aber von einer natürlichen Mucus-Schicht bedeckt sind, die kontinuierlich neu gebildet wird, muss diese vor der Infektion gründlich entfernt werden. Dazu werden die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem PBS überschichtet und langsam geschwenkt. Dann erfolgt eine Inkubation für 10' im Brutschrank, während dieser Zeit löst sich die Schleimschicht auf und kann mit einer Pipette abgenommen werden. Dieser Vorgang ist solange zu wiederholen, bis das abgenommene PBS nicht mehr viskos erscheint. Insgesamt sind 5-10 Waschschrte durchzuführen, wobei die Letzten ohne Inkubation im Brutschrank erfolgen können.

Nach dem Absaugen des letzten Wasch-PBS erfolgt die Infektion der Zellen mit 200pfu in einem Volumen von 200µl DMEM ohne Zusätze. Die Zellen werden für 1h im

Brutschrank inkubiert, anschließend das Inokulum abgenommen und die Zellen direkt wieder in den Brutschrank zurückgestellt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten erfolgt die Ernte der freigesetzten Viren. Dazu werden die Zellen mit 400µl DMEM ohne Zusätze beschichtet und für 30'-60' im Brutschrank inkubiert, in regelmäßigen Abständen die Platte schwenken um die Lösung der Mucus-Schicht zu unterstützen. Nach der Inkubation wird das viskose Medium vollständig abgenommen und in ein vorbereitetes 1,5ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Stabilisierung der Viren während der Lagerung wird dem Medium 0,1% BSA zugesetzt. Dazu wird eine 4% BSA-Lösung in DMEM vorbereitet und 10µl dieser Stammlösung pro Zentrifugenröhrchen vorgelegt (1:10 Verdünnung 4% BSA in 400µl ergibt 0,1% Endkonzentration). Durch mehrfaches auf- und Abpipettieren werden virushaltiges Medium und BSA vermischt, anschließend wird die Probe á 200µl aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3 Zellkultur

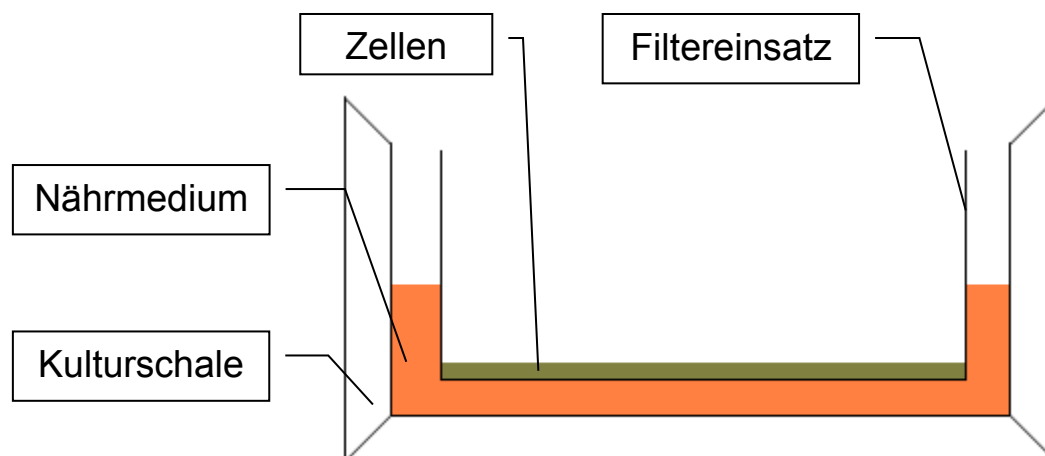
3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten permanenten Zelllinien wurden in speziellen, dem jeweiligen Zelltyp angepassten, Kulturmedien gehalten und passagiert. HEK293T, MDCKII und A549 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), LMH Zellen in RPMI 1640, QT6 in HAM F-10 gehalten (Zusammensetzung der Medien, siehe 2.5.1). Zur routinemäßigen Passage wird das Medium abgegossen und die Zellen mit 5ml vorgewärmtem PBS^{def} durch langsames Schwenken der Flasche gewaschen. Die Verwendung von MgCl₂-defizientem PBS, ebenso wie der Zusatz von EDTA in der Trypsin-Lösung, unterstützt die nachfolgende Trypsin-Behandlung der Zellen, da Inhibitoren der Protease zweiwertige Ionen benötigen. Zusätzlich werden Medienreste, die ebenfalls inhibitorisch auf Trypsin wirken, entfernt. Das PBS^{def} wird abgegossen, und die Zellen mit 1,5-2ml EDTA-haltiger Trypsin-Lösung bedeckt. Während der anschließenden Inkubation im Brutschrank löst das Trypsin die Zellen vom Boden der Kulturflasche, und die abgerundeten Zellen schwimmen vereinzelt in der Lösung. Während der Inkubation wird eine frische Zellkulturflasche mit 20ml frischem Nährmedium vorbereitet. Sobald alle Zellen abgelöst sind, wird 8-8,5ml frisches Medium hinzugegeben um ein ausreichendes Volumen zur Passage zu erhalten. Durch sanftes Auf- und Abpipettieren werden die Zellen homogen verteilt und können nun anteilig in die frische Kulturflasche überführt werden. Beispiel für eine

Passage von HEK293T-Zellen: für eine 1:2 Passage aus 10ml Zellsuspension nach Trypsin werden 5ml in die frische Flasche überführt. Für eine 1:10 Passage entsprechend 1ml der Suspension. Das Verhältnis zur Umsetzung ist Zelltyp-abhängig und sollte im Wechsel einer hohen (1:20 – 1:30) und einer niedrigen (1:2 – 1:5) Aufteilung erfolgen.

3.3.2 Haltung differenzierter humaner tracheobronchealer Epithel-Zellen

Zur Untersuchung der viralen Replikation in humanen Atemwegsepithelzellen wurden in dieser Arbeit ausdifferenzierte HTBE-Zellen verwendet. Diese Zellen werden im Transwell-Filtersystem als so genannte ALI-Kultur (von *air-liquid interface*, Luft-Flüssigkeits-Grenze) gehalten, das heißt im unteren Kulturraum befindet sich Nährmedium, das durch die Filtermembran zu den Zellen gelangt, und im oberen Raum ist Luft (siehe Abbildung). Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen wurden freundlicherweise von Dr. Mikhail und Dr. Tatyana Matrosovich zur Verfügung gestellt und direkt verwendet. Das Medium im unteren Teil des Systems wird alle zwei Tage vollständig gewechselt, dazu wird das alte Medium abgesaugt und durch 700µl frisches Medium ersetzt.



3.3.3 Lagerung von Zellen

Aliquots permanenter Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wird eine konfluent dicht bewachsene Zellkulturflasche vorbereitet. Zuerst wird das alte Nährmedium abgegossen und die Zellen einmal mit vorgewärmtem PBS^{def} gewaschen.

Anschließend folgt die Behandlung mit EDTA-Trypsin, um die Zellen abzulösen. Nachdem alle Zellen vom Boden der Flasche abgelöst sind, wird die Kultur in insgesamt 10ml Medium aufgenommen und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt die sanfte Pelletierung der Zellen in der Zentrifuge für 10' bei 1000rpm. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 4ml Nährmedium mit 10% sterilem DMSO langsam resuspendiert. Die Zellen werden nun á 1ml in Cryoröhrchen aliquotiert und zuerst im Isopropanol-Bad bei -80°C über Nacht gelagert. Dann folgt die Umsetzung der gefrorenen Zellen in den Stickstofftank.

Zum Auftauen eines eingefrorenen Zell-Aliquots wird das Röhrchen aus dem Stickstoff entnommen und zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wird nun zusammen mit 5ml frischem Nährmedium in ein 15ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1000rpm für 10' zentrifugiert. Dieser Schritt dient der Entfernung des DMSO aus dem Medium. Nach der Zentrifuge wird das alte Medium abgesaugt, und das Pellet in 5ml frischem Nährmedium resuspendiert. Das vollständige Volumen wird anschließend in eine 25cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Wenn die Flasche konfluent bewachsen ist, können die Zellen weiter passagiert werden.

3.4 Tierversuche

Um die Pathogenität von Influenza-A-Viren zu bestimmen, werden Mäuse mit diesen infiziert. Die Überlebenszeit und der Gewichtsverlauf nach Infektion sowie der Organotropismus des Virus lassen auf die Virulenz im Mausmodell schließen.

Die Tierversuche mit den hochpathogenen aviären Influenzaviren und ihren Rekombinanten wurden in Kooperation mit Dr. Gülsah Gabriel am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg unter BSL-3-Bedingungen durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass von Mäusen ausgeschiedene und eventuell veränderte Viren nicht freigesetzt werden.

3.4.1 Narkose und Infektion von Balb/c Mäusen

6 – 8 Wochen alte Balb/c Mäuse werden intranasal (i.n.) mit 10¹ p.f.u. nach intraperitonealer (i.p.) Narkose infiziert.

Das Virus wird mit PBS^{def} auf die entsprechende Konzentration, z.B. 10^1 p.f.u. in 50 μ l Endvolumen verdünnt. Die Mäuse werden i.p. mit Ketamin/Xylazin (100 mg/kg Ketamin, 10mg/kg Xylazin) narkotisiert und anschließend die vorbereitete Virusverdünnung mit einer Pipette in die Nasenöffnung geträufelt.

3.4.2 Bestimmung der MTZ

Die Bestimmung der Virulenz der wildtypischen rekombinanten Viren in der Maus erfolgte durch die Bestimmung der mittleren Todeszeit. Dazu werden wie in 3.4.1. beschrieben Balb/c Mäuse mit Virusverdünnungen von 10^3 p.f.u. bis 10^0 p.f.u. infiziert und 14 Tage lang der Gewichtsverlauf und die Überlebenszeit beobachtet. Pro Virusverdünnung wurden jeweils 5 Balb/c Mäuse eingesetzt.

3.4.3 Töten der Mäuse und Organentnahme

Am Tag 3 bzw. 6 nach Infektion werden Mäusen die Organe zu entnehmen. Dazu wurden die Tiere durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Anschließend wird der Brustraum mit einer Schere geöffnet und Herz und Lunge entnommen. Um das Gehirn zu erreichen, muss die Schädeldecke mit der Schere vom *Foramen magnum* ausgehend geöffnet werden. Die Organe werden so schnell wie möglich bei -80°C eingefroren.

3.4.4 Herstellung von Organhomogenisaten

Organhomogenisate werden zur Bestimmung der Virustiter in den einzelnen Organen, Herz, Lunge und Gehirn, hergestellt. Dazu werden Organe gewogen, mit 1 ml PBS^{def} versetzt und durch Scherkräfte bei 30 Hertz für 20 min in einem Homogenisator (MM301, Fa. Retsch) homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation (5000rpm, 5 min) wird der virushaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Die Virusbestimmung erfolgt mittels Plaquetest.

4 Ergebnisse

4.0 Zielgerichtete Mutagenese der PB2-Untereinheit

Nach der Klonierung der einzelnen Virusgene in den Vektor pHW2000 wurde das wildtypische PB2-Gen pHW2000-PB2_{701N-714S} an den Positionen 2103 (aa701) und 2142 (aa714) mittels zielgerichteter Mutagenese-PCR verändert. Die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer sind in der folgenden Tabelle 4.1 aufgelistet:

Kan1_N701D_F	ATT CTA GGC AAG GAG GAC AAA AGG TAT GGA CCA
Kan1_N701D_R	TGG TCC ATA TCT TTT GTC CTC TCT GCC TAG AAT
Kan1_S714I_F	AGC ATC AAT GAA CTG ATC AAT CTT GCA AAA GGG
Kan1_S714I_R	CCC TTT TGC AAG ATT GAT CAG TTC ATT GAT GCT
Kan1_S714R_F	AGC ATC AAT GAA CTG AGG AAT CTT GCA AAA GGG
Kan1_S714R_R	CCC TTT TGC AAG ATT CCT CAG TTC ATT GAT GCT

Tab.4.1 Liste der Primer die zur Herstellung der PB2-Mutanten verwendet wurden. In rot ist das mutierte Codon, in fett das substituierte Nukleotid hervorgehoben.

Im Anschluss an die Plasmid-Präparation wurden die Gene durch Sequenzierung auf das Vorhandensein der gewünschten und das Fehlen unerwünschter Mutationen hin überprüft. Zur Generierung der Doppelmutanten pHW2000-PB2_{701D-714I} und pHW2000-PB2_{701D-714R} wurde das mutierte pHW2000-PB2_{701D} Plasmid einer zweiten zielgerichteten Mutagenese unterzogen, und ebenfalls durch Sequenzierung überprüft.

A/Thailand/1 (Kan-1)/2004	701	714
PB2 NS (wt)	N	S
PB2 NI	N	I
PB2 NR (SC35M-ähnlich)	N	R
PB2 DS (aviär-typisch)	D	S
PB2 DI (gs/gd-ähnlich)	D	I
PB2 DR	D	R

Tab.4.2 Liste der mittels reverser Genetik hergestellter Virusmutanten von A/Thailand/1(Kan-1)/04.

Die so hergestellten Aminosäure-Kombinationen im Gen der PB2-Untereinheit sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die bekannten säuger-adaptiven Aminosäuren (701N und 714R) sind rot, die aviär-typischen, nicht-adaptiven Aminosäuren (701D und 714S) grün gekennzeichnet. Die Mutation 714I, deren Einfluss auf die Anpassung der Viren noch unbekannt war, wird in orange dargestellt.

4.1 *in vitro* Bestimmung der Aktivität der viralen Polymerase

Um einen ersten Eindruck vom Einfluss der eingebrachten Mutationen auf die Transkriptions-Aktivität der viralen Polymerase zu erhalten, wurde die Aktivität im Mini-Replikon-Assay bestimmt. Dazu wurden die Komponenten des Polymerase-Komplex in Form von Plasmid-DNA, pHW2000-PB2, pHW2000-PB1 und pHW2000-PA, sowie das Nukleoprotein pHW2000-NP zusammen mit den beiden Luziferase-Plasmiden (pPoll-NP-luc und pGL4.73[*hRluc*/SV40]) in HEK293T Zellen transfiziert (3.1.11).

4.1.1 Polymerase-Aktivität in Säugerzellen

4.1.1.1 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in HEK293T Zellen

In den ersten Versuchen zur Messung der Polymerase-Aktivität im Mini-Replikon-Assay wurde deutlich, dass die Aktivität der viralen Polymerase des hochpathogenen H5N1 Isolats A/Thailand/1(Kan-1)/04 (im Folgenden als Kan1 bezeichnet) unerwartet niedrig ist. So lagen die relativen Werte der Negativkontrolle bezogen auf die Aktivität der Polymerase bei 80%. Da dieselben pHW2000-Plasmide pHW2000-Kan1PB2, pHW2000-Kan1PB1, pHW2000-Kan1PA und pHW2000-Kan1NP aber erfolgreich zur Produktion rekombinanter Viren eingesetzt werden konnten, und somit die grundsätzliche Funktionalität der Plasmide gegeben war, führte dieses Resultat zum experimentellen Vergleich der H5N1 Polymerase mit der Polymerase des pandemischen H3N2 Isolats A/Hong Kong/1/68 in HEK293T Zellen. Hier zeigte sich, dass die Polymerase des hochpathogenen Virus im selben Vektorhintergrund (pHW2000) nur zu einem geringen Bruchteil (~5%) die Aktivität des pandemischen H3N2 Virus erreicht (Abb. 4.1 A). Zum Vergleich, wie in Abb. 4.1 A und B zu sehen, liegt der relative Strahlungshintergrund der H3N2-Negativkontrolle bei 0,9-2%. Die Aktivität der H3N2-Polymerase wurde zur Bestimmung der relativen Aktivität als 100% Aktivität festgelegt und die weiteren Proben dazu in Relation gesetzt.

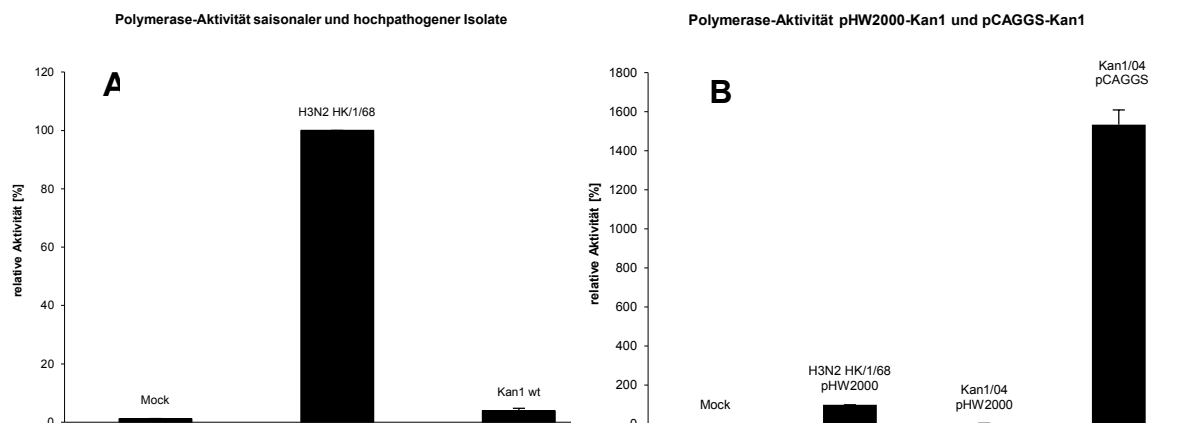


Abb. 4.1 (A) Vergleich der Polymerase-Aktivität des hochpathogenen H5N1 Isolats A/Thailand/1(Kan-1)/04 mit der des pandemischen H3N2 Isolats A/Hong Kong/1/68. (B) Polymerase-Aktivität im Vergleich nach Umklonierung der Polymerase-Gene des hochpathogenen Isolats in pCAGGS. Die Aktivität der H3N2-Polymerase wurde arbiträr auf 100% Aktivität gesetzt um die relative Aktivität der weiteren Proben zu bemessen (A, B).

Da der, aus der niedrigen Polymerase-Aktivität resultierende, hohe relative Strahlungshintergrund die Analyse einer potentiellen Aktivitätsverringering durch die eingefügten Mutationen unmöglich macht, wurden die Gene der viralen Polymerase des hochpathogenen H5N1 Virus in den stärkeren Expressionsvektor pCAGGS umkloniert. Die verstärkte Proteinexpression wird hier durch die Kombination eines Verstärkerelements des CMV-IE-Promotors mit dem β -Aktin-Promotor aus dem Huhn erreicht. Nach Verifizierung der Gensequenz erfolgte eine erneute Analyse der viralen Polymerase-Aktivität in HEK293T Zellen. Hier zeigt sich deutlich, dass die Polymerase des hochpathogenen H5N1 Isolats aktiv ist (Abb. 4.1 B) und eine etwa 15-fach höhere relative Aktivität als die humane H3N2 Polymerase im pHW2000-Hintergrund aufweist. Die weitere Untersuchung der im PB2-Gen eingeführten Mutationen erfolgte entsprechend mit den Plasmiden pCAGGS-Kan1PB2 (und Mutanten), pCAGGS-Kan1PB1, pCAGGS-Kan1PA und pCAGGS-Kan1NP.

Um die Auswirkung der Mutationen hinsichtlich ihres adaptiven Potentials besser einordnen zu können, wurde die aviär-typische Polymerase (PB2_{701D-714S}, PB2 DS) arbiträr als 100% aktiv gesetzt. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, führt die Mutation des PB2 D701N zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität der viralen Polymerase um das 4,5-fache (PB2_{701N-714S}, PB2 NS). Mutiert man im Hintergrund des aviär-typischen 701D die Aminosäure S714 zu Isoleucin (PB2_{701D-714I}, PB2 DI), so steigt die Aktivität der Polymerase signifikant ($p = < 0,0001$) auf das Doppelte der Polymerase PB2 DS.

Durch die Substitution des S714 durch Arginin wird die Polymerase dagegen fast so aktiv wie durch den Austausch D701N. Es kommt hier zu einer Erhöhung um das 4,3-fache im Vergleich zur aviär-typischen Polymerase.

Kombiniert, führen die Mutationen D701N-S714I und D701N-S714R zu einer weiteren, signifikanten Steigerung der Polymerase-Aktivität. So ist die Aktivität der Mutante PB2 NI (PB2_{701N-714I}) 6,8x gegenüber der Polymerase PB2 DS erhöht, und damit sogar signifikant ($p < 0,0005$) höher als PB2 NS alleine. Der Austausch zu Arginin (PB2_{701N-714R}, PB2 NR) steigert die Aktivität sogar auf das 31-fache, und ist damit auch im Hintergrund von 701N mit einer stärkeren Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Austausch 714I verbunden.

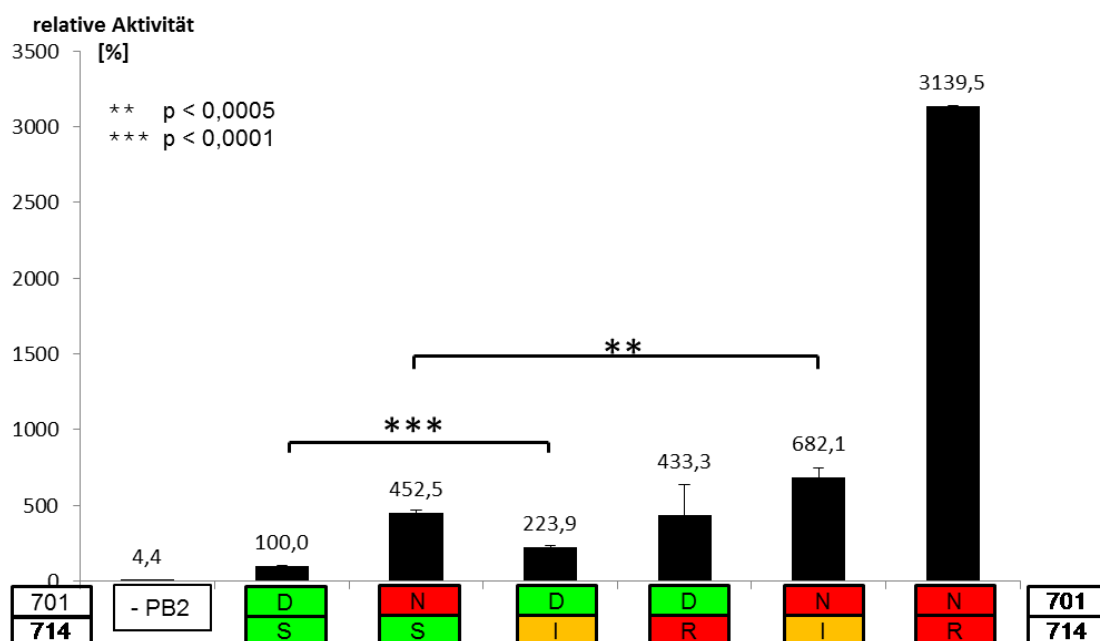


Abb. 4.2 Vergleich der PB2-Mutanten im Mini-Replikon-Assay. Je 50ng der Plasmide pCAGGS-NP, pCAGGS-PA, pCAGGS-PB1 und der entsprechenden pCAGGS-PB2-Mutante wurden mit LipofectAmin2000 nach Herstellerprotokoll in konfluente HEK293T Zellen transfiziert. Als Reporter gen wurde das Plasmid pPol I-NP-luc verwendet, die Transfektionseffizienz durch Ko-Transfektion einer Renilla-Luziferase normalisiert.

Insgesamt ist also zu beobachten, dass die Mutation D701N, wie sie im isolierten Virus A/Thailand/1 (Kan-1)/04 nachgewiesen wurde, zu einer starken Steigerung der Polymerase-Aktivität in Säugerzellen führt. Die Mutationen des Serin 714 im PB2 sind unabhängig von Aminosäure 701 in der Lage die Aktivität zu erhöhen. Dabei ist der Einfluss des Arginin in HEK293T Zellen deutlich stärker, als der des Isoleucins.

4.1.1.2 Polymerase-Aktivität von A/Goose/Guangdong/1/96 in HEK293T Zellen

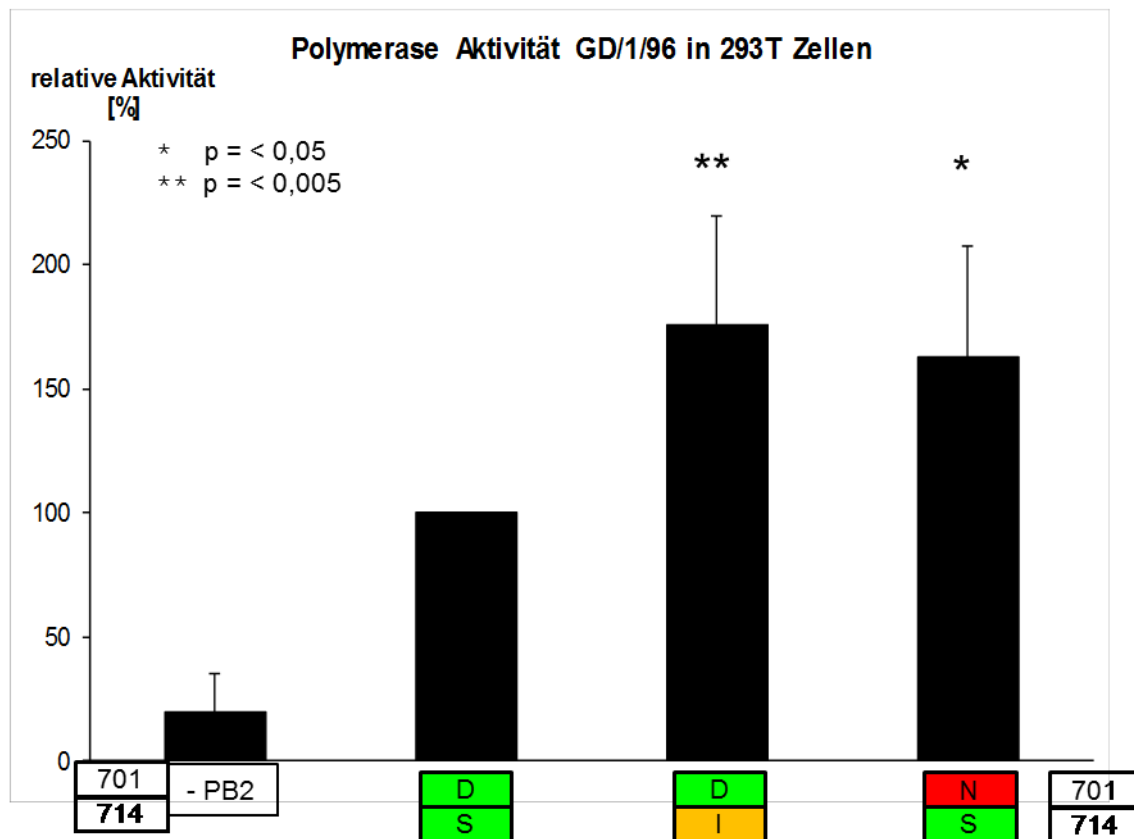


Abb. 4.3 Aktivität der Polymerase des hochpathogenen aviären Isolats A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1). Je 200ng der Plasmide pCDNA3.0-NP, pCDNA3.0-PA, pCDNA3.0-PB1 und den entsprechenden pCDNA3.0-PB2-Mutanten wurden mit LipofectAmin2000 in HEK293T Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden durch Ko-Transfektion die Plasmide pPol I-NP-Luc und pGL4.73[hRLuc/SV40] als Reportergen und Transfektionsstandard eingebracht.

Die Untersuchung der aviären Polymerase eines aus Gänsen stammenden hochpathogenen H5N1 Isolats (A/Goose/Guangdong/1/96) zeigt ebenfalls, dass die Mutation der Aminosäure PB2 D701N in Säugerzellen einen steigernden Einfluss auf die Polymerase-Aktivität hat. In diesem Fall ist die Steigerung allerdings nicht so stark ausgeprägt, wie für die Polymerase von A/Thailand/1(Kan-1)/04 gezeigt. Hier beträgt die Steigerung im Mittel 60% ($p = < 0,05$) im Vergleich zur wildtypischen Polymerase. Einen ebenso deutlichen und signifikanten Anstieg der Polymerase-Aktivität verursacht die Mutation PB2 S714I, wie sie in den gs/gd-ähnlichen Viren von 2001 aufgetreten ist. Substituiert man das Serin 714 in der PB2 Untereinheit von A/Goose/Guangdong/1/96 durch ein Isoleucin, so kommt es zu einer Erhöhung der Polymerase-Aktivität um 70% ($p = < 0,005$).

Aufgrund nicht genauer untersuchter Defekte in einigen der pol I-pol II-Plasmide konnten im Verlauf der Arbeit keine rekombinanten A/Goose/Guangdong/1/96-Viren hergestellt werden. Stattdessen wurden alle Untersuchungen zu adaptiven Mutationen im Hintergrund des A/Thailand/1(Kan-1)/04-Virus durchgeführt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Mutation D701N in der PB2-Untereinheit der viralen Polymerase einen stark positiven Einfluss auf die Aktivität der Polymerase in Säugerzellen hat. Durch die Einführung einer weiteren Mutation S714I/R kann die Aktivität darüber hinaus weiter gesteigert werden. Beide Mutationen scheinen dabei die Aktivität der Polymerase unabhängig voneinander zu beeinflussen.

4.1.2 Polymerase-Aktivität in Vogelzellen

4.1.2.1 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in LMH Zellen

Transfiziert man die virale wildtypische Polymerase und die entsprechenden PB2-Mutanten in Zellen aus dem Huhn, so ergibt sich ein etwas anderes Bild als in Zellen humanen Ursprungs. Die Rückmutation der adaptiven Aminosäure

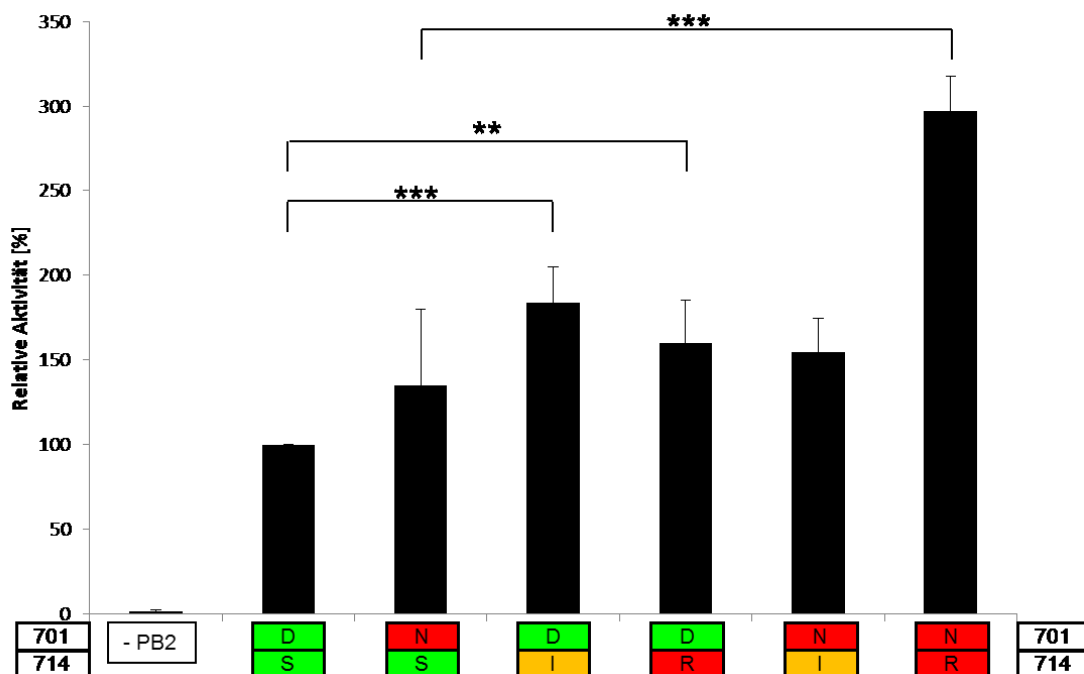


Abb. 4.4 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 und den abgeleiteten PB2-Mutanten. Je 50ng der Plasmide pCAGGS-NP, pCAGGS-PA, pCAGGS-PB1 und der entsprechenden pCAGGS-PB2-Mutante wurden mit LipofectAmin2000 nach Herstellerprotokoll in konfluente Hühnerzellen (LMH) transfiziert. Als Reportergen wurde das Plasmid pPol I-NP-luc verwendet, die Transfektionseffizienz durch Ko-Transfektion einer Renilla-Luziferase normalisiert.

PB2 N701D führt in diesem Fall nicht zu einer Reduktion der Polymerase-Aktivität. Die Mutante PB2_{701D-714S} (PB2 DS) zeigt hier die gleiche Aktivität wie die wildtypische Polymerase (PB2_{701N-714S}, PB2 NS). Eine zusätzliche Mutation des S714 zu 714I, bzw. 714R ist, wie auch in HEK293T Zellen für eine Erhöhung der Aktivität verantwortlich, jedoch ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt.

So zeigt die Mutante PB2_{701N-714I} (PB2 NI) eine ähnliche, signifikante Steigerung der Aktivität wie in Säugerzellen ($p = < 0,005$), die Mutante PB2_{701N-714R} hingegen führt nicht zu einer vergleichbaren, 8-fachen Erhöhung der Aktivität. Stattdessen ist die Aktivität der PB2_{701N-714R} Mutanten nur doppelt so hoch wie die wildtypische Polymerase. Im Hintergrund der aviär-typischen Konstellation PB2_{701D} führt auch hier die zusätzliche Substitution an PB2 714 zu Isoleucin bzw. Arginin zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität des Polymerase-Komplexes ($p = < 0,005$). Die Erhöhung der Aktivität ist allerdings nicht ganz so stark ausgeprägt wie in der Kombination PB2_{701N-714I}, bzw. PB2_{701N-714R}, da PB2_{701D-714R} die Aktivität nur um 50%, PB2_{701D-714I} um 70% im Vergleich zur aviär-typischen Mutanten PB2_{701D-714S} steigert.

4.1.2.2 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in QT6 Zellen

Im Unterschied zu den Zellen aus dem Huhn, in denen die wildtypische (PB2_{701N-714S}, PB2 NS) und aviär-typische (PB2_{701D-714S}, PB2 DS) Polymerase die gleiche relative Aktivität zeigen, ist die Aktivität der aviär-typischen Polymerase in Zellen aus der Wachtel bedeutend höher als die der wildtypischen, säuger-adaptierten Polymerase. Wie in den humanen und anderen aviären Zellen, erhöhen auch hier die Mutationen PB2 S714I und S714R die Aktivität der Polymerase weiter, jedoch ist in den Wachtelzellen die Isoleucin-Variante mit einem größeren Zuwachs an Aktivität verbunden.

Hier erhöht S714I im Kontext der wildtypischen Polymerase die Aktivität um das 9-fache (PB2_{701N-714I}, PB2 NI), wohingegen S714R – anders als in den humanen Zellen, die Aktivität nur auf das Doppelte ansteigen lässt (PB2_{701N-714R}, PB2 NR). Die Aktivitätssteigernden Effekte beider Mutationen an aa714 wirken im Kontext der aviär-typischen Variante 701D weniger stark, dennoch ist die Steigerung durch S714I (PB2_{701D-714I}, PB2 DI), anders als die durch S714R (PB2_{701D-714R}, PB2 DR), signifikant ($p = < 0,05$).

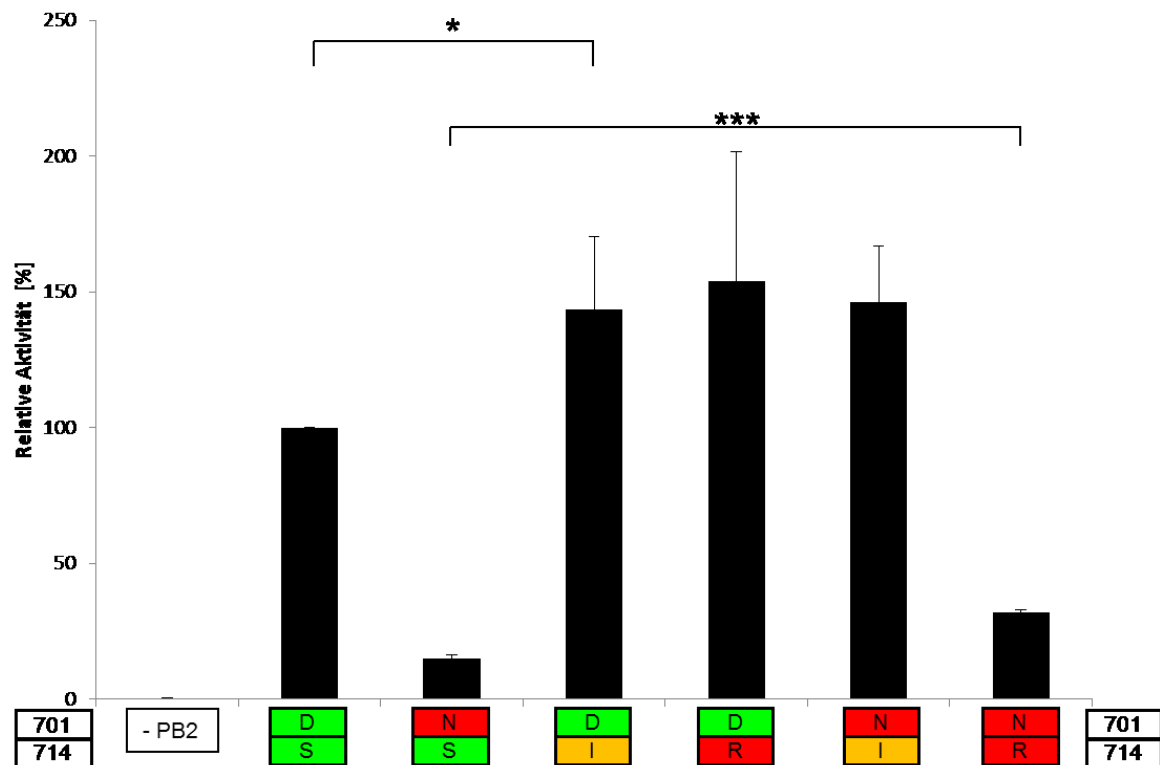


Abb. 4.5 Polymerase-Aktivität von A/Thailand/1(Kan-1)/04 und den abgeleiteten PB2-Mutanten. Je 50ng der Plasmide pCAGGS-NP, pCAGGS-PA, pCAGGS-PB1 und der entsprechenden pCAGGS-PB2-Mutante wurden mit LipofectAmin2000 nach Herstellerprotokoll in konfluente Hühnerzellen (LMH) transfiziert. Als Reporter gen wurde das Plasmid pPol I-NP-luc verwendet, die Transfektionseffizienz durch Ko-Transfektion einer Renilla-Luziferase normalisiert.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die Mutation PB2 D701N in Zellen aus Vögeln keinen positiven Einfluss auf die Aktivität der viralen Polymerase hat. Die Mutation S714I/R dagegen führt auch in aviären Zellen zu einer Steigerung der Polymerase-Aktivität, wobei die Steigerung abhängig von der Vogelspezies unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

4.2 Wachstumsverhalten der Virusmutanten in Zellen aus Vögeln und Säugern

4.2.1 Herstellung rekombinanter Viren mittels reverser Genetik

Unter rekombinanten Viren versteht man in der Virologie Viren, die mittels reverser Genetik generiert werden. In dieser Arbeit wurde nach dem von Hoffmann et al. 2000 publizierten Protokoll zur Herstellung rekombinanter Viren verfahren. Dazu werden die 8 viralen Gene als DNA-Plasmide in HEK293T-Zellen transfiziert. Die zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen I und II transkribieren die genetische Information entsprechend der im Plasmid vorliegenden Promotoren in virale mRNA (Pol II) und vRNA (Pol I). Aus den viralen mRNAs erfolgt in der Zelle die Synthese viraler Proteine. Die neu synthetisierten Untereinheiten des viralen Polymerase-Komplexes (PB2, PB1, PA und NP) werden aufgrund der vorhandenen Kernimport-Signale zurück in den Zellkern transportiert und unterstützen dort die weitere Neusynthese viraler

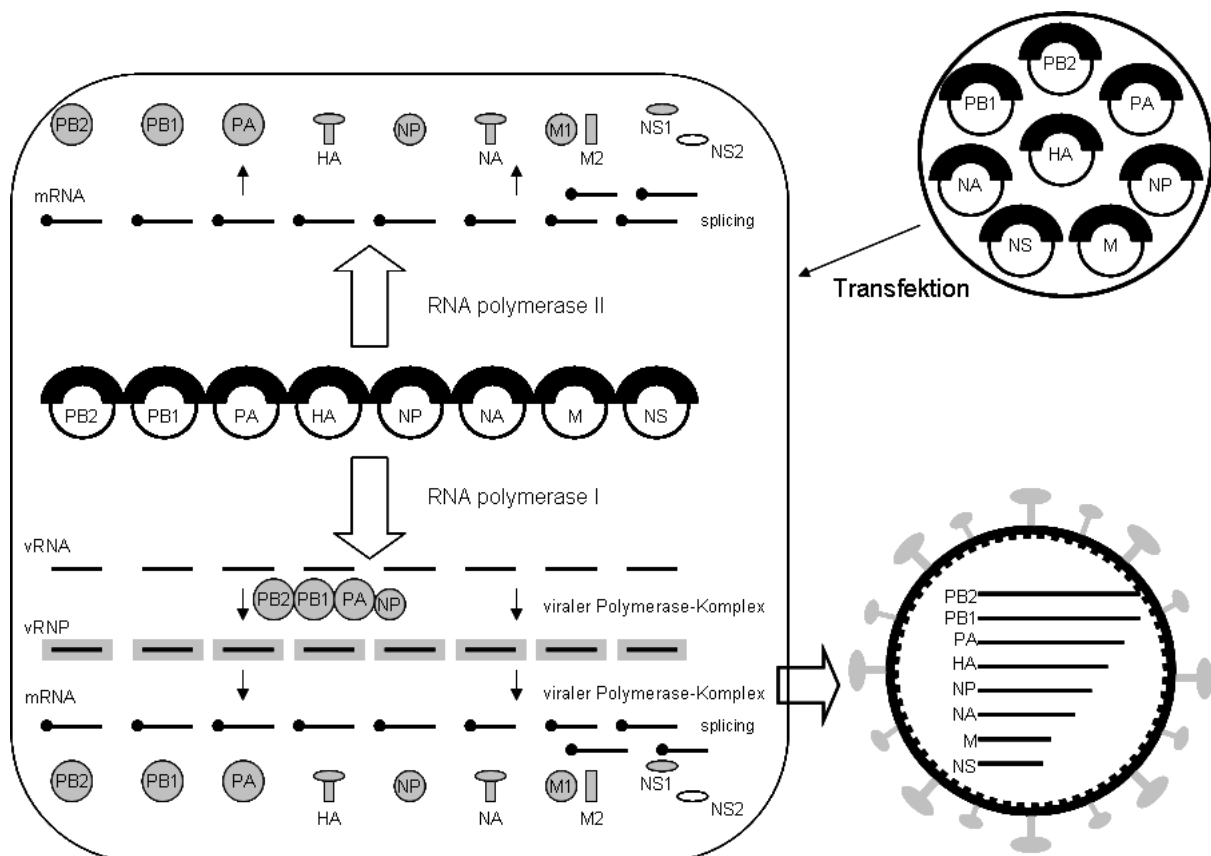


Abb. 4.6 Schematische Darstellung der reversen Genetik von Influenza-A-Viren nach Hoffmann et al. 2000. Die Abbildung zeigt die 8 zu transfizierenden Plasmide, die je für ein virales Gen kodieren, die in der Zelle ablaufenden RNA- und Proteinsyntheseschritte und ein neugebildetes Virion.

Ribonukleoprotein-Strukturen (vRNPs), bestehend aus viraler RNA, Polymerase und Nukleoprotein. Diese vRNPs werden an die Plasmamembran transportiert und lagern sich zusammen mit den restlichen viralen Proteinen zu neuen Virionen zusammen, die anschließend in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Durch Infektion von MDCKII-Zellen erfolgte die erste Virusvermehrung in Zellkultur.

Um die geringe Aktivität der viralen Polymerase in Säugerzellen auszugleichen, wurden die Proteine der wildtypischen viralen Polymerase über die Expressionsplasmide pCAGGS-Kan1-PB2 (WT), pCAGGS-Kan1-PB1, pCAGGS-Kan1-PA und pCAGGS-Kan1-NP zusätzlich in den Zellen exprimiert. Die von den pCAGGS-Plasmiden exprimierten viralen Polymerase-Proteine dienen ausschließlich zur Unterstützung der Transkription und Replikation der vRNA-Spezies die von den pHW2000-Plasmiden durch die zelluläre RNA-Polymerase I synthetisiert werden. Da die genetische Information der wildtypischen pCAGGS-exprimierten Polymerase-Proteine nur zu mRNA transkribiert werden kann, liegt in den neu gebildeten Viren ausschließlich die durch die pHW2000-Plasmide eingebrachte vRNA als Gensegment für die neuen Viren vor. So ließen sich auch die Viren mit aviär-typischen Mutationen verlässlich und in ausreichender Konzentration herstellen.

Die so produzierten Viren wurden auf MDCKII-Zellen in Zellkulturflaschen mit 75cm² Fläche vermehrt, für die anschließenden Versuche aliquotiert und bei -80°C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Virustiter und die Verifizierung der jeweiligen Mutationen durch Sequenzierung (PB2_{701N-714S} $8,85 \times 10^7 \pm 7,78 \times 10^6$ pfu/ml, rKan1-PB2_{701N-714I} $5,30 \times 10^7 \pm 1,41 \times 10^6$ pfu/ml, rKan1-PB2_{701N-714R} $3,00 \times 10^7 \pm 2,83 \times 10^6$ pfu/ml, rKan1-PB2_{701D-714S} $8,10 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^5$ pfu/ml, rKan1-PB2_{701D-714I} $3,25 \times 10^6 \pm 6,36 \times 10^5$ pfu/ml und rKan1-PB2_{701D-714R} $1,78 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^6$ pfu/ml). Um unerwünschte Mutationen auszuschließen, wurden alle Virusmutanten vollständig sequenziert. Hierbei konnten in den Viren keine unerwünschten Mutationen neben den eingebrachten Veränderungen im PB2-Gen festgestellt werden.

4.2.2 Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren in Säugerzellen

4.2.2.1 Vergleich der Plaquegrößen

Schon während der Bestimmung des Titers der aliquotierten Virusstammuspensionen zeigten sich Unterschiede im Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren auf MDCKII Zellen. Die Plaques der Viren rKan1-PB2_{701N-714S} und rKan1-PB2_{701N-714I} waren von weitgehend homogener Größe und etwa gleichem Durchmesser, während die Plaques der Mutante rKan1-PB2_{701N-714R} inhomogener im Durchmesser erschienen. Die drei aviär-typischen Viren rKan1-PB2_{701D-714S}, rKan1-PB2_{701D-714I}, und rKan1-PB2_{701D-714R} bildeten durchweg inhomogen große Plaques mit deutlich unterschiedlichen Durchmessern (Abb. 4.7). Zur Bestimmung der Durchmesser (Abb. 4.8) wurden die Viren in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen für 40h unter Plaque-Overlay Medium mit 1,8% Bacto-Agar inkubiert.

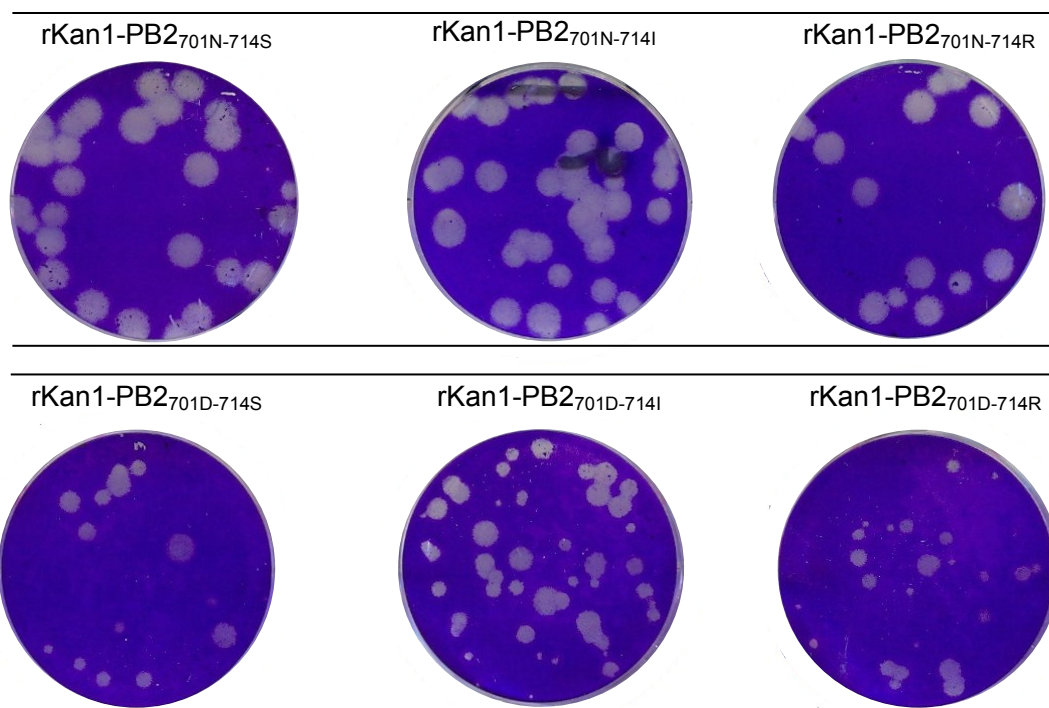


Abb. 4.7 Plaquegrößen der rekombinanten Kan1-Viren mit und ohne Mutationen in der PB2-Untereinheit in MDCKII-Zellen. Die Platten wurden 40h lang unter Plaque-Overlay nach Infektion inkubiert und anschließend mit Kristalviolett gefärbt. Die ausgewählten Bilder sind repräsentativ für alle Titrationen mit Kristalviolett.

Anschließend erfolgte die Fixierung und Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett und Ausmessung der Plaques am Bildschirm nach Einscannen der Platten. Der durch die Vergrößerung am Bildschirm bedingte Faktor von 0,921 ist in der Berechnung der Durchmesser berücksichtigt.

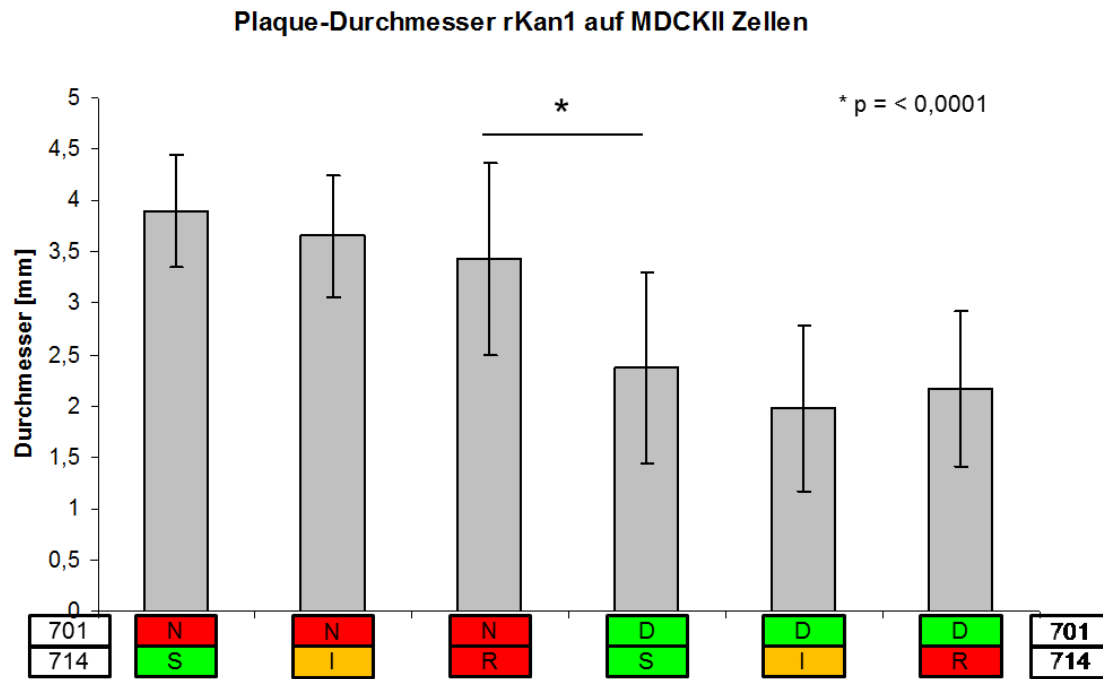


Abb. 4.8 Darstellung der Plaque-Durchmesser des wildtypischen rekombinanten Virus A/Thailand/1(Kan-1)/04 (NS) und der abgeleiteten PB2-Mutanten. Gemessen wurde der innere Durchmesser von je 27-47 einzelnen Plaques nach Anfärbung durch Kristallviolett.

Es zeigt sich, dass das wildtypische Virus (NS) mit $3,9 \pm 0,5\text{mm}$ die größten Plaques ausbildet. Die Mutanten rKan1-PB2_{701N-714I} (NI) und rKan1-PB2_{701N-714R} (NR) bilden kleinere ($3,7 \pm 0,6\text{mm}$ und $3,4 \pm 0,9\text{mm}$, respektive) Plaques. Signifikant kleiner ($p = < 0,0001$) sind die Plaques aller drei aviär-typischen Virusmutanten: rKan1-PB2_{701D-714S} (DS) $2,4 \pm 0,9\text{mm}$, rKan1-PB2_{701D-714I} (DI) $1,8 \pm 0,8\text{mm}$, und rKan1-PB2_{701D-714R} (DR) $2,2 \pm 0,8\text{mm}$.

Aus dieser Untersuchung lassen sich ersten Erkenntnisse über das Replikationsverhalten der einzelnen rekombinanten Viren ableiten. So zeigt sich, dass Viren mit PB2701N schneller replizieren und sich effizienter ausbreiten können als die Mutanten mit PB2701D.

4.2.2.2 Wachstumsverhalten von rKan1 auf MDCKII Zellen

Zuerst wurde das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren mit wildtypischen (rKan1 PB2_{701N}) und aviär-typischen (rKan1 PB2_{701D}) PB2-Gen untersucht, um einen ersten Eindruck vom Einfluss der Mutation in dieser Polymerase-Untereinheit auf das virale Wachstum zu bekommen. Hierzu wurden wie unter 3.2.5 beschrieben, MDCKII-Zellen in Zellkulturschalen mit einer MOI von 0,0001 infiziert.

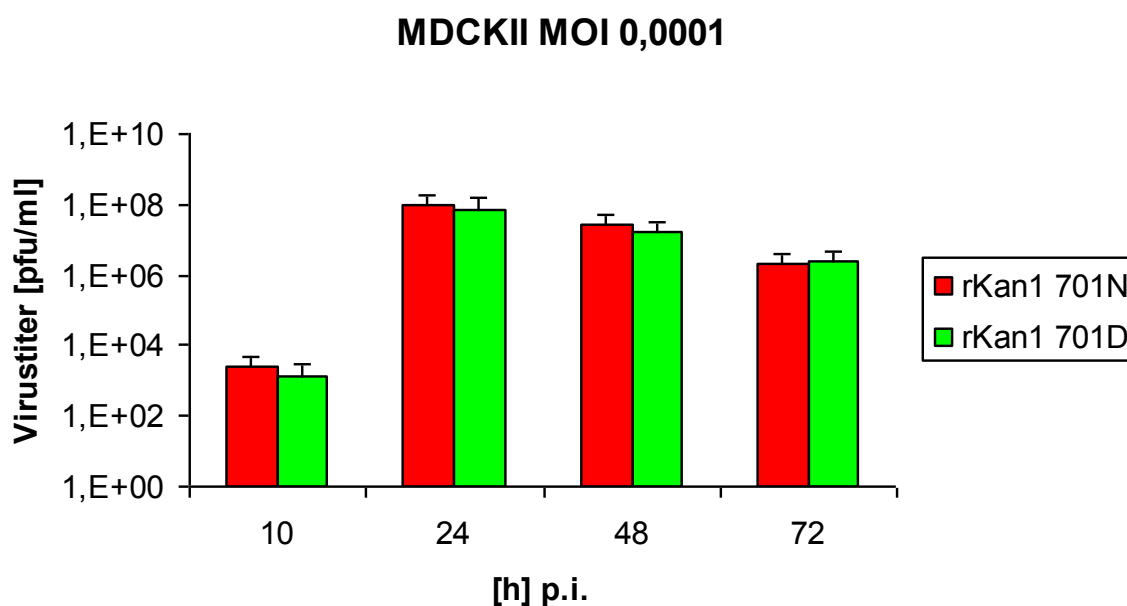


Abb. 4.9 Vergleich der beiden rekombinanten Viren rKan1 PB2_{701N} und rKan1 PB2_{701D}. Konfluente MDCKII Zellen wurden mit einer MOI von 0,0001 infiziert und in Infektionsmedium für 72h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Im direkten Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen der aviär-typischen Mutante rKan1 PB2_{701D} und dem wildtypischen Virus ist kein Unterschied festzustellen. Zu allen Zeitpunkten erreichen beide Viren die gleichen, hohen Titer, mit einem Maximum von knapp 10⁸ pfu/ml nach 24h. Die Untersuchung des viralen Wachstums wurde dann anschließend mit einer 10-fach niedrigeren MOI durchgeführt, also jede 100.000ste Zelle einer 6-cm Schale infiziert. Je niedriger die initiale Anzahl infizierter Zellen, desto stärker können sich Einflüsse auf die Replikationseffizienz und Replikationsgeschwindigkeit auswirken.

Infiziert man MDCKII-Zellen mit einer sehr niedrigen MOI, ergibt sich ein etwas differenzierteres Bild als vorher. Hier zeigt sich, dass das wildtypische Virus rKan1 PB2_{701N} während der frühen Infektionsphase einen Replikationsvorteil gegenüber dem

aviär-typischen Virus rKan1 PB2_{701D} hat. Bereits 16 Stunden nach der Infektion erreicht das wildtypische Virus signifikant ($p < 0,01$) höhere Titer ($3,53 \times 10^4 \pm 1,38 \times 10^4$ pfu/ml) als die aviäre Mutante ($4,13 \times 10^3 \pm 1,59 \times 10^3$ pfu/ml). Auch 24 Stunden nach Infektion unterscheiden sich die Titer der beiden Viren rKan1 PB2_{701N} ($1,17 \times 10^7 \pm 5,3 \times 10^6$ pfu/ml) und rKan1 PB2_{701D} ($1,31 \times 10^6 \pm 7,66 \times 10^5$ pfu/ml) noch signifikant ($p < 0,05$), allerdings beträgt die Differenz zwischen den Titern nur knapp eine Log₁₀-Stufe.

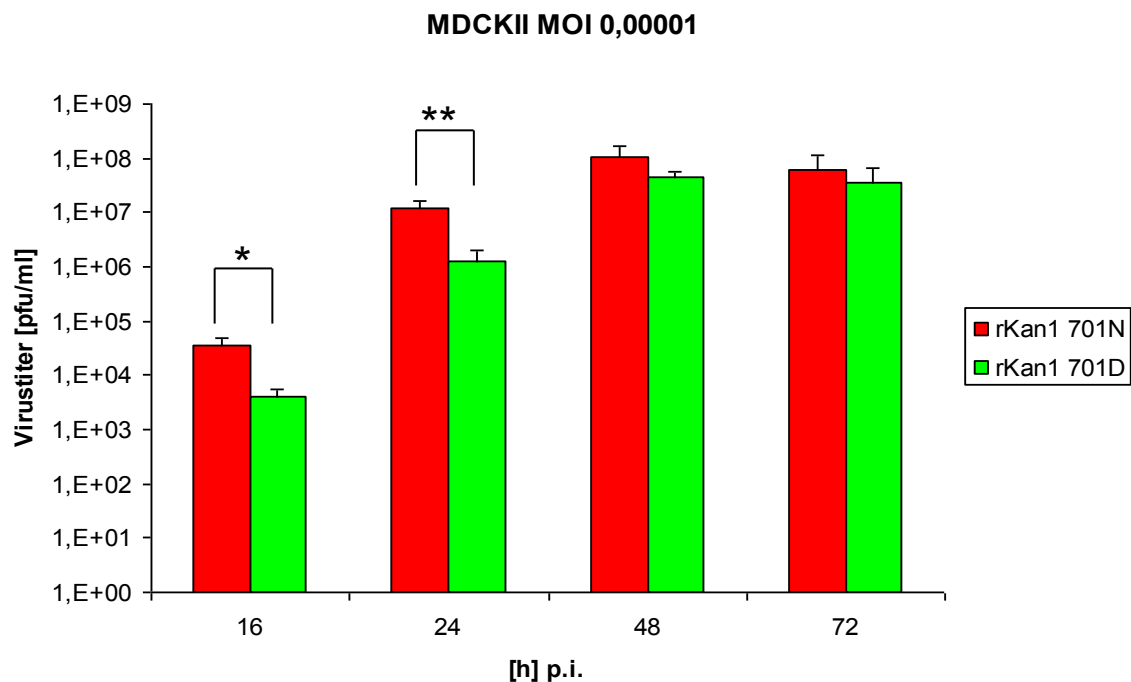


Abb. 4.10 Vergleich der beiden rekombinanten Viren rKan1 PB2701N und rKan1 PB2701D. Konfluente MDCKII Zellen wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert und in Infektionsmedium für 72h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Maximale Titer erreichen beide Viren bei dieser sehr niedrigen MOI von 0,00001 nach 48h p.i., also 24 Stunden später als nach einer Infektion mit einer MOI von 0,0001. Um den weiteren Einfluss der Mutationen PB2_{S714I} und PB2_{S714R} auf die Replikation *in vitro* zu untersuchen, wurden nachfolgend auch die entsprechenden rekombinanten Viren mit Einzel- und Doppelmutation auf MDCKII-Zellen charakterisiert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert.

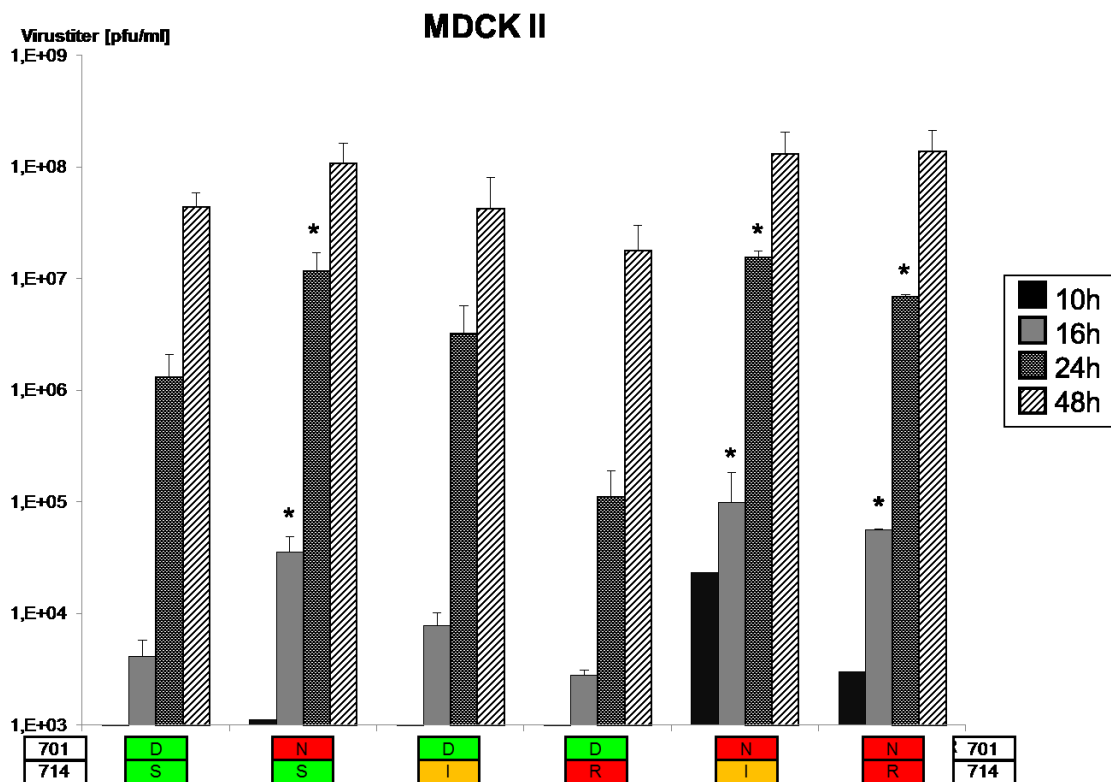


Abb. 4.11 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus rKan1 PB2701N und der abgeleiteten PB2-Mutanten. Konfluente MDCKII Zellen wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert und in Infektionsmedium für 72h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Im direkten Vergleich der rekombinanten Viren mit Mutationen in der PB2-Untereinheit ist zu beobachten, dass die Viren mit einem Asparagin (N) an Position 701 während der ersten 24h nach Infektion zu signifikant höheren Titern wachsen ($p = < 0,05$), als die Mutanten mit der aviären Aminosäure Aspartat (D). Die Replikation dieser Viren erscheint also während der frühen Replikationsphase beschleunigt, das Maximum der Titer (PB2_{701N-714S} $1,08 \times 10^8 \pm 5,59 \times 10^7$ pfu/ml, PB2_{701N-714I} $1,33 \times 10^8 \pm 7,06 \times 10^7$ pfu/ml, PB2_{701N-714R} $1,4 \times 10^8 \pm 7,27 \times 10^7$ pfu/ml) ist nach 48h erreicht. Die zur aviär-typischen Signatur PB2_{701D} mutierten Viren erreichen ebenfalls 48h nach Infektion die höchsten Titer, das Maximum liegt aber 0,5 – 1 log₁₀ unter den Titern der Viren mit PB2_{701N} (PB2_{701D-714S} $4,4 \times 10^7 \pm 1,48 \times 10^7$ pfu/ml, PB2_{701D-714I} $4,25 \times 10^7 \pm 3,84 \times 10^7$ pfu/ml, PB2_{701D-714R} $1,78 \times 10^7 \pm 1,22 \times 10^7$ pfu/ml). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Studien zur Aktivität der Polymerase im Mini-Replikon-Assay, führt die zusätzliche Mutation des Serin (S) an Position 714 zu Isoleucin (I) oder Arginin (R) weder in der Kombination 701N noch 701D zu einer signifikanten Beschleunigung der Replikation, oder zu höheren Titern. Im Gegenteil, erreichen z.B. die Viren mit der Kombination

PB2_{701D-714R} zu jedem Zeitpunkt die niedrigsten Titer, trotzdem liegt der maximale Titer wie bei allen anderen Varianten nach 48h vor. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der ermittelten Polymerase-Aktivität, die in HEK293T Zellen nahezu der wildtypischen Polymerase entspricht.

Zusammenfassend bestätigen sich die in der Plaque-Messung beobachteten Unterschiede. Die Viren mit PB2 701N replizieren schneller und erreichen höhere Titer als die Viren mit PB2 701D. Darüber hinaus korrelieren virales Wachstum und Polymerase-Aktivität der PB2 701N-Varianten insofern, als dass die erhöhte Aktivität durch PB2 701N die Vermehrung beschleunigt. Die weitere Mutation an PB2 S714I/R hat in MDCKII Zellen keinen positiven Einfluss auf das virale Wachstum.

4.2.2.3 Wachstumsverhalten von rKan1 auf A549-Zellen

Da es sich bei MDCKII-Zellen um Tumorzellen aus der Hundeniene handelt, wurde die Untersuchung der Wachstumskinetik auch in einer permanenten Zelllinie aus der humanen Lunge, A549-Zellen, durchgeführt. Die Zellen wurden wie in den vorangegangenen Versuchen mit einer MOI von 0,00001 infiziert, und anschließend für 96h kultiviert. Die Probennahme erfolgte alle 24h.

Anders als auf MDCKII-Zellen, zeigen die rekombinanten Viren in Zellen aus der humanen Lunge ein deutlicher differenziertes Bild. Die rekombinanten Viren PB2_{701N-714S}, PB2_{701N-714I} und PB2_{701N-714R} wachsen auch hier deutlich schneller und zu höheren Titern und erreichen ihr Maximum nach 48h ($2,82 \times 10^7 \pm 1,44 \times 10^7$ pfu/ml, $4,48 \times 10^7 \pm 3,15 \times 10^7$ pfu/ml und $7,1 \times 10^7 \pm 1,72 \times 10^7$ pfu/ml respektive). Die rekombinanten Viren mit der aviär-typischen Aminosäure PB2701D, PB2_{701D-714S}, PB2_{701D-714I} und PB2_{701D-714R} erreichen erst 72h nach Infektion ihre maximalen Titer von $7,42 \times 10^6 \pm 6,8 \times 10^6$ pfu/ml, $1,44 \times 10^7 \pm 3,81 \times 10^6$ pfu/ml und $4,08 \times 10^6 \pm 2,32 \times 10^6$ pfu/ml respektive.

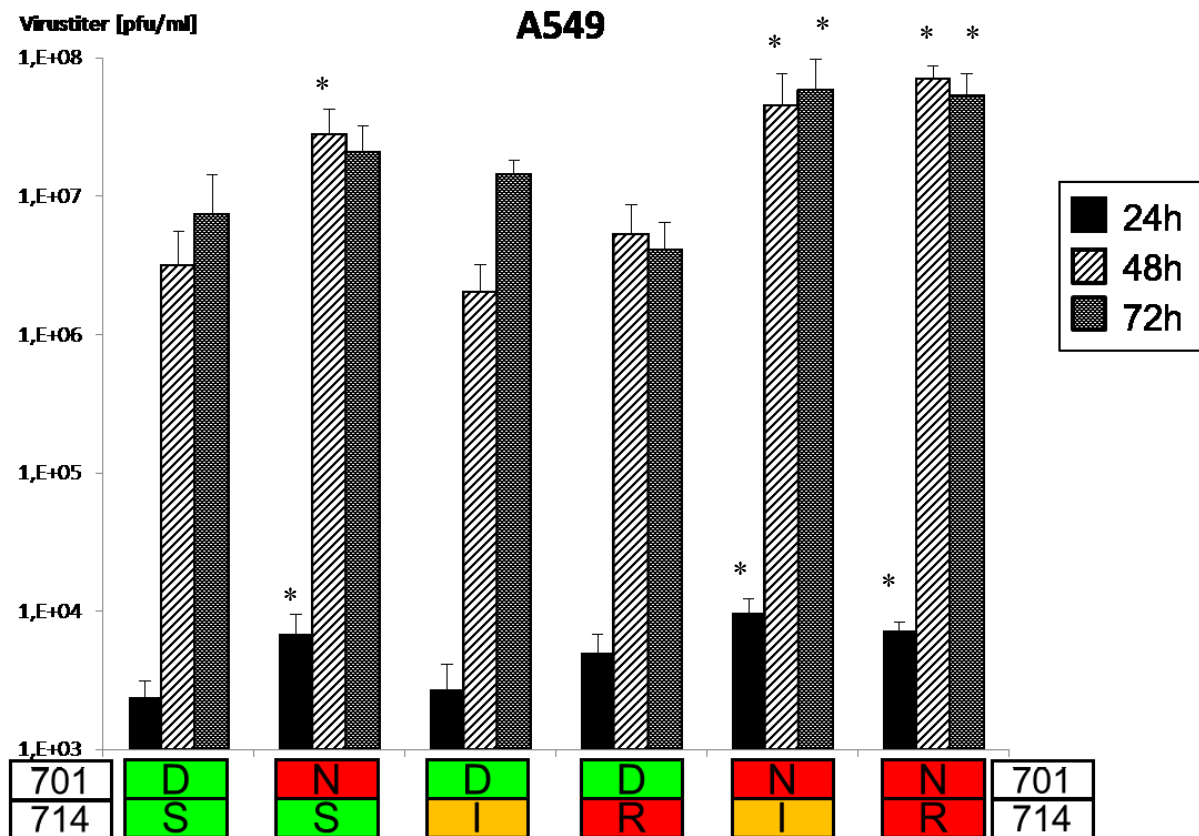


Abb. 4.12 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus rKan1 PB2_{701N} und der abgeleiteten PB2-Mutanten. Konfluent gewachsene humane Lungenkarzinomzellen (A549) wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert und in Infektionsmedium für 72h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Auch innerhalb der beiden Virusgruppen (PB2_{701N-714S}, PB2_{701N-714I}, PB2_{701N-714R} und PB2_{701D-714S}, PB2_{701D-714I}, PB2_{701D-714R}) ergeben sich auf A549-Zellen zum Teil signifikante Unterschiede in der viralen Replikation. So wächst die Mutante PB2_{701N-714R} innerhalb der ersten 48h zu signifikant höheren Titern ($p < 0,01$) als das wildtypische Virus, und dieser Unterschied bleibt über den gesamten restlichen Zeitverlauf bestehen. Die Mutante PB2_{701N-714I} wächst ebenfalls im gesamten Zeitverlauf zu höheren Titern als das wildtypische rekombinante Virus, allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant ($p_{72h} = 0,071$).

Anders als während der Infektion von MDCK-Zellen wachsen alle Viren mit der aviären Aminosäure PB2 701D auf vergleichbarem Niveau. Die Doppelmutante PB2_{701D-714R} erreicht nach 24h sogar fast dieselben Titer wie das wildtypische Virus und unterscheidet sich damit signifikant von der Mutante PB2_{701D} ($p < 0,05$), allerdings steigen die Titer im weiteren Verlauf der Infektion nicht so stark an, sodass die

Replikationsgeschwindigkeit der Mutante PB2_{701D-714R} im späteren Verlauf der Infektion wieder der der anderen PB2_{701D}-Mutanten gleicht.

Die Schlussfolgerung aus der Untersuchung zur Replikation in Zellen aus der humanen Lunge ist, dass Viren mit PB2 701N einen deutlichen Replikationsvorteil gegenüber Viren mit PB2 701D haben. Anders als in MDCKII-Zellen erhöht aber PB2 714R die Replikation in der frühen Phase der Infektion noch einmal signifikant.

4.2.2.4 Wachstumsverhalten von rKan1 auf Zellen aus dem humanen Atemwegsepithel

Infektionsstudien in immortalisierten Zelllinien wie MDCKII oder A549 stellen ein artifizielles System dar, das den tatsächlichen Verlauf einer Infektion des Atemwegsepithels nur bedingt reflektiert. Um dem natürlichen Ablauf einer Infektion so nah wie möglich zu kommen, wurde die Infektion dementsprechend auch noch in Zellen aus dem humanen Atemwegsepithel durchgeführt. Die humanen tracheo-bronchialen Epithelzellen (HTBE) wachsen auf Filtern an der Grenze zwischen Luft und Medium (die sogenannte *air-liquid-interface*, ALI) und differenzieren nach einer Zeit in Kultur zu den typischen zilienträgenden und mucusproduzierenden Gewebszellen des oberen Respirationstraktes. Eine weitere Besonderheit der HTBE-Kulturen ist die differenzierte Expression endständiger Neuraminsäuren auf der Oberfläche der Zelltypen. So finden sich auf der Oberfläche der zilienträgenden Zellen dominant α 2-3 glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren, die mucusproduzierenden Zellen exprimieren dagegen primär α 2-6 glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren. Dieser Unterschied führt dazu, dass aviäre und humane Influenzaviren aufgrund ihrer unterschiedlichen Rezeptorspezifität (α 2-3 für aviäre und α 2-6 für humane Isolate) präferentiell an die entsprechenden Zelltypen binden und diese initial infizieren (Matrosovich et al., 2004). In der Abb. 4.13 sind Zellen einer mit A/Thailand/1(Kan-1)/04 infizierten Kultur zu zwei Zeitpunkten (8h und 24h) nach Infektion abgebildet.

Wie in 4.13 (A, 8h p.i.) zu sehen, binden und infizieren die H5N1 Viren entsprechend ihrer aviären Rezeptorspezifität die zilienträgenden Zellen. Später, wenn sich die Viren ausbreiten und die nebenstehenden Zellen infizieren, kommt es auch zur Infektion von mucusproduzierenden Zellen (Abb. 4.13. B, C, 24h p.i.), wobei zilienträgende Zellen weiterhin bevorzugt werden.

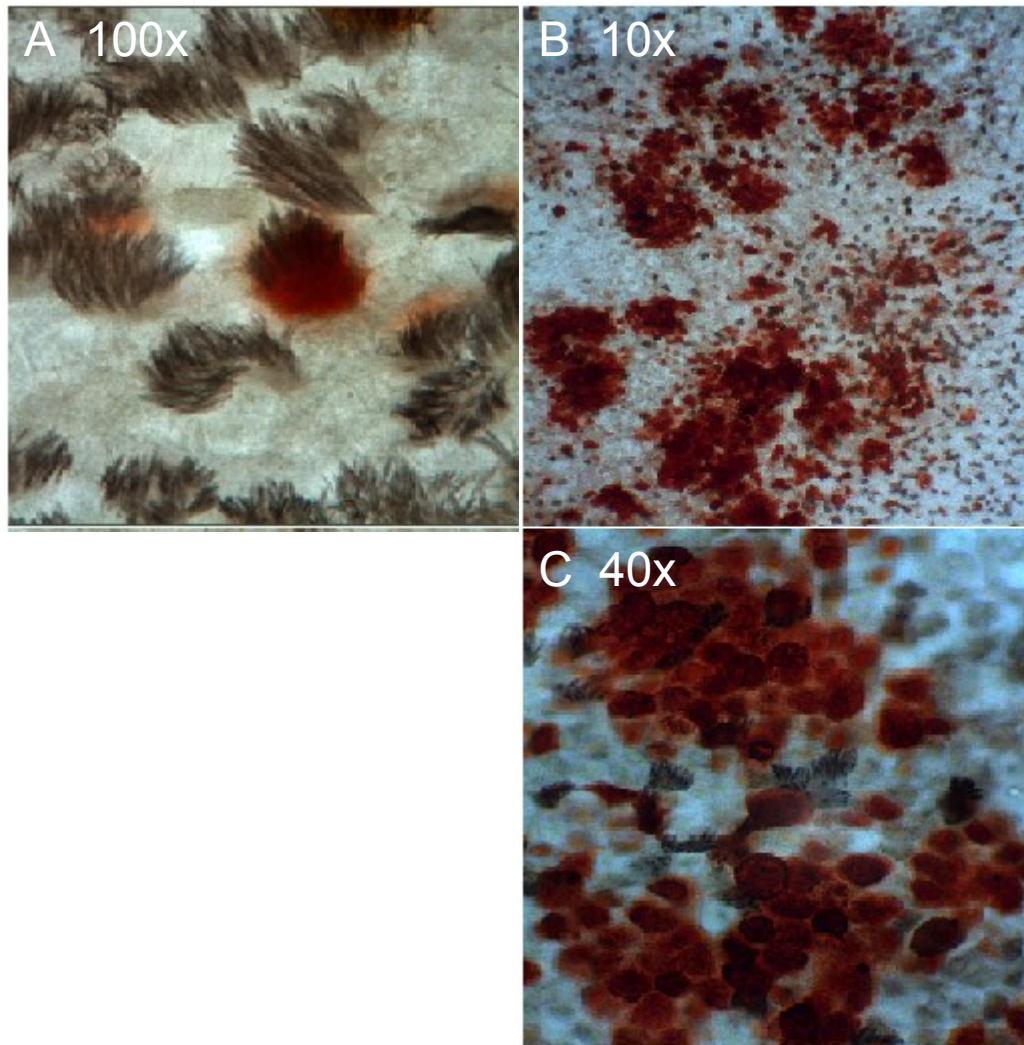


Abb. 4.13 Zelltropismus von A/Thailand/1(Kan-1)/04 in HTBE-Zellen. Wie in der 100fachen Vergrößerung (A) zu sehen, werden initial ausschließlich zillientragende Zellen infiziert (8h p.i.). B und C zeigen die Ausbreitung der Infektion in die umliegenden Zellen in 10x (B) und 40x (C) Vergrößerung (24h p.i.). Die Zilien wurden mit einem anti-Tubulin-Antikörper sichtbar gemacht, die Infektion wurde mit einem Antikörper gegen A/Tern/South Africa/1961 (H5N3) nachgewiesen (Bilder freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Matrosovich).

Zur Untersuchung des Infektionsverlaufs wurden je vier konfluent bewachsene Filter mit 200pfu pro Virus infiziert und anschließend analysiert. Die Auswertung der Virustiter muss für jeden Filter individuell betrachtet werden. Zum einen, weil sich die Filter hinsichtlich der Zellzusammensetzung unterscheiden, zum anderen, weil zur Virusernte der neugebildete Mucus mit den darin enthaltenen Viren abgenommen werden muss und es hier nicht immer zu einer gleichmäßigen Auflösung der Schleimschicht kommt. Dadurch kann es zu Unterschieden bei den Virustitern kommen, die aber nicht generalisiert für alle Filter gewertet werden dürfen.

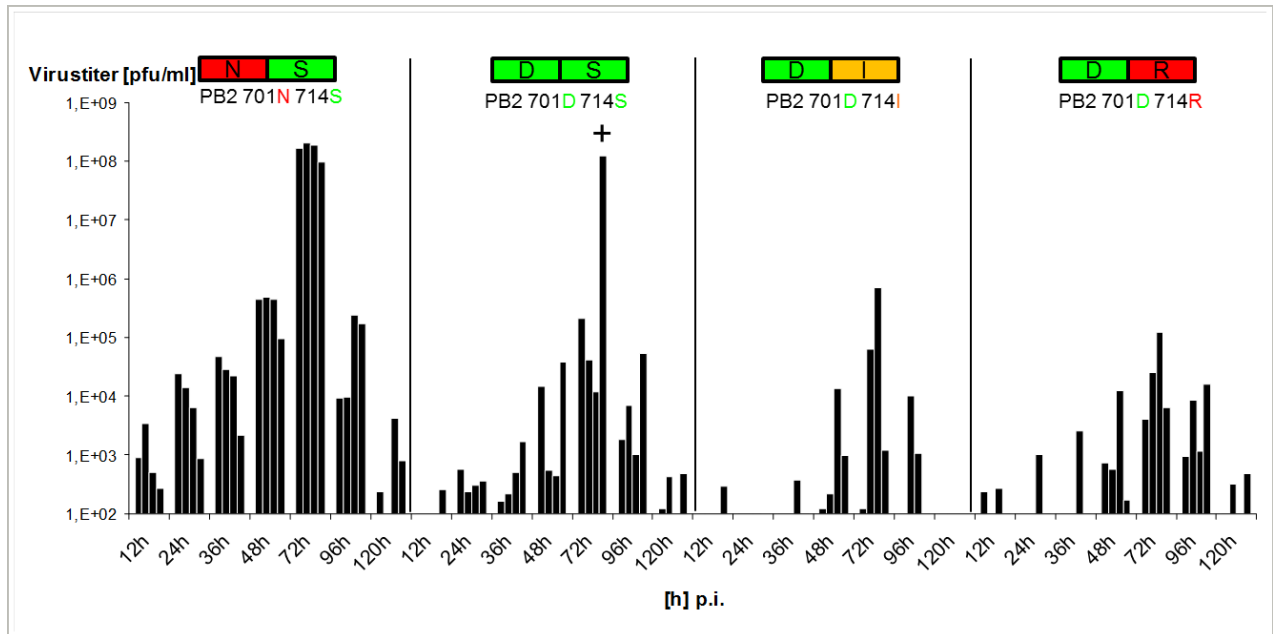


Abb. 4.14 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus rKan1 PB2701N-714S und der PB2-Mutanten rKan1 PB2701D-714S, rKan1 PB2701D-714I und rKan1 PB2701D-714R. Pro Virus wurden 4 Transwell-Filter differenzierter humaner tracheo-bronchialer Epithelzellen (HTBE) mit je 200pfu, bezogen auf MDCKII-Titer, infiziert. Die Zellen wurden an der air-liquid-interface (ALI) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. (+) aufgrund der adaptiven Mutation PB2-E627K erreicht das aviär-typische Virus einen dem wildtypischen Virus vergleichbar hohen Titer (siehe unten).

So zeigt Abb. 4.14 die Virustiter auf den einzelnen Filtern im zeitlichen Verlauf des Versuchs, und in Bezug auf die unterschiedlichen Replikationseigenschaften der untersuchten Virusmutanten ergibt sich hier ein eindeutiges Bild. Während das wildtypische rekombinante Virus PB2_{701N-714S} in allen Filtern zu einer ausgeprägten Infektion führt, die 72h p.i. maximale Titer von bis zu 10⁸ pfu/ml (im Mittel 1,62x10⁸ ± 4,65x10⁷ pfu/ml) erreicht, scheint die Infektion durch die aviären Mutanten PB2_{701D-714S}, PB2_{701D-714I} und PB2_{701D-714R} nicht in allen Filtern zu einer effizienten Virusvermehrung zu führen (z.B. Abb. 4.14 rKan1 PB2_{701D-714I} Filter#1 zeigt über den gesamten Zeitverlauf nur minimale Titer).

Alle Mutanten erreichen ihre maximalen Titer ebenfalls 72h p.i., allerdings liegt die Anzahl infektiöser Partikel pro Milliliter bei den drei aviär-ähnlichen Mutanten 2-3 log₁₀ Stufen unter dem des wildtypischen Virus (Abb. 4.14 72h p.i. PB2_{701D-714S} #1: 2,0⁸x10⁵ pfu/ml, PB2_{701D-714I} #3: 7,03x10⁵ pfu/ml und PB2_{701D-714R} #3: 1,21x10⁵ pfu/ml). Die Substitution S714I bzw. S714R führt hier im Vergleich zu der Mutante PB2_{701D-714S} nicht zu einer Steigerung der Replikationsgeschwindigkeit.

Auffällig ist, dass in einer der mit der Mutante PB2_{701D-714S} infizierten Kulturen (Abb. 4.14 Filter #4 (+)), der maximale Titer nach 72h mit $1,24 \times 10^8$ pfu/ml dem Mittelwert des wildtypischen Virus PB2_{701N-714S} $1,62 \times 10^8 \pm 4,65 \times 10^7$ pfu/ml entspricht.

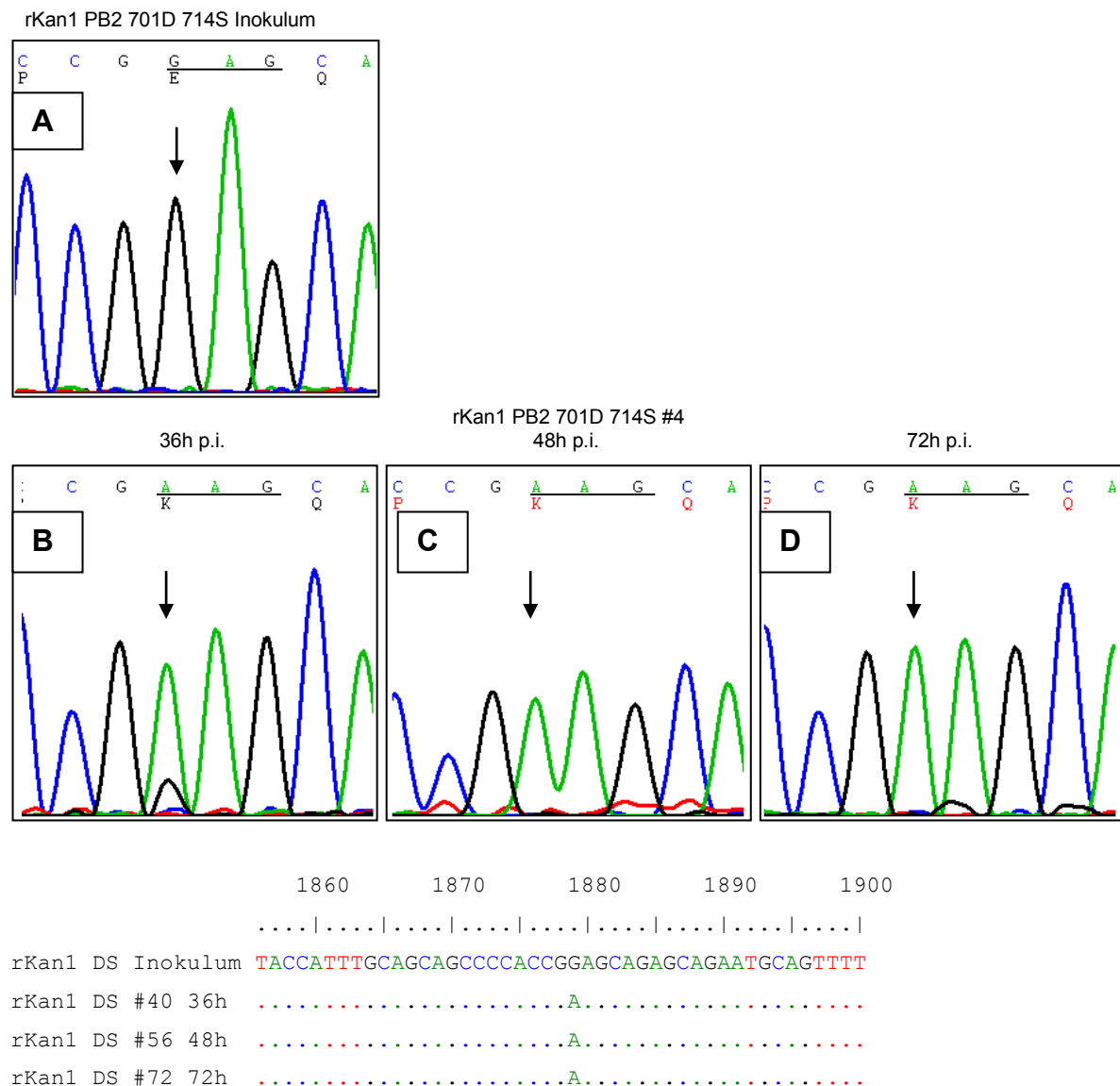


Abb. 4.15 Chromatogramm der PB2-Sequenzierung im zeitlichen Verlauf. Im PB2-Gen der Virusstammsuspension (A) findet sich an nt1789 ein Guanidin (G) im Codon GAG für Glutamat (E), schon 36h p.i. (B) ist die Mutation G1789A in der Viruspopulation dominant (80% 1789A vs. 20% 1789G). Weitere 12 Stunden später (C) ist das ursprüngliche Guanidin vollständig durch Adenosin ersetzt. Das neue Codon AAG kodiert für Lysin (K) an PB2 627.

Eine Sequenzanalyse (Abb. 4.15) der Viren aus dieser Probe ergab, dass im Verlauf der Infektion eine alternative adaptive Mutation in der PB2-Untereinheit, E627K aufgetreten ist (Abb. 4.15 D). Die nachfolgende Untersuchung der früheren Zeitpunkte ergab hier, dass diese Substitution schon sehr früh (36h p.i., Abb. 4.15. B) während der

Infektion aufgetreten ist, und bereits 48h p.i. die ursprüngliche PB2 Variante PB2_{627E} vollständig überwachsen hat (Abb. 4.15 C).

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Infektion durch das humane H5N1 Isolat A/Thailand/1 (Kan-1)/04 vom pandemischen Isolat A/Hamburg/05/09 (H1N1) (HH/05) unterscheidet, und ob es Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem rekombinanten H5N1 Virus (rKan1) und dem natürlichen H5N1 Isolat (iKan1) gibt. Entsprechend wurden wieder pro Virus vier, bzw. fünf Filter mit ausdifferenzierten HTBE Zellen mit je 200pfu infiziert und alle 24h Proben genommen. Hier zeigt sich, dass es keinen Unterschied zwischen dem rekombinanten Virus und dem natürlichen Isolat im Wachstum gibt. Beide Viren wachsen im Mittel über den Beobachtungszeitraum zu gleichen Titern: rKan1 erreicht 48h nach Infektion im Mittel $2,05 \times 10^7 \pm 4,43 \times 10^6$ pfu/ml und iKan1 $1,32 \times 10^7 \pm 2,49 \times 10^6$ pfu/ml.

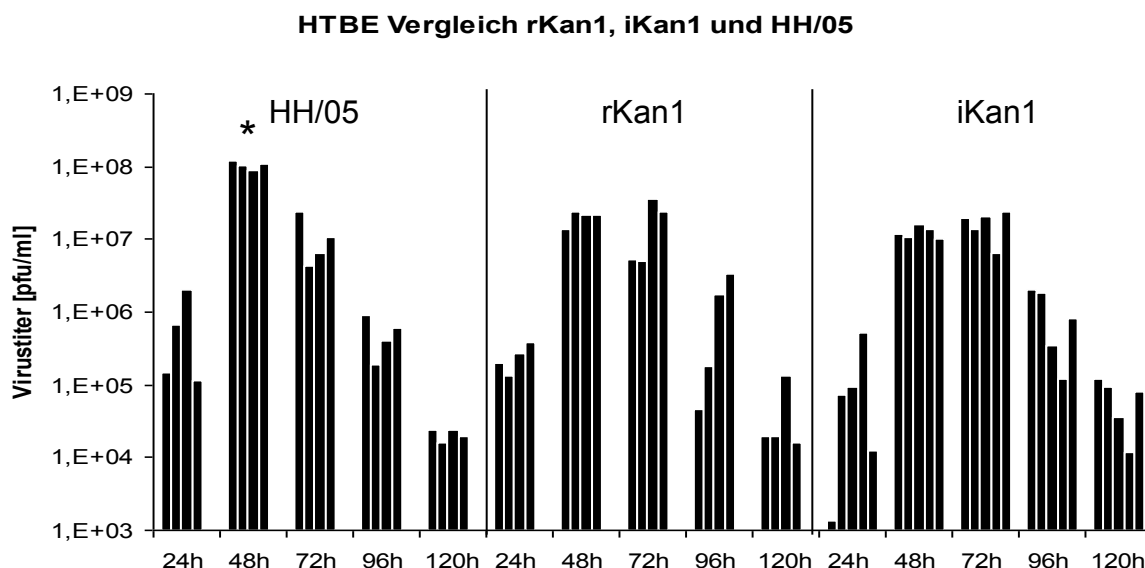


Abb. 4.16 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus (rKan1) mit dem Isolat A/Thailand/1(Kan-1)/04 (iKan1) und dem pandemischen H1N1 Isolat A/Hamburg/05/09 (HH/05). Pro Virus wurden 4 (5 bei iKan1) Transwell-Filter differenzierter humaner tracheo-bronchialer Epithelzellen (HTBE) mit je 200pfu, bezogen auf MDCKII-Titer, infiziert. Die Zellen wurden an der air-liquid-interface (ALI) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Das pandemische H1N1 Isolat A/Hamburg/05/09 (HH/05) dagegen wächst innerhalb der ersten 48h p.i. zu höheren Titern, die sich im Mittel ($1,06 \times 10^8 \pm 1,18 \times 10^7$ pfu/ml) signifikant von den beiden H5N1 Viren unterscheiden ($p = < 0,0001$). Hinsichtlich des CPE war zwischen den drei Viren kein Unterschied zu erkennen.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass Viren des Subtyps H5N1 nach Adaptation effizient in Zellen aus dem humanen Atemwegsepithel replizieren können. Viren ohne adaptive Veränderungen replizieren schlechter, vorteilhafte Mutationen können aber spontan auftreten und tragen dann zur effizienten Virusvermehrung bei. Die bekannten Mutationen PB2 D701N und PB2 E627K tragen unabhängig von einander in gleichem Maße zur Adaptation an das humane Atemwegsepithel bei. Im direkten Vergleich zwischen einem hochpathogenen humanen H5N1 Isolat und einem pandemischem H1N1 Isolat zeigt sich, dass die H1N1-Viren auch ohne bekannte adaptive Mutationen in der PB2-Untereinheit effizienter in HTBE-Zellen replizieren können. Dies ist vor allem auch unter dem Aspekt interessant, dass das PB2-Protein des (dreifach-reassortanten) pandemischen Virus von 2009 aviären Ursprungs ist.

4.2.3 Wachstumsverhalten rekombinanter Viren in aviären Zellen

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Einfluss der einbrachten Mutationen auf die virale Replikation in Säugerzellen wurde das virale Wachstum auch in Zellen aus dem Vogel analysiert. Da die Substitutionen PB2 N701D und S714I bzw. S714R im Mini-Replikon-Assay auch in aviären Zellen eine gesteigerte Polymerase-Aktivität zur Folge hatten, sollte überprüft werden, ob diese Steigerung auch Auswirkungen auf die Replikationsgeschwindigkeit in der Zellkultur haben. Es wurden im Versuch Zellen aus dem Huhn (LMH) und aus der Wachtel (QT6) jeweils mit einer MOI von 0,00001 infiziert und zu den entsprechenden Zeitpunkten Proben genommen.

4.2.3.1 Wachstumsverhalten von rKan1 auf LMH-Zellen

In der Infektion epithelialer Hepatokarzinom-Zellen aus dem Huhn (LMH) zeigt sich zwischen den rekombinanten Viren ein deutlicher Unterschied in der frühen Phase der Replikation. Die aviär-typische Mutante rKan1 PB2_{701D-714S} erreicht 16h p.i. die höchsten Titer ($9,26 \times 10^4 \pm 2,36 \times 10^4$ pfu/ml) und liegt damit signifikant ($p = < 0,005$) über dem wildtypischen Virus rKan1 PB2_{701N-714S} ($2,85 \times 10^4 \pm 1,73 \times 10^4$ pfu/ml). Zu diesen Viren vergleichbar hohe Titer erreichen die beiden Mutanten, die zusätzlich die Substitution S714I im PB2 tragen, rKan1 PB2_{701D-714I} ($7,04 \times 10^4 \pm 5,64 \times 10^4$ pfu/ml) und rKan1 PB2_{701N-714I} ($2,75 \times 10^4 \pm 1,52 \times 10^4$ pfu/ml). Im Gegensatz dazu wachsen die beiden Mutanten rKan1 PB2_{701N-714R} und rKan1 PB2_{701D-714R} innerhalb der ersten 24 Stunden stark verzögert. So erreicht die Mutante rKan1 PB2_{701N-714R} mit $5,53 \times 10^3 \pm 1,89 \times 10^3$ pfu/ml nach 16h signifikant niedrigere Titer als die beiden anderen Viren mit

PB2_{701N} ($p = < 0,05$) und auch nach 21h liegt der Titer mit $1,50 \times 10^5 \pm 1,16 \times 10^5$ pfu/ml noch deutlich unter dem der Viren rKan1 PB2_{701N-714S} ($1,40 \times 10^6 \pm 9,52 \times 10^5$ pfu/ml) und rKan1 PB2_{701N-714I} ($2,44 \times 10^6 \pm 1,82 \times 10^6$ pfu/ml).

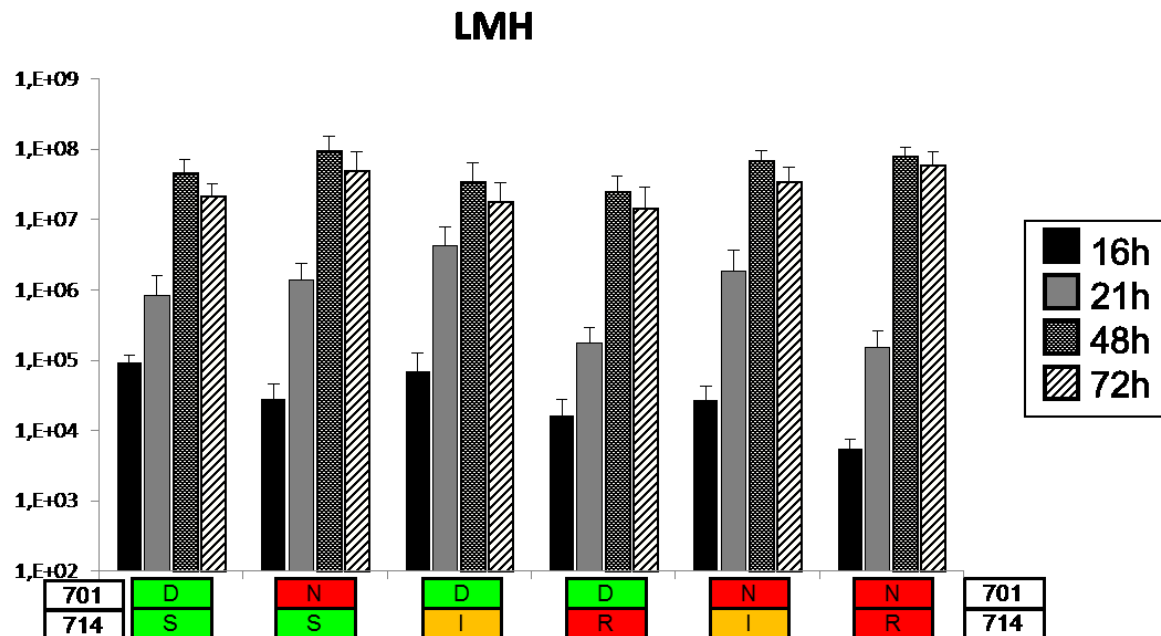


Abb. 4.17 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus rKan1 PB2701N und der abgeleiteten PB2-Mutanten. Konfluent gewachsene Hühnerzellen (LMH) wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert und in Infektionsmedium für 72h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Die Doppelmutante rKan1 PB2_{701D-714R} erreicht in der frühen Phase während der ersten 24h ähnliche Titer ($1,66 \times 10^4 \pm 1,12 \times 10^4$ pfu/ml 16h p.i. und $1,79 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^5$ pfu/ml 21h p.i.) wie die korrespondierende Mutante rKan1 PB2_{701N-714R}.

Nach 48h liegen die maximalen Titer aller rekombinanten Viren etwa gleich, wobei die Titer der drei PB2701N-Viren leicht höher sind. Allerdings sind die Unterschiede nicht mehr so stark ausgeprägt wie in der frühen Infektionsphase und auch nicht signifikant. Die einzige Ausnahme bildet hier das Viruspaar rKan1 PB2_{701N-714R} und rKan1 PB2_{701D-714R}. Die Titer (rKan1 PB2_{701N-714R} $7,90 \times 10^7 \pm 2,82 \times 10^7$ pfu/ml und rKan1 PB2_{701D-714R} $3,32 \times 10^7 \pm 2,47 \times 10^6$ pfu/ml) liegen mit $p = < 0,05$ signifikant auseinander.

4.2.3.2 Wachstumsverhalten von rKan1 auf QT6 Zellen

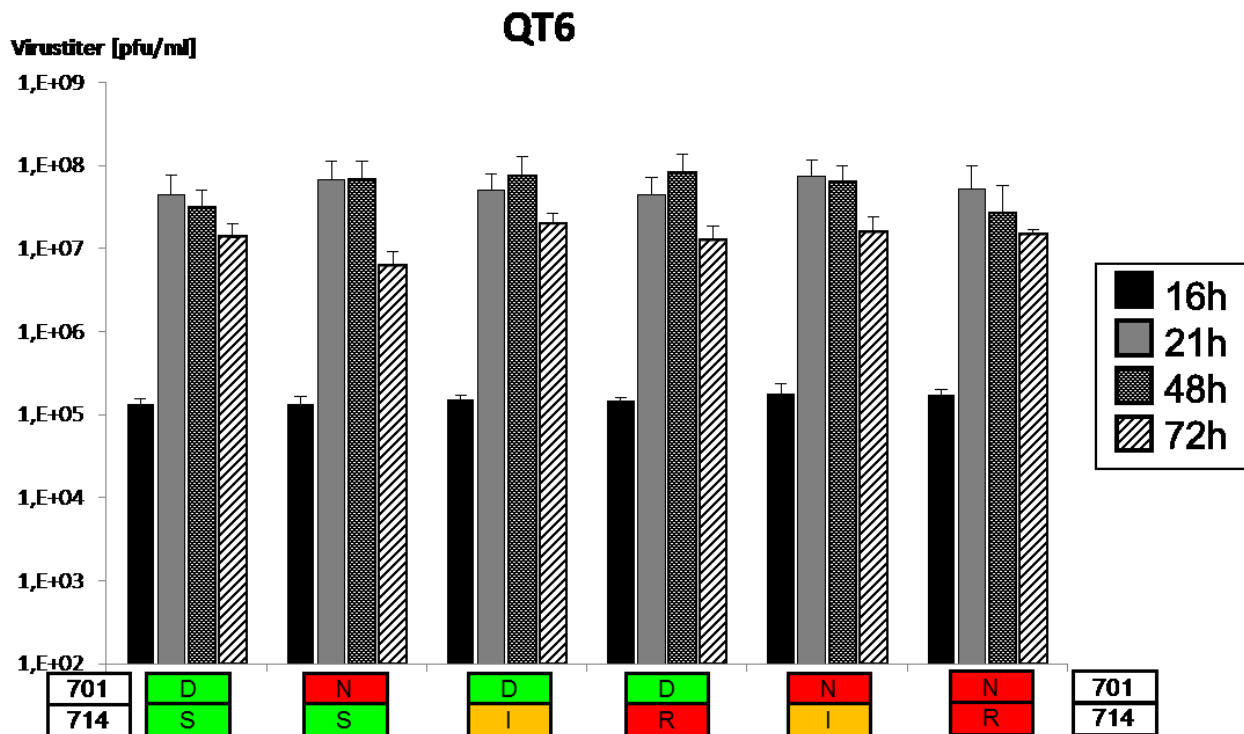


Abb. 4.18 Vergleich des wildtypischen rekombinanten Virus rKan1 PB2701N und der abgeleiteten PB2-Mutanten. Konfluent gewachsene Wachtelzellen (QT6) wurden mit einer MOI von 0,00001 infiziert und in Infektionsmedium für 94h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei Aliquots Medienüberstand abgenommen. Die Wachstumskinetik wurde in Doppelbestimmung 3mal unabhängig durchgeführt.

Die mit allen rekombinanten Viren infizierten Fibrosarkom-Zellen aus der Wachtel zeigen einen deutlichen Unterschied im Viruswachstum im Vergleich zu den Zellen aus dem Huhn. Alle getesteten Viren wachsen nach einer Infektion mit einer MOI von 0,00001 zu allen Zeitpunkten zu gleichen Titern. Sowohl der Austausch PB2 N701D, als auch die Substitutionen S714I und S714R führen nicht zu einer verbesserten Virusreplikation. Die im Mini-Replikon-Assay beobachtete Erhöhung der Polymerase-Aktivität hat in den Wachtelzellen keinen Einfluss auf die Replikationseffizienz der Viren.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen in aviären Zellen, dass keine der eingebrachten säuger-adaptiven Mutationen in der PB2-Untereinheit einen positiven Einfluss auf die Replikation hat. Im Gegenteil scheint die Substitution PB2 S714R während der frühen Phase der Virusvermehrung in Hühnerzellen von Nachteil zu sein.

4.3 Pathogenität der rKan1-Mutanten für die Maus

4.3.1 Bestimmung der Infektionsdosis

Um die Veränderung in der Pathogenität der rekombinanten Viren zu untersuchen, sollte zuerst die Infektionsdosis bestimmt werden, bei der sich Aussagen über die Steigerung bzw. Minderung der Pathogenität im Vergleich zum wildtypischen Virus treffen lassen. Dazu wurden je 5 4-8 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse mit unterschiedlichen Infektionsdosen von 10^0 - 10^3 pfu infiziert, und 14 Tage lang beobachtet. In Abbildung 4.19 ist die mittlere Todeszeit angegeben. Es zeigt sich, dass eine Infektion mit 10^1 pfu für die geplante Untersuchung am geeignetsten ist, da die mittlere Todeszeit (MTZ) der Tiere hier $8,4 \pm 1,14$ Tage beträgt. So würde sich eine Veränderung der Pathogenität an der Veränderung der mittleren Todeszeit bemessen lassen: Viren die eine gesteigerte Pathogenität aufweisen, senken die MTZ ab, eine verminderte Pathogenität lässt die MTZ ansteigen.

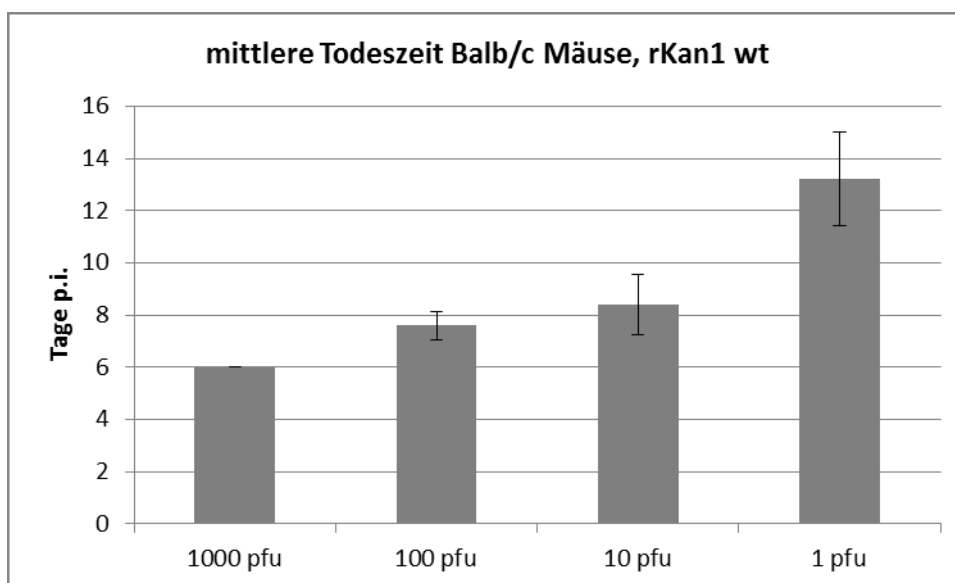


Abb. 4.19 Mittlere Todeszeit in Tagen nach Infektion. Je 5 Mäuse wurden mit unterschiedlichen Virusmengen intranasal infiziert und 14 Tage lang beobachtet. So beträgt die MTZ 6 Tage (± 0), $7,2 \pm 0,5$ Tage, $8,4 \pm 1,14$ Tage und $13,2 \pm 1,8$ Tage für 1000, 100, 10 und 1 pfu respektive.

4.3.2 Infektion 4-8 Wochen alter Balb/c Mäuse mit rekombinanten A/Thailand/1(Kan-1)/04 Viren

Um die Auswirkung der eingebrachten Mutationen in der PB2-Untereinheit der viralen Polymerase auf die Pathogenität auch *in vivo* zu untersuchen, wurden im Tierversuch

4-8 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse mit den rekombinanten Kan1 Viren infiziert. Pro Virus wurden je 13 Tiere mit einer Dosis von 10^1 pfu intranasal inokuliert und 14 Tage lang beobachtet. Neben der Überlebensrate wurde an jedem zweiten Tag das Gewicht bestimmt, um den Infektionsverlauf nachzuvollziehen. Außerdem wurden an Tag 3 nach Infektion aus jeder Gruppe je 3 Tiere für die Organentnahme getötet.

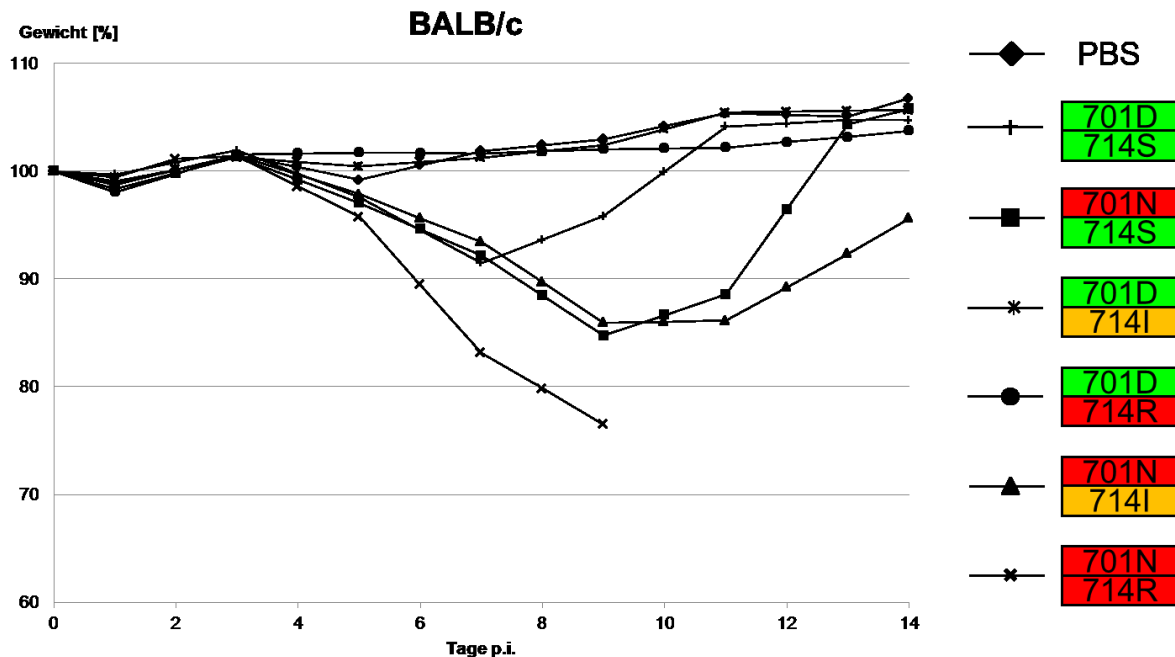


Abb. 4.20 Gewichtsverlust der 4-8 Wochen alten Balb/c Mäuse. Pro Virus wurden 13 Mäuse mit dem wildtypischen rekombinanten Virus (Kan-1 WT) und den abgeleiteten Mutanten infiziert (PBS Kontrolle: 10 Mäuse) und 3d p.i. aus jeder Gruppe 3 Tiere zur Organentnahme getötet.

So ist in Abb. 4.20 zu sehen, dass bei allen Viren mit Ausnahme der beiden Mutanten $rKan1\ PB2_{701D-714I}$ und $rKan1\ PB2_{701D-714R}$ bereits 3 Tage nach Infektion der Gewichtsverlust einsetzt. Das Gewicht der mit $rKan1\ PB2_{701N-714R}$ infizierten Tiere sinkt in den folgenden Tagen bis auf 76% des Ursprungsgewichts ab, bis auch die letzten zwei Tiere an Tag 9 p.i. der Infektion erlagen. Die anderen drei Viren, $rKan1\ PB2_{701N-714S}$, $rKan1\ PB2_{701N-714I}$ und $rKan1\ PB2_{701D-714S}$ führen in den ersten 7 Tagen p.i. zu einem ähnlichen Gewichtsverlust bis auf 92,2%, 93,5% und 91,5% des Ursprungsgewichts, respektive. Während sich die mit der aviär-typischen Mutanten $rKan1\ PB2_{701D-714S}$ infizierten Tiere ab diesem Zeitpunkt wieder erholen und bis zum Ende des Versuchs überleben, dauert die Infektion in den anderen beiden Virusgruppen weiter an, und die Tiere verlieren bis Tag 9 nach Infektion noch weiter an Gewicht ($rKan1\ PB2_{701N-714S}$ 84,7% und $rKan1\ PB2_{701N-714I}$ 85,9%). Die Überlebenden Tiere der mit dem wildtypischen Virus infizierten Gruppe erholen sich bis zum Ende des Versuchs wieder, wohingegen die Gewichtszunahme der mit $rKan1\ PB2_{701N-714I}$

infizierten Tiere deutlich langsamer verläuft und bis zum Ende des Versuchs nicht wieder das ursprüngliche Gewicht erreicht (95% an Tag 14 p.i.).

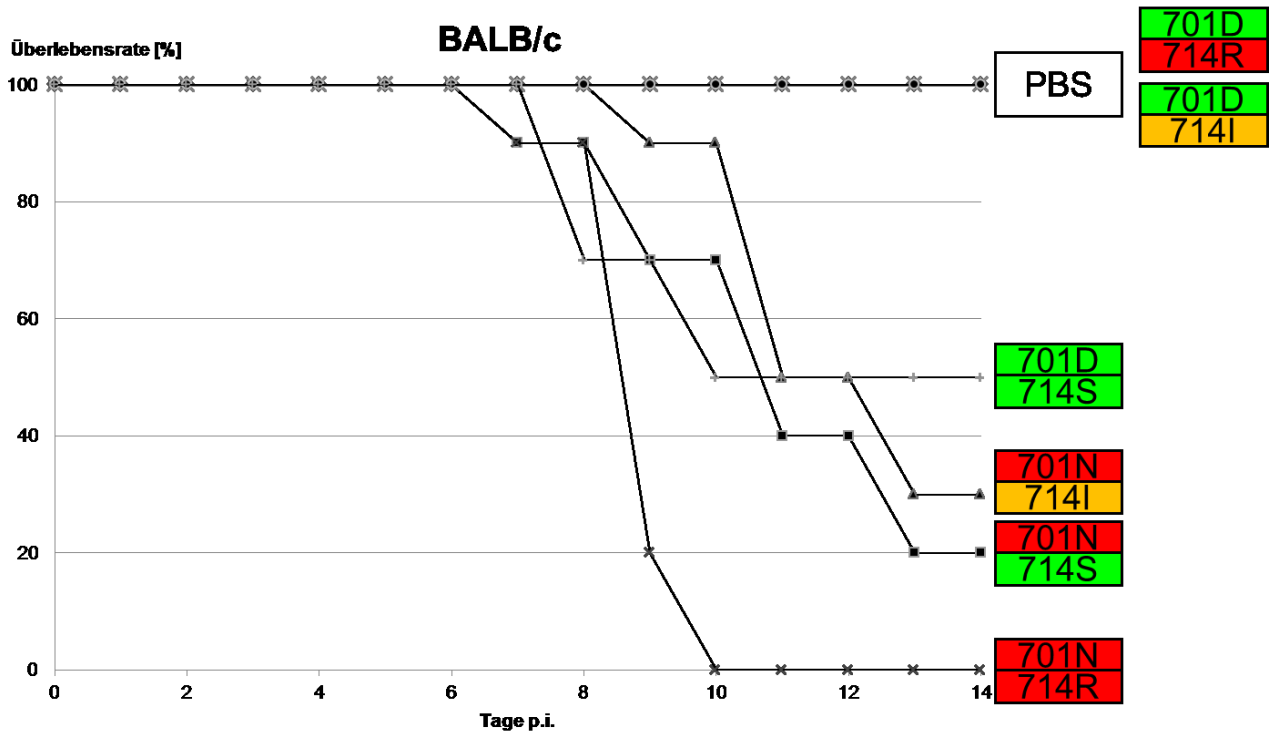


Abb. 4.21 Diagramm der Überlebensrate 4-8 Wochen alter Balb/c Mäuse. Pro Virus wurden 13 Mäuse mit dem wildtypischen rekombinanten Virus (Kan-1 WT) und den abgeleiteten Mutanten infiziert (10 PBS Kontrolle) und 3d p.i. aus jeder Gruppe 3 Tiere zur Organentnahme getötet.

Wie in Abb. 4.21 zu sehen, erlagen 8 von 10 Tieren der Infektion mit dem wildtypischen Virus. Die Mutante rKan1 PB2_{701N-714R} erweist sich als deutlich pathogener, alle infizierten Tiere (10/10) starben bereits 10 Tage p.i., wohingegen die Mutante rKan1 PB2_{701N-714I} keine gesteigerte Pathogenität im Vergleich zum wildtypischen Virus zeigt: 7/10 Tieren sterben. Die aviär-typische Mutante rKan1 PB2_{701D-714S} war ebenfalls in der Lage, Mäuse effizient zu infizieren und 5 von 10 Mäusen starben. In den Mausgruppen die mit den beiden Mutanten rKan1 PB2_{701D-714I} und rKan1 PB2_{701D-714R} infiziert wurden überlebten alle Tiere bis zum Versuchsende. Die Überlebensrate korreliert für alle Viren gut mit dem beobachteten Gewichtsverlust, das heißt Viren die eine starke Abnahme des Körpergewichts verursachten führten auch häufiger zum Tode.

4.3.2.1 Virustiter in den Organen infizierter Mäuse

Zusätzlich wurden die viralen Titer in den Lungen und Gehirnen der Mäuse bestimmt, die an Tag 3 nach Infektion dafür getötet worden waren (Abb. 4.22). Hier zeigt sich,

dass alle Viren in der Mauslunge replizieren konnten, selbst die, die weder zu einer Abnahme des Gewichts noch zum Tode bei den infizierten Mäusen führten (rKan1 PB2_{701D-714I} und rKan1 PB2_{701D-714R}). Allerdings sind die Titer dieser beiden Viren deutlich niedriger als die der anderen Viren (rKan1 PB2_{701D-714I} $7,33 \times 10^0 \pm 9,29 \times 10^0$ pfu/ml bzw. rKan1 PB2_{701D-714R} $1,35 \times 10^2 \pm 1,52 \times 10^2$ pfu/ml). Die Lungen der Tiere, die mit den PB2-701N Rekombinanten infiziert wurden, weisen die höchsten Titer auf, wobei sich nur rKan1 PB2_{701N-714S} und rKan1 PB2_{701N-714R} mit $3,3 \times 10^4 \pm 1,97 \times 10^4$ pfu/ml bzw. $9,0 \times 10^4 \pm 0$ pfu/ml signifikant vom aviär-typischen Virus rKan1 PB2_{701D-714S} ($1,74 \times 10^3 \pm 1,47 \times 10^3$ pfu/ml) unterscheiden.

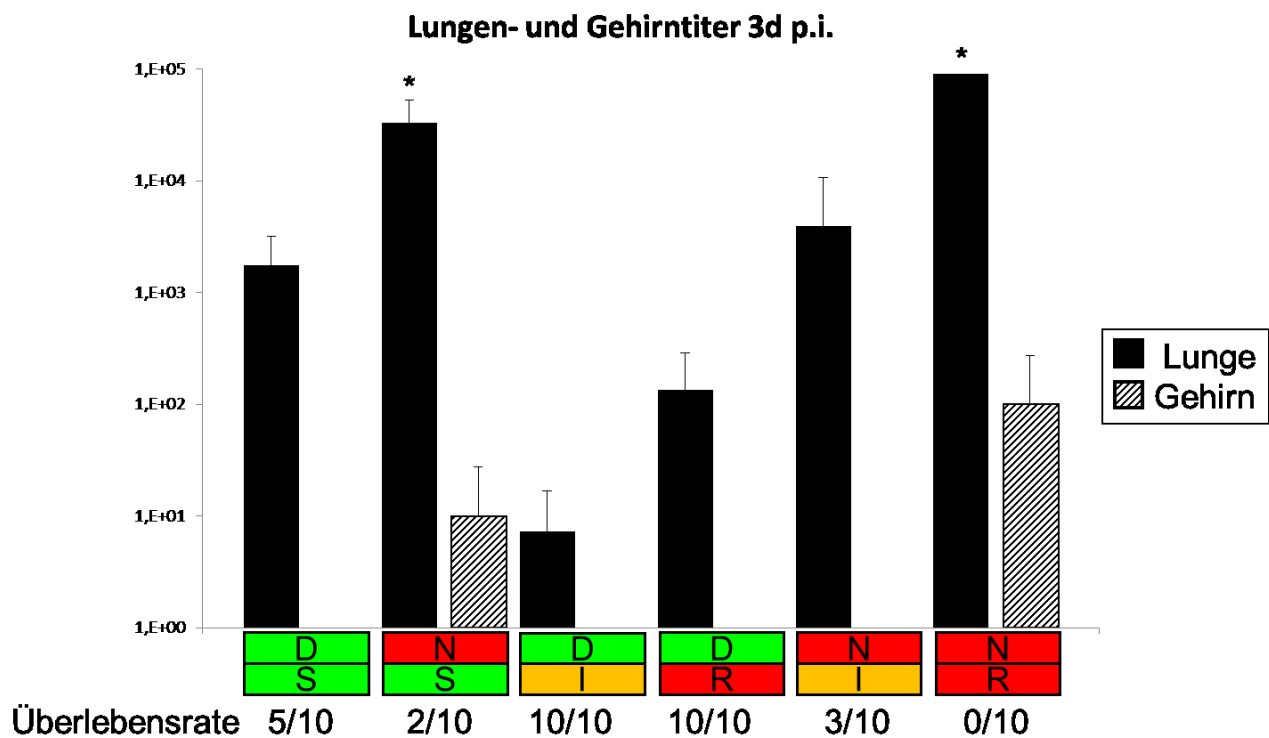


Abb. 4.22 Darstellung der Virustiter in den Lungen und Gehirnen von je 3 an Tag 3 nach Infektion getöteten Mäusen. Aus den Lungen aller Mäuse konnten Viren isoliert werden, wobei die mit rKan1 PB2_{701D-714I} und rKan1 PB2_{701D-714R} infizierten Tiere die niedrigsten Organtiter aufweisen. Die Viren die den größten Gewichtsverlust verursachten replizieren auch zu den höchsten Titern in der Mauslunge. In zwei Tieren konnte bereits an Tag 3 Virus aus dem Gehirn isoliert werden.

Virus	Inf. Mäuse	Überlebensrate	Organititer Tag 3 p.i.						
			Tier	Lunge [pfu/ml]	Mittelwert	Stabw	Gehirn [pfu/ml]	Mittelwert	Stabw
PBS	10	10/10	#1	0	0	0	0	0	0
			#2	0			0		
			#3	0			0		
N S	10	2/10	#1	30000	3,30E+04	1,97E+04	30	1,00E+01	1,73E+01
			#2	15000			0		
			#3	54000			0		
N I	10	3/10	#1	90	3,94E+03	6,72E+03	0	0	0
			#2	11700			0		
			#3	30			0		
N R	10	0/10	#1	90000	9,00E+04	0,00E+00	0	1,00E+02	1,73E+02
			#2	90000			0		
			#3	90000			300		
D S	10	5/10	#1	3000	1,74E+03	1,47E+03	0	0	0
			#2	2100			0		
			#3	120			0		
D I	10	10/10	#1	1	7,33E+00	9,29E+00	0	0	0
			#2	18			0		
			#3	3			0		
D R	10	10/10	#1	105	1,35E+02	1,52E+02	0	0	0
			#2	300			0		
			#3	1			0		

Tab. 4.3 Übersichtstabelle. Die Virustiter aus den Organen der einzelnen Tiere die an Tag 3 nach Infektion zur Organentnahme getötet wurden. Zu Beginn wurden pro Gruppe 13 Tiere infiziert und 3 Tiere an Tag 3 getötet. Die restlichen Mäuse wurden über den Zeitraum von 14 Tagen auf Gewichtsverlust und Überleben kontrolliert.

Interessant ist, dass sich die Viren mit den höchsten Lungentitern, rKan1 PB2_{701N-714S} und rKan1 PB2_{701N-714R}, schon 3 Tage nach Infektion auch in jeweils einem der untersuchten Tiere bis in das Gehirn ausgebreitet hatten. Diese Viren verursachten auch den stärksten Gewichtsverlust und wiesen die höchste Pathogenität für die Mäuse auf.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mutationen untersucht, die potentiell zur Adaptation hochpathogener aviärer Influenza A Viren (HPAIV) des Subtyps H5N1 an Säuger beitragen. Als Grundlage für die Arbeitshypothese dienen frühere Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen den beiden Mutationen in der viralen Polymerase und der Anpassung aviär-typischer Influenza A Viren an Säuger herstellen (Gabriel et al., 2005; Li et al., 2005). Die adaptive Bedeutung der untersuchten Mutationen in der PB2-Untereinheit der Polymerase wurde für HPAIV des Subtyps H7N7 belegt, nicht aber für HPAIV des Subtyps H5N1. Zu Beginn der Arbeit stand also die Frage, inwieweit die Mutationen D701N und S714I bzw. S714R auch zur Anpassung von HPAIV des Subtyps H5N1 an Säuger beitragen. Insbesondere, da diese Mutationen in aviären oder aviär-typischen Viren identifiziert wurden, die entweder aus dem Menschen (PB2 D701N: (de Jong et al., 2006; Puthavathana et al., 2005)) aus Vögeln isoliert wurden und dort im Zusammenhang mit einer erhöhten Pathogenität oder erweitertem Wirtstropismus stehen (PB2 S714I: (Guan et al., 2003)). Zuerst sollte anhand von *in vitro*-Studien zur Aktivität der Polymerase gezeigt werden, ob die eingeführten Mutationen die Aktivität der viralen Polymerase positiv beeinflussen können. Anschließend sollte durch Wachstumskinetiken und Infektionsstudien die Auswirkung einer veränderten Polymerase-Aktivität auf die Replikationseffizienz und Pathogenität der Viren in verschiedenen Säugerzellen und der Maus untersucht werden.

Als Vertreter der HPAIV des Subtyps H5N1 stand das humane Isolat A/Thailand/1 (Kan-1)/2004 (H5N1) zur Verfügung. Dieses Virus wurde aus einem sechs Jahre alten Jungen isoliert, der an der Infektion verstarb (Puthavathana et al., 2005). Das Virus wurde vermutlich direkt vom Vogel auf den Jungen übertragen und ist hinsichtlich der Genom-Sequenzen, mit Ausnahme der Mutation D701N im PB2-Protein, als aviär-typisch einzuordnen (Abb. 5.1). Diese Einordnung beruht auf der Beschreibung diverser wirtsspezifischer Aminosäuren, die zur Unterscheidung zwischen Vogel- und Säugerisolaten dienen (Finkelstein et al., 2007). Darüber hinaus gehört das Virus dem 2004 weit verbreiteten Genotyp Z an, mit einem Hämagglutinin der Klade 1.

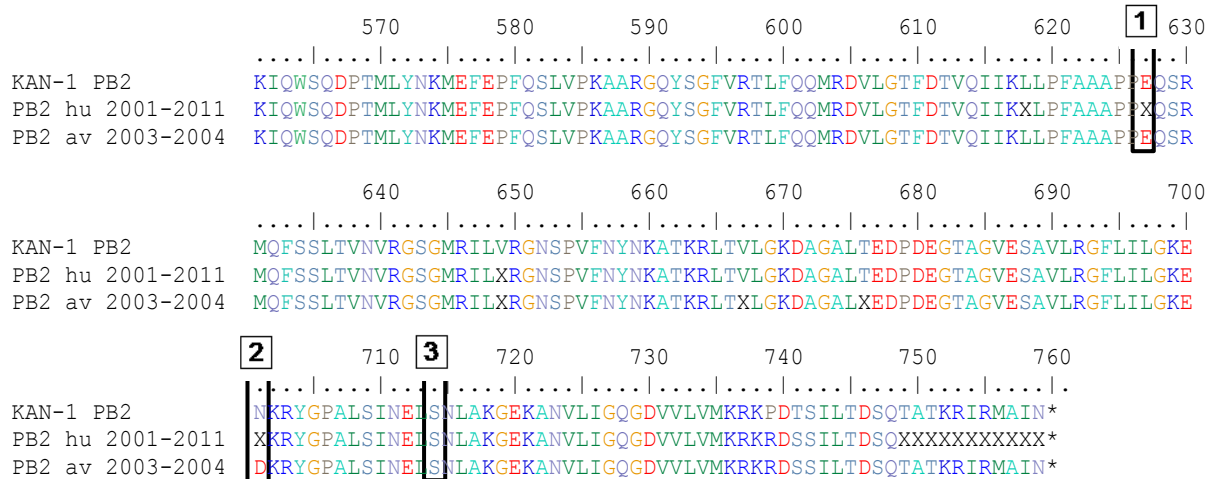


Abb. 5.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen Kan1 PB2 mit den PB2 Konsensus-sequenzen humaner (PB2 hu) und aviärer (PB2 av) Viren. PB2 hu: PB2-Konsensus aller humanen H5N1 Isolate seit 2001 (n = 163), PB2 av: PB2-Konsensus kontemporärer aviärer Isolate im Zeitraum 2003-2004 in Asien, subtyp-übergreifend (n = 242). Mit X markierte Positionen: > 5% Divergenz zur Konsensussequenz. 1 X₆₂₇: 627K 56/163 (34%); 2 X₇₀₁: 701N 11/163 (6,7%); 3 Position 714: 714S 163/163

5.1 Die adaptive Mutation PB2 D701N

5.1.1 Einfluss der Mutation PB2 D701N in Zellkultur

Um den Einfluss der identifizierten Substitution D701N im PB2-Protein des untersuchten Isolats A/Thailand/1 (Kan-1)/04 (H5N1) hinsichtlich der Adaptation des Virus an den Menschen besser nachvollziehen zu können, wurde die im Isolat vorhandene Aminosäure Asparagin (N) zum aviär-typischen Aspartat (D) zurückmutiert. Diese PB2-Variante PB2 701D diente anschließend für die Betrachtung als Ausgangspunkt, um adaptive Auswirkungen zu beschreiben.

So zeigt sich im zellkulturbasierten Mini-Replikon-Assay, bei dem die virale Polymerase zusammen mit dem Nukleoprotein und zwei Reportergenen in HEK 293T-Zellen transient transfiziert wird, dass der Austausch D701N für einen signifikanten Anstieg der Polymeraseaktivität verantwortlich ist. Die Aktivität der aviär-typischen Polymerase PB2 701D wurde zum Vergleich der Relation als hundertprozentige Aktivität festgelegt. Im Vergleich dazu steigt die Aktivität der Polymerase PB2 701N um das 4,5-fache (Abb. 4.2). Dies belegt, dass der Austausch D701N Auswirkungen auf die Aktivität der viralen Polymerase hat, die in einer Säugerzelle virale RNA in mRNA transkribiert. Da die virale Polymerase die von der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase I produzierte Minigenom-(v)RNA, aber auch wie virale RNA in Minigenom-

cRNA und darüber wieder in Minigenom-(v)RNA replizieren kann, entsteht davon abgeleitet in einem sekundären Transkriptionsschritt wieder Minigenom-mRNA. Dieser Prozess wäre ein Maß für die Replikationsaktivität. Aufgrund der Beschaffenheit des Assays lassen sich die beiden Synthese-Wege Transkription und Replikation in der Betrachtung nicht trennen, so dass daher vereinfachend von der „Aktivität der Polymerase“ gesprochen wird.

Für die Polymerase der SC35-Viren konnte mittels Primer-Extension bereits gezeigt werden, dass die Mutation PB2 D701N in Säugerzellen zu einer verstärkten Synthese von viraler mRNA und cRNA führt, während die Menge an vRNA im Vergleich zur Polymerase ohne Mutation gleich bleibt (Gabriel et al., 2007). In der selben Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Mutation PB2 D701N in aviären Zellen keinen Einfluss auf die verschiedenen viralen RNA-Spezies hat, da die Mengen an mRNA, cRNA und vRNA im Vergleich zu der SC35-Polymerase PB2 701D gleich blieben. Die verstärkte mRNA-Synthese durch die PB2 701N-Polymerase führt in Säugerzellen also zur vermehrten Produktion der Firefly-Luziferase, welche als Reportergen unter der Kontrolle des Pol I-Promotors steht und aufgrund der flankierenden viralen Gensequenzen als virales Gen durch die virale Polymerase erkannt und transkribiert wird.

Zudem konnte am Modellsystem SC35/SC35M bereits eine mögliche Ursache für die Steigerung der Aktivität in Säugerzellen aufgeklärt werden. So gelang es Gabriel et al., 2008, nachzuweisen, dass PB2 701N im Vergleich zur aviär-typischen Variante PB2 701D in Säugerzellen effizienter in den Zellkern importiert wird, was in der Folge zu einer messbaren Erhöhung der Polymerase-Aktivität führt. Dass es sich hierbei um einen adaptiven Prozess und nicht um eine allgemeine Steigerung der Replikationseffizienz handelt, zeigt der Umstand, dass die Substitution in aviären Zellen keine Auswirkung auf den Import des Proteins in den Zellkern hat. Somit dient der Austausch D701N im PB2-Protein ausschließlich der Anpassung eines aviären Influenza-A-Virus an Säugwirte. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Importin $\alpha 1$ der verantwortliche Interaktionspartner für den verstärkten Kernimport ist. Das PB2-Protein wird nach der Proteinsynthese über ein eigenes Kernlokalisierungssignal am C-Terminus mithilfe des klassischen Importin α/β -Wegs in den Kern der Zelle transportiert (Mukaigawa and Nayak, 1991; Tarendeau et al., 2007). Dass Importin $\alpha 1$ und auch dessen Isoformen $\alpha 5$ und $\alpha 7$ maßgeblich am Kernimport beteiligt sind, konnte durch Ko-Immunopräzipitation (Gabriel et al., 2008; Resa-Infante et al., 2008), Immunofluoreszenz (Gabriel et al., 2008) und Ko-Kristallisation (Tarendeau et al., 2007) gezeigt werden. Die Kristallisation des C-Terminus mit und

ohne gebundenem Importin $\alpha 5$ lieferte dann auch eine mögliche Erklärung des Mechanismus, über den die Steigerung des Kernimports erfolgt: zwischen dem in aviären Zellen typischerweise vorkommenden sauren Aspartat 701 bildet sich, sofern kein Importin α gebunden ist, eine Salzbrücke mit dem benachbarten basischen Arginin 753 aus. Das Kernlokalisierungssignal selbst liegt als zweiteiliges Tetrapeptid-Motiv zwischen den Aminosäuren 736-739 und 752-755 (KRKR-X₁₃-KRxR) vor und wird durch diese Salzbrücke dann maskiert (Mukaigawa & Nayak 1991; Tarendeau et al., 2007). Durch die Substitution Aspartat zu Asparagin an Position 701 kann diese Salzbrücke nicht oder nur ineffizient über andere Aminosäuren ausgebildet werden, wodurch in der Folge das Kernlokalisierungssignal frei und leichter zugänglich vorliegt und Importin α vermehrt und einfacher binden kann.

Zudem konnte im SC35/SC35M-Model inzwischen gezeigt werden, dass mit dem Austausch PB2 D701N auch ein Wechsel der bevorzugten Importin-Isoform stattfindet (Gabriel et al., 2011). So binden aviäre PB2-Proteine wie das von SC35 bevorzugt an Importin $\alpha 3$, während das PB2 von SC35M präferentiell an Importin $\alpha 7$ bindet. In geringem Maß binden beide Protein-Varianten auch an das ubiquitär vorhandene Importin $\alpha 1$. Die Präferenz für Importin $\alpha 7$ konnte entsprechend auch für das hochpathogene H5N1 Virus A/Thailand/1 (Kan-1)/04 gezeigt werden, dessen PB2-Protein bereits die Substitution D701N aufweist. Allerdings scheint die Präferenz dieser Viren für Importin $\alpha 7$ in entsprechenden Knock out-Mäusen nur verhältnismäßig geringen Einfluss auf die Pathogenität zu haben, da trotz der Abwesenheit der primär genutzten Importin-Isoform die Mäuse eine Infektion nicht überleben. Interessant ist hier die Beobachtung, dass die Replikation der hochpathogenen H5N1-Viren in den Knock out-Mäusen auf die Lunge beschränkt bleibt und keine systemische Ausbreitung stattfindet, während sich die Viren in Wildtyp-Mäusen über die Lunge hinaus auf andere Organe ausbreiten können. Die Autoren diskutieren hier als mögliche Erklärung für die trotz unterbliebener systemischer Ausbreitung gleichbleibende Pathogenität weitere Pathogenitätsfaktoren, die bei hochpathogenen H5N1 Viren beobachtet wurden, wie z.B. eine Dysregulation der angeborenen Immunantwort (Gabriel et al. 2011).

Interessanterweise zeigen humane Isolate wie z.B. A/Victoria/3/75 (H3N2) ebenfalls eine starke Präferenz für Importin $\alpha 7$ (Gabriel et al., 2011), weisen aber weder die Mutation PB2 D701N noch die alternativ beschriebene Mutation N319K im Nukleoprotein auf (Gabriel et al., 2008). Die pandemischen H1N1-Viren von 2009, die als Dreifachreassortante vom Schwein auf den Menschen übergegangen sind, nutzen dagegen sowohl Importin $\alpha 7$ als auch $\alpha 3$, was möglicherweise auf eine Art

Zwischenzustand im adaptiven Prozess hinweist (Gabriel et al., 2011); das PB2-Gen dieser Viren stammt aus Wasservögeln und sollte nach dem Modell eine Präferenz für Importin $\alpha 3$ aufweisen. Diese Viren tragen allerdings in den Polymeraseproteinen noch überhaupt keine der beschriebenen humanadaptiven Mutationen, die typischerweise während eines Adaptationsprozesses auftreten (NP: N319K, PB2 E627K oder D701N) und mit einem Wechsel der Importin-Spezifität in Verbindung gebracht werden. Dies bedeutet, dass neben den bereits beschriebenen Aminosäuren, welche für eine Importin-Isoform-Spezifität verantwortlich gemacht werden können, noch weitere Determinanten existieren müssen, die aber bislang noch nicht identifiziert wurden. Solche Determinanten können einzelne Aminosäure-Substitutionen wie z.B. PB2 D701N oder NP N319K sein; denkbar sind jedoch auch kombinierte Effekte mehrerer Mutationen, die letztendlich die Proteinkonformation in bestimmten Schlüsselpositionen verändern.

Nachdem im PB2-Protein einiger H5N1-Isolate aus Menschen die Substitution D701N ebenfalls beobachtet worden war (Puthavathana et al., 2005; deJong et al., 2006), stellte sich demnach die Frage, ob dieser Austausch auch hier als Adaptation der Viren an den Menschen zu betrachten ist. Wie ich zeigen konnte, ist dies in der Tat der Fall. Die Polymerase-Aktivität einer aviär-typischen Polymerase eines H5N1-Virus kann in Säugerzellen allein durch den Austausch D701N im PB2-Protein signifikant gesteigert werden. Die Kontrollversuche in Zellen aviären Ursprungs zeigen entsprechend auch, dass die Mutation nicht grundsätzlich eine Steigerung der Syntheseaktivität bedingt. In aviären Zellen wie den LMH-Zellen aus dem Huhn hat der Austausch PB2 D701N keine Auswirkung auf die Aktivität der Polymerase (Abb. 4.4). So sind beide Varianten PB2 701D und PB2 701N in diesen Zellen gleich aktiv. In Zellen aus der Wachtel (QT-6) zeigt sich sogar ein negativer Effekt durch den Austausch D701N: hier ist die aviär-typische Variante PB2 701D vergleichsweise fast siebenfach aktiver als die humanadaptive Variante PB2 701N (Abb. 4.5). Die gleichbleibende Aktivität in LMH-Zellen steht damit im Einklang zu den Primer-Extension-Studien an SC35/SC35M, die zeigen, dass diese Mutation keine Veränderung in den Mengen der drei RNA-Spezies verursacht (Gabriel et al., 2007).

5.1.2 Auswirkung der Mutation PB2 D701N auf die Virusreplikation

Um die Auswirkung der adaptiven Mutation D701N im PB2-Protein auch im Kontext vollständiger Viruspartikel zu untersuchen, wurden rekombinante Viren mit Hilfe der

reversen Genetik hergestellt. Dazu werden Zellen mit Plasmiden transfiziert, die sowohl die Expression der viralen Proteine als auch die Synthese viraler RNA-Spezies ermöglichen. Kommen alle Plasmide, die für die acht viralen Gene kodieren, in einer Zelle zusammen, so können sich die exprimierten Proteine mit der neusynthetisierten viralen RNA zusammenlagern und als neue infektiöse Virionen aus der Zelle freigesetzt werden (Hoffmann et al., 2000a). Die Verwendung von Plasmiden, welche jeweils für nur ein virales Gen kodieren, erlaubt es, gezielt bestimmte Positionen in einem Gen zu mutieren. Weiterhin können dadurch auch andere Manipulationen wie etwa die Deletion oder Insertion ganzer Bereiche an einzelnen Virusproteinen eingeführt werden oder auch Protein-Tags angehängt werden.

Die so hergestellten, rekombinanten Virusmutanten wurden in der Folge unter anderem dazu eingesetzt, Wachstumskinetiken in verschiedenen Zelllinien zu ermitteln.

Beim direkten Vergleich der Viren, die entweder das aviär-typische PB2 701D oder das human-adaptive PB2 701N tragen, fiel auf, dass die 701N-Viren in MDCK II-Zellen deutlich größere Plaques ausbilden (Abb. 4.7). Im Plaque-Test, wie er zur Bestimmung der Virustiter in den Virusstammuspensionen durchgeführt wurde, werden die Viren durch ein agarhaltiges Überschichtungsmedium an einer freien Ausbreitung gehindert. So entstehen aufgrund des virus-induzierten zytopathischen Effekts (CPE) Löcher im Zellrasen, deren Größe ein relatives Maß für die Replikations- und Ausbreitungseffizienz darstellt. Viren, welche gut in Säugern replizieren können, bilden in der Regel relative große, gleichmäßige Plaques aus, während nicht-adaptierte aviäre Viren oftmals kleine, unregelmäßige Plaques bilden. Es zeigte sich, dass die Plaques der PB2 701N-Viren signifikant größer als die der PB2 701D-Viren waren und weniger Varianz in der Größe aufwiesen (Abb. 4.8). Zusammengenommen mit den Daten aus dem Mini-Replikon Assay lässt sich daraus also schlussfolgern, dass die gesteigerte Polymerase-Aktivität den PB2 701N-Viren einen replikativen Vorteil in Zellen aus dem Säuger verschafft.

Die Kinetik des viralen Wachstums auf MDCK II-Zellen bestätigt diese Beobachtung. Jedoch erweist sich der Vorteil als geringer als aus den vorausgegangenen Versuchen zu erwarten gewesen wäre. Infiziert man initial jede zehntausendste Zelle einer Zellkulturschale, so erreichen beide Virusvarianten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion annähernd gleichhohe Titer (Abb. 4.9). Reduziert man die Infektionsdosis um das 10-fache (MOI 0,00001), so zeigen sich in der frühen bis mittleren Replikationsphase, also innerhalb der ersten 24 Stunden, signifikante Unterschiede in den Titern, welche jedoch nicht so groß sind wie aufgrund der *in vitro* Daten und des Plaquegrößenvergleichs vielleicht zu erwarten gewesen wäre (Abb.

4.10). So liegt der Titer des PB2 701N-Virus nach 24h nur etwa 10-fach höher als der des aviär-typischen Virus PB2 701D; bei einer Steigerung der Polymerase-Aktivität um das 4,5-fache hätte man nach 24 Stunden (entspricht etwa 3 Replikationszyklen) Titer erwartet, die um den Faktor 100 höher liegen. Allerdings wird die Replikation auch von zahlreichen anderen Faktoren wie etwa dem Interferon-System oder auch von Wechselwirkungen zwischen den weiteren Virusproteinen maßgeblich beeinflusst, so dass eine direkte Korrelation zwischen *in vitro* Polymerase-Aktivität und Virustitern meist nicht hergestellt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Mutation von 701D zu 701N im PB2-Protein in Säugerzellen für eine verbesserte Replikation der Viren verantwortlich ist und die aviär-typischen Viren im Vergleich mit den adaptierten Viren weniger effizient und langsamer in Säugerzellen replizieren.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden die Wachstumskinetiken auch in permanenten Zellen aus der humanen Lunge durchgeführt (A549-Zellen; Abb. 4.12). Hier ergab sich prinzipiell das gleiche Bild wie in MDCK II-Zellen: Viren mit aviär-typischem PB2 701D sind in der Lage, in diesen Zellen zu replizieren; die durch die Substitution D701N vermittelte Adaptation verbessert die Replikationsfähigkeit signifikant. Anders als in MDCK II-Zellen, in denen beide Virusvarianten ihre maximalen Titer nach 48h erreichen, replizieren die PB2 701D-Viren in A549-Zellen deutlich langsamer. Sie erreichen erst nach 72h ihre maximalen Titer, während die PB2 701N-Viren bereits 48h p.i. auf die höchsten Titer gewachsen sind. Interessanterweise scheint die Replikation in Zellen aus der humanen Lunge grundsätzlich langsamer abzulaufen, da alle A549-Titer bis zu einer Log-Stufe unter denen der MDCK II-Titer liegen.

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen und das adaptive Potential der Mutation D701N in Lungenzellen genauer charakterisieren zu können, wurden im Anschluss primäre Zellen aus dem humanen Atemwegsepithel infiziert. Diese (**H**umane **t**racheo-**b**ronchiale **E**pithelzellen; HTBE) Zellen stammen aus dem tracheo-bronchialen Abschnitt der oberen Atemwege und können in Kultur auf Filtermembranen gezüchtet werden. Sofern sie an der Luft-Flüssigkeitsgrenze (air-liquid-interface; ALI) gehalten werden, differenzieren sich die Zellen so aus, dass sie dem realen Atemwegsepithel stark ähneln. Sie bilden dabei einen mehrschichtigen Zellrasen aus, der auf der Oberfläche sowohl zilierte Zellen als auch mucusproduzierende Becherzellen aufweist. Die Epithelzellen unterscheiden sich wie *in vivo* dahingehend, dass die zilierten Zellen hauptsächlich α 2, 3- verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche tragen, während Becherzellen primär α 2, 6- verknüpfte Sialinsäuren exprimieren. So lassen sich in einer

Infektion Viren mit aviär-typischer oder humaner Rezeptoraffinität unterscheiden, da sie zu Beginn nur die Zelltypen mit den entsprechenden Sialinsäuren (aviär: $\alpha 2$, 3-, human: $\alpha 2$, 6- verknüpfte Sialinsäuren) infizieren (Matrosovich et al., 2004). In der Regel kommt es aber im späteren Verlauf der Virusvermehrung und –ausbreitung zu einer vollständigen Infektion der Zellkultur.

Initial wurde auch für das humane Kan-1 H5N1-Virus die Rezeptorspezifität überprüft (Abb. 4.13) und es zeigt sich, dass entsprechend der sequenzbasierten Vorhersage die aviär-typische Rezeptoraffinität des H5 HA für $\alpha 2$, 3- verknüpfte Sialinsäuren erhalten geblieben ist – es werden zu Beginn der Infektion nur zilienträgende Zellen infiziert.

Im direkten Vergleich der beiden Virusvarianten PB2 701D und PB2 701N zeigt sich, dass die human-adaptierten Viren PB2 701N wesentlich besser in den primären Zellen des oberen Atemwegs replizieren können als die aviär-typischen PB2 701D-Viren (Abb. 4.14). Beide Viren erreichen die maximalen Titer nach 72h, aber im Gegensatz zu den Kinetiken in permanenten Zelllinien liegen die Titer in den primären Zellen um bis zu drei log-Stufen auseinander. Dies bedeutet, dass die Viren mit der adaptiven Aminosäure PB2 701N im Mittel um das 100 – 1000-fache schneller replizieren als die aviär-typische Variante.

In den HTBE-Zellen zeigen sich also Unterschiede im viralen Wachstum, wie sie für einen Vergleich zwischen einem aviär-typischen Virus mit einem säuger-adaptierten Virus erwartet worden waren. Dabei sind die Unterschiede nicht nur auf die Anzahl der in den Mucus freigesetzten Viruspartikel beschränkt, die PB2 701D-Viren verursachen in Zellkultur auch einen deutlich geringeren CPE. Aviär-typische hochpathogene H5N1-Viren können also ohne vorhergehende Anpassung in der Polymerase oder den Oberflächenproteinen in Säugerzellen replizieren, eine Anpassung der Viren an den Säuger durch Mutationen in den Polymerase-Genen führt aber zu einer moderaten (MDCKII-Zellen, A549-Zellen) bis sehr starken (HTBE-Zellen) Steigerung der Replikation.

5.1.3 Auswirkung der Mutation PB2 D701N in aviären Zellen

Nachdem der adaptive Charakter der Mutation D701N im PB2-Protein bereits *in vitro* durch die Untersuchung der Aktivität der viralen Polymerase dargestellt werden konnte, wurden zum Vergleich auch Wachstumskinetiken in Zellen aus Huhn (LMH-Zellen) und Wachtel (QT 6-Zellen) durchgeführt. Hier zeigt sich, dass die Substitution D701N im

PB2-Protein keine Auswirkung auf die virale Replikationseffizienz hat. Weder in LMH-Zellen (Abb. 4.17), noch in QT 6-Zellen (Abb. 4.18) sind Unterschiede im Wachstum zwischen den Viren PB2 701D und PB2 701N zu erkennen: Sie wachsen zu allen Zeitpunkten zu vergleichbar hohen Titern und erreichen 48 Stunden nach Infektion ihr Maximum. Somit kann auch für die Replikation der Viren gezeigt werden, dass die Mutation PB2 D701N der Anpassung aviärer Viren an Säuger dient und nicht grundsätzlich die Replikationseffizienz der Viren verbessert. Es zeigt sich aber auch, dass die H5N1-Viren durch den Erwerb säuger-adaptiver Mutationen keinen Replikationsnachteil in aviären Zellen erleiden.

5.1.4 Auswirkung der Mutation PB2 D701N auf die Pathogenität in Mäusen

Um die Auswirkung der Mutation D701N im PB2-Protein auch im lebenden Organismus zu untersuchen, wurden im Anschluss Mäuse mit den rekombinanten Viren PB2 701D und PB2 701N infiziert. Die Infektionsdosis wurde im Vorfeld anhand des wildtypischen Virus PB2 701N bestimmt und so gewählt, dass bei einer Infektion alle Tiere innerhalb der ersten zehn Tage nach Infektion sterben. Die Überlegung dabei war, dass Viren mit verringerter Pathogenität die Tiere entweder später oder gar nicht töten, während Viren mit einer gesteigerten Pathogenität schneller zum Tode führen.

Wie sich anhand der gewonnenen Daten zeigt, sind die aviär-typischen Viren PB2 701D nicht deutlich weniger pathogen für die Maus als die adaptierten Viren PB2 701N. Während durch die PB2 701N-Viren 8 von 10 Tieren starben, waren die PB2 701D-Viren immerhin noch für 5 von 10 Tieren letal (Abb. 4.20). Interessant ist aber, dass die Tiere, die mit den wildtypischen PB2 701N-Viren infiziert wurden, einen stärkeren Gewichtsverlust erleiden und die Erkrankung bei den überlebenden Tieren zwei Tage länger andauert (Abb. 4.21). Dies bedeutet entweder, dass die PB2 701N-infizierten Tiere deutlich länger brauchen, um die Viren aus dem Körper zu eliminieren, oder aber dass die durch die Viren verursachten Schäden im Fall der PB2 701N-Viren größer sind und die Tiere dadurch länger brauchen, um sich zu erholen. Die Bestimmung der Organtiter zeigte zudem, dass die PB2 701N-Viren schon drei Tage nach Infektion in der Mauslunge zu signifikant höheren Titern repliziert hatten als die aviär-typischen PB2 701D-Viren (Abb. 4.22). Da sich die Viren nur an dieser Position

unterscheiden, ist dies als ein weiterer Beleg für den adaptiven Effekt der Mutation PB2 D701N zu werten.

Weiterhin ist interessant, dass nur die Viren mit PB2 701N in der Lage waren, sich über die Lunge hinaus in das Gehirn auszubreiten (Vgl. auch Tab. 4.3). Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als dass alle verwendeten Viren ein Lysin an Position 222 im Hämagglutinin tragen, welches für einen Neurotropismus der H5N1 Viren verantwortlich zu sein scheint (Manz et al., 2010). Aufgrund dieser Daten würde somit neben der Mutation im Hämagglutinin auch die Mutation in der viralen Polymerase zu einem möglicherweise erweiterten Organtropismus beitragen.

Aus organisatorischen Gründen konnten die Viren aus den an der Infektion im Versuchsverlauf gestorbenen Tieren nicht erneut überprüft werden. Es wäre interessant gewesen herauszufinden, ob die PB2 701D-Viren, die für fünf Mäuse letal waren, im Verlauf der Infektion zusätzliche adaptive Mutationen erworben haben und deshalb eine gesteigerte Pathogenität aufwiesen, oder ob die aviär-typischen PB2 701D-Viren *per se* ähnlich pathogen für Mäuse sind wie die PB2 701N-Viren. Grundsätzlich ist theoretisch beides möglich, da bereits in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass hochpathogene H5N1 Viren aus Geflügel auch ohne vorhergehende Anpassung an Mäuse nicht nur hochgradig pathogen sein können, sondern auch einen Neurotropismus zeigen (Guan et al., 2002). Andererseits waren die PB2 701D-Viren schon in Zellkultur einem relativ starken Selektionsdruck ausgesetzt, wodurch es in einigen Fällen zur Adaptation der Viren durch Mutationen kam.

5.1.5 Selektionsdruck auf die aviär-typischen Viren rKan1 PB2 701D

Im Verlauf der Wachstumskinetiken in Säugerzellen waren die aviär-typischen Viren einem deutlichen Selektionsdruck ausgesetzt. Dies zeigte sich darin, dass die PB2 701D-Viren in einigen Fällen während der mehrtägigen Replikationsdauer spontan die adaptive Mutation PB2 D701N erwarben. Da die PB2 701N-Viren parallel untersucht wurden, konnte eine Kreuzkontamination der PB2 701D-Proben zu Beginn nicht völlig ausgeschlossen werden. Entsprechend wurden die infizierten Zellen nach dem ersten Auftreten der Mutation nach einer strikten Reihenfolge bearbeitet, die ein ungewolltes Übertragen der PB2 701N-Viren in die PB2 701D-Proben ausschließen sollte. Trotzdem konnte auch in einigen der darauf folgenden Versuche die Mutation D701N im PB2-Protein der aviär-typischen rekombinanten Viren identifiziert werden. Da die

Substitution aber nicht in allen Versuchen und über alle Replikate auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass der Erwerb dieser adaptiven Mutation tatsächlich nicht auf eine Kreuzkontamination, sondern auf spontane Mutation zurückzuführen ist. Interessanterweise wurde der Austausch PB2 D701N nur in MDCK II-Zellen beobachtet, während in den humanen Atemwegsepithelzellen (HTBE) die ebenfalls bekannte und wichtige adaptive Mutation E627K (Subbarao et al., 1993; Naffakh et al., 2000) auftrat. Diese Mutation wird bislang, wie schon in der Einleitung beschrieben, mit der Anpassung an die unterschiedlichen Temperaturverhältnisse im Vogel-Darm (ca. 41°C) und im menschlichen Atemweg (ca. 33°C) in Verbindung gebracht (Massin et al., 2001). Darüber hinaus scheint die Mutation E627K auch einen temperaturunabhängigen Vorteil in den Zellen des oberen Atemwegstrakt zu bedingen, da Hatta et al. 2007 zeigen konnten, dass Viren mit PB2 627K in HTBE-Zellen besser replizieren können als Viren mit PB2 627E.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Viren PB2 701N und die Mutante PB2 E627K-701D in den HTBE-Zellen zu gleichen Titern heranwachsen. Steel et al. konnten 2009 zeigen, dass die Mutationen E627K und D701N in MDCKII-Zellen Subtyp-abhängig für eine verbesserte Replikation verantwortlich sind. So resultiert die Mutation E627K in einem saisonalen H3N2-Isolat in einer signifikant besseren Replikation gegenüber der Mutante PB2 627E-701N, während in einem humanen H5N1-Isolat die Virusmutante PB2 627E-701N zu höheren Titern repliziert als die Viren mit PB2 627K.

Insofern kann hier gezeigt werden, dass die adaptive Mutation D701N im PB2-Protein der H5N1-Viren das Fehlen der adaptiven Mutation E627K kompensieren kann und zu einer ähnlich effizienten Anpassung der Viren vom Vogel an den Säuger führt. Dies entspricht auch den von (Steel et al., 2009) durchgeführten Transmissionsstudien an Meerschweinchen, die zeigen, dass Viren mit PB2 701N ähnlich Viren mit PB2 627K durch direkten Kontakt übertragen werden können.

5.2 Einfluss der Mutationen PB2 S714I und S714R

Im Gegensatz zu der Substitution D701N im PB2-Protein ist die mögliche adaptive Rolle der Substitution des Serin an Position 714 durch andere Aminosäuren noch nicht eingehender untersucht. Erstmals beobachtet und beschrieben wurde der Austausch S714R im SC35/SC35M-Modellsystem, wo die Mutation neben anderen im Verlauf der seriellen Passage der Viren in der Maus aufgetreten ist (Gabriel et al., 2005). Die

Untersuchungen konnten zeigen, dass der Austausch S714R Einfluss auf die Pathogenität der H7N7-Viren für die Maus hat und dass dieser Einfluss vermutlich auch über die gesteigerte Aktivität der viralen Polymerase zu erklären ist. Hier soll untersucht werden, welchen Einfluss die Mutation S714R bzw. die Variante S714I auf die Pathogenität von hochpathogenen H5N1-Viren für Mäuse hat.

Im Jahr 2001 konnten in Proben von einigen Geflügelmärkten in Hong Kong A/Goose/Guangdong/1/96-ähnliche H5N1-Viren (*Gs/Gd-like*; Gs/Gd-ähnlich) nachgewiesen werden (Guan et al., 2002), von denen einige Isolate anstatt der Substitution S714R ein Isoleucin anstelle des Serin 714 trugen (Gabriel et al., 2005). Die phylogenetische Analyse der viralen Gene führte zu einer Gliederung der isolierten Viren in die fünf Genotypen A – E, je nach der Zusammensetzung ihrer acht Gene (Guan et al., 2002). Die Viren mit dem Austausch PB2 S714I, die für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit als Ausgangspunkt dienen, gehören den Genotypen A und B an, wobei Genotyp A in den Stichproben vergleichsweise häufiger identifiziert wurde (13/26 Proben) als die anderen vier. Die Gs/Gd-ähnlichen Viren zeichnen sich dadurch aus, dass sie vermutlich durch Reassortation mit einem unbekanntem Influenza A-Virus aus Wasservögeln entstanden sind. Dabei wurde ein Teil der internen Gene ausgetauscht oder sogar alle sechs (z.B. im Fall des Genotyp B). Genotyp A trägt die gleichen Gene für PB2, PB1, NP und NS wie Genotyp B und ein weiterer Genotyp C trägt ebenfalls Gene desselben Ursprungs: PB2, PA, M und NS (Guan et al., 2002), jedoch konnte für den Genotyp C kein Isolat mit dem Austausch S714I identifiziert werden.

Interessanterweise zeigt sich in der Auflistung der untersuchten Isolate (Guan et al., 2002) eine zeitliche und räumliche Trennung der Genotypen A und B. So wurden die Genotyp A-Viren von anderen Geflügelmärkten isoliert als die Genotyp B-Viren und auch erst etwa einen Monat später. Dazu kommt, dass nur zwei der vier isolierten Genotyp B-Viren den Austausch S714I tragen, während alle der isolierten Genotyp A-Viren die Mutation aufweisen. Die zwei Genotyp B-Viren ohne Mutation S714I stammen aus einer Ente und einer Gans, während alle Isolate mit Mutation S714I (Genotyp A und B) aus Hühnern bzw. einer Wachtel und einer Taube stammen. Insofern könnte die Vogelart für das Auftreten und die Verbreitung der Mutation eine Rolle gespielt haben.

Die von Guan et al. 2002 durchgeführten Studien zur Pathogenität der isolierten Gs/Gd-ähnlichen H5N1-Viren konnten zeigen, dass alle Genotypen hochpathogen für Hühner und Wachteln waren und ohne weitere Anpassung effizient in der Mauslunge replizieren konnten. Es zeigte sich im Vergleich aber auch, dass die Viren der

Genotypen A und B in den Untersuchungen besonders pathogen für Hühner und Mäuse waren. Genotyp A konnte darüber hinaus auch in den Gehirnen der infizierten Mäuse festgestellt werden. Die retrospektive Auswertung zeigt, dass sowohl die verwendeten Genotyp A- als auch die Genotyp B-Viren über den Austausch PB2 S714I verfügen. Somit könnte die Mutation für die im Vergleich zu den anderen Genotypen gesteigerte Pathogenität in Hühnern, Wachteln und Mäusen auf diese Mutation zurückzuführen sein.

Obwohl die hochpathogenen Gs/Gd-ähnlichen H5N1-Viren über mehrere Monate hinweg in Proben von Geflügelmärkten nachgewiesen werden konnten, wurden die fünf charakterisierten Genotypen bereits während des Jahres 2001 durch neue, aufgrund von Reassortationen entstandene, Genotypen verdrängt. Einzig Genotyp B konnte neben den neuen Reassortanten noch 2002 isoliert werden (Guan et al., 2002), wobei die späteren Isolate die Mutation S714I nicht aufweisen. Inwieweit die verstärkten Kontrollen und die im Mai 2001 durchgeführte Keulung von mehr als einer Millionen Tiere die weitere Ausbreitung der besonders virulenten Virus-Genotypen verhindert hat, kann nur schwer abgeschätzt werden. Erkennbar ist aber, dass die nach 1998 eingeführten Maßnahmen (z.B. Trennung der Geflügelarten, regelmäßige Dekontamination der Märkte, Keulung und Neubestückung der Geflügelbestände) deutlich zur Eindämmung der Ausbreitung hochpathogener H5N1-Viren beigetragen haben (Guan et al., 2002).

5.2.1 Einfluss der Mutationen PB2 S714I und S714R in Zellkultur

Die durchgeführten *in vitro*-Studien im Mini-Replikon-Assay zeigen, dass eine Substitution des Serin an Position 714 im PB2-Protein durch Isoleucin oder Arginin ebenfalls einen, die Aktivität der viralen Polymerase steigernden, Einfluss hat.

So kann gezeigt werden, dass der Austausch S714R die Aktivität der aviär-typischen Polymerase (PB2 701D-714S) in Säugierzellen (HEK 293T-Zellen) fast so stark steigern kann, wie die adaptive Mutation D701N. Auch der Austausch S714I verdoppelt immerhin die Aktivität im Vergleich zur aviär-typischen Polymerase (Abb. 4.2). Dies bedeutet, dass eine Mutation, wie sie in den H5N1-Isolaten in Hong Kong aufgetreten ist, zu einer gesteigerten Virusproduktion aufgrund der erhöhten Polymerase-Aktivität führen könnte. Da diese Steigerung in Säugierzellen zu beobachten ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation bei einer Adaptation vom Vogel an den Säuger zumindest unterstützend wirkt. Kombiniert mit der adaptiven Aminosäure 701N führt

der Austausch S714I zu einer weiteren Erhöhung der Polymerase-Aktivität auf das 6,8-fache der ursprünglich aviär-typischen Polymerase. Substituiert man dagegen in Kombination mit PB2 701N das 714S durch ein Arginin, wie es im SC35M-Virus beobachtet worden ist, so steigt die Aktivität der Polymerase drastisch. Im Vergleich zur aviär-typischen Polymerase 701D-714S liegt die Aktivität der Polymerase PB2 701N-714R etwa 30-fach höher.

Diese Beobachtungen stehen also im Einklang mit dem SC35/SC35M-Model. Auch für die Polymerase der H7N7-Viren führt der Austausch S714R in Kombination mit dem aviär-typischen 701D zu einer ähnlich hohen Aktivität der Polymerase wie der Austausch D701N allein (Gabriel et al., 2005). Wie in derselben Arbeit gezeigt wird, ist die Kombination 701N-714R im PB2-Protein für eine Erhöhung der Polymerase-Aktivität um das 10-fache verantwortlich. Eine Erhöhung der Aktivität durch ein Isoleucin an Position 714 im PB2-Protein wurde bislang nicht beschrieben, so dass hier erstmals gezeigt wird, dass auch dieser Austausch die Aktivität der viralen Polymerase in Säugerzellen positiv beeinflusst. Die Erhöhung der Aktivität durch die Mutation S714I ist zwar nicht so stark ausgeprägt wie die durch den Austausch S714R, aber signifikant genug, um Viren mit dieser Mutation unter Umständen einen replikativen Vorteil *in vivo* zu verschaffen.

Die Kontrollversuche in Zellen aviären Ursprungs zeigen allerdings, dass die Mutationen S714I bzw. S714R auch in diesen Zellen zu einer Erhöhung der Polymerase-Aktivität führen. So steigt die Aktivität der Polymerase nach Einführung der alternativen Aminosäuren 714I bzw. 714R sowohl in Zellen aus dem Huhn (LMH-Zellen) als auch in Zellen aus der Wachtel (QT6-Zellen) teilweise signifikant an (Abb. 4.4 und 4.5 respektive). Die Steigerung der Aktivität durch die Mutationen ist in diesen Zellen allerdings nicht so stark ausgeprägt wie in Säugerzellen. Interessant ist aber, dass die Substitutionen S714I und S714R in aviären Zellen eine vergleichbare Steigerung der Aktivität verursachen, während in Säugerzellen die Substitution S714R gegenüber S714I zu einer deutlich stärkeren Erhöhung der Aktivität führt.

Diese Daten zeigen, dass es sich bei der beobachteten Substitution S714I bzw. S714R nicht ausschließlich um eine säuger-adaptive Mutation handelt. Die Daten sprechen eher dafür, dass eine Mutation an Position 714 im PB2-Protein grundsätzlich zu einer verbesserten Replikation der Viren führen kann. Die beschriebenen Mutationen könnten es dementsprechend aviären Viren erlauben, in Vögeln bzw., genauer gesagt, in Hühnern und anderen Vögeln der Ordnung *Galliformes* schneller zu replizieren. Warum das Serin an Position 714 im Jahr 2001 nicht durch ein Arginin, sondern durch ein Isoleucin substituiert wurde, kann anhand der vorliegenden *in vitro*-Daten nicht

eindeutig beantwortet werden. Da in beiden Fällen S714I und S714R nur ein Nukleotid im kodierenden Triplet ausgetauscht werden muss, kann das Auftreten der Mutation S714I statt S714R in den Gs/Gd-ähnlichen H5N1-Viren reiner Zufall gewesen sein.

5.2.2 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Virusreplikation in Säugerzellen

Um der Vermutung nachzugehen, dass sich die Mutationen S714I oder S714R im PB2-Protein grundsätzlich positiv auf die Vermehrung der Viren auswirken, wurden die Einzel- und Doppelmутanten auch in Wachstumskinetiken eingesetzt. Hierzu wurden wie im Vergleich zwischen den aviär-typischen Viren PB2 701D und den humanadaptierten Viren PB2 701N zuerst die Plaquegrößen bestimmt. Es zeigt sich, dass die Einführung der Mutation an Position 714 von Serin zu Isoleucin oder Arginin keinen nennenswerten Einfluss auf die Größe oder Form der Plaques hat. Die Plaques der Einzelmutante PB2 701D-714R erscheinen im Vergleich sogar wesentlich kleiner als die der Mutante PB2 701N, was nach den Untersuchungen im Mini-Replikon-Assay, in dem beide Polymerasen in etwa dieselbe Aktivität aufwiesen, nicht zu erwarten war. Insgesamt entsprechen die Plaques der S714I- und S714R-Mutanten in etwa denen der korrespondierenden 701-Varianten. So sind die Plaques der Viren PB2 701N-714S, PB2 701N-714I sowie PB2 701N-714R etwa gleich groß und signifikant größer als die der Viren PB2 701D-714S, PB2 701D-714I und PB2 701D-714R.

Entsprechend der vergleichbaren Plaquegrößen weichen in MDCK II-Zellen die Virustiter der Viren PB2 701N-714I und 701N-714R nicht signifikant von denen der PB2 701N-714S-Viren ab. Nur in der frühen Phase nach der Infektion zeigen sich Unterschiede: so konnten im Überstand der PB2 701N-714S-infizierten Zellen bereits 10 Stunden nach Infektion 10^3 infektiöse Partikel pro ml nachgewiesen werden. Die Mutanten PB2 701N-714I und PB2 701N-714R replizieren schneller und erreichen zu diesem Zeitpunkt sogar Titer bis etwa 10^4 pfu/ml. In den Überständen der Zellen mit den aviär-typischen Viren und den davon abgeleiteten PB2 714I/R-Einzelmutanten sind dagegen erst 16 Stunden nach der Infektion, also acht Stunden später, vergleichbare Titer nachzuweisen. Im Verlauf der Wachstumskinetik replizieren die Viren PB2 701D-714I ähnlich schnell wie die aviär-typischen PB2 701D-714S-Viren. Einzig die Viren mit der Konstellation PB2 701D-714R zeigen eine deutliche Reduktion in den erreichten Titern. Auch dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den *in vitro*-Daten aus dem Mini-Replikon-Assay, stimmt aber andererseits mit der geringen Plaquegröße überein.

Eine Mutation an Position 714 im PB2-Protein scheint also nicht grundsätzlich vorteilhaft für die Replikation der Viren in Säugerzellen zu sein, obwohl die Aktivität der viralen Polymerase *in vitro* unabhängig von der Aminosäure 701 signifikant gesteigert werden kann. Anders als bei den *in vitro*-Versuchen zeigt die Mutation an Position 714 in den Wachstumsstudien eine Abhängigkeit zur an Position 701 vorliegenden Aminosäure: ist die adaptive Aminosäure 701N vorhanden, kann ein zusätzlicher Austausch an Position 714 die Replikation in der frühen Phase positiv beeinflussen. Wie gezeigt wird, werden schneller Viren gebildet und in den Überstand abgegeben. Tritt die Mutation des Serin an Position 714 zu Isoleucin oder Arginin dagegen in Kombination mit der aviär-typischen Aminosäure 701D auf, stellt besonders die Substitution S714R eher einen Nachteil für die Viren dar. Schon bei der Anzucht der Virusstammuspensionen in MDCK II-Zellen wurde deutlich, dass die PB2 701D-714R-Viren im Vergleich zu den anderen Viren schlechter wuchsen und die niedrigsten Titer aufwiesen.

Die parallel durchgeführten Untersuchungen auf Zellen aus der humanen Lunge (A549-Zellen) zeigen im Gegensatz zu den MDCK II-Zellen auch im späteren Verlauf der Virusreplikation teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Virusmutanten mit und ohne Substitution an Position 714. So erreichen die Viren PB2 701N-714I und PB2 701N-714R schon früh höhere Titer als die Einzelmutante PB2 701N-714S, die bis 48h nach der Infektion signifikant höher bleiben. Daneben bleiben die Viren mit PB2 701D gegenüber den PB2 701N-Viren insgesamt mit deutlich reduzierten Titern zurück und liegen teilweise eine ganze log-Stufe niedriger. Im Gegensatz zu den MDCK II-Zellen replizieren die PB2 701D-714R-Viren auf A549 Zellen mindestens ebenso effizient wie die PB2 701D-714S-Viren. Zusammengenommen zeigt sich also, dass die Mutation an Position 714 in A549-Zellen durchaus einen positiven Einfluss auf die Virusreplikation haben kann. Aber auch in den Lungenzellen unterliegt die Aminosäure an Position 714 einer Abhängigkeit zur Aminosäure an Position 701.

Um den möglichen adaptiven Charakter der Mutation an Position 714 im PB2-Protein weiter zu untersuchen, wurden die Mutanten PB2 701D-714I und PB2 701D-714R auch für eine Infektion von humanen tracheo-bronchialen Epithelzellen (HTBE) eingesetzt. Es zeigt sich, dass keine der Virusmutanten im Vergleich zur aviär-typischen Variante PB2 701D-714S einen Vorteil in der Replikation in den Atemwegszellen hat. Alle drei Viren wachsen im gesamten Versuchsverlauf zu den gleichen Titern.

5.2.3 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Virusreplikation in Vogelzellen

Neben den Replikationsstudien in Säugerzellen wurden die rekombinanten Viren auch zur Infektion von LMH- und QT6-Zellen eingesetzt. Wie sich überraschenderweise zeigt, wachsen die sechs Viren in den Wachtelzellen zu allen Zeitpunkten zu vergleichbaren Titern. Diese Daten stehen in starkem Widerspruch zu den *in vitro*-Daten aus den Mini-Replikon-Assays, in denen die säuger-adaptive Aminosäure 701N allein oder in Kombination mit der Mutation S714R zu einer starken Reduktion der Polymerase-Aktivität geführt hat. Scheinbar hat diese Reduktion der Aktivität keinen Einfluss auf die Replikationseffizienz der Viren in Zellen aus der Wachtel. Da die Viren in diesen Zellen aber insgesamt sehr effizient zu hohen Titern replizieren können, ist nicht davon auszugehen, dass die Zellen nicht permissiv für die Virusreplikation sind. In LMH-Zellen aus dem Huhn scheint die Substitution S714I im Kontext der aviär-typischen Aminosäure 701D gegenüber der Substitution S714R einen Vorteil bei der Replikation zu bieten. Hier zeigt sich, dass die Viren PB2 701D-714I in der frühen Phase zu höheren Titern replizieren können als die PB2 701D-714R-Viren. Die säuger-adaptive Mutation D701N im PB2-Protein hat, wie im Mini-Replikon-Assay, auch während der Infektion keine Auswirkung auf die Replikationseffizienz.

Die vorliegenden Daten zeigen zusammengefasst ein scheinbar widersprüchliches Bild über den Einfluss der Mutationen S714I und S714R im PB2-Protein. Einerseits erhöhen die Mutationen deutlich und signifikant die Aktivität der Polymerase in Zellen aus Säugern und Vögeln, andererseits hat diese Erhöhung nur geringe Auswirkungen auf die virale Replikationseffizienz in diesen Zellen. So führt die 30-fache Aktivitätssteigerung im Falle der Polymerase PB2 701N-714R im Viruskontext im maximalen Fall zu 10-fach höheren Titern im Vergleich zur aviär-typischen Polymerase und den entsprechenden Viren (Vgl. Titer A549-Zellen nach 48h).

In früheren Studien konnte im SC35/SC35M-Model bereits gezeigt werden, dass die Mutation D701N im PB2-Protein in Vero-Zellen zu einer gesteigerten Produktion von mRNA und cRNA führt und dass die Mutation S714R allein eine vergleichbare Steigerung zur Folge hat (Gabriel et al., 2007), während die vRNA-Synthese in beiden Fällen unverändert bleibt. In aviären Zellen haben beide Mutationen keinen nennenswerten Einfluss auf die Synthese der RNA-Spezies. Dem entspricht, dass die Polymerase mit PB2 714R in Säugerzellen in etwa die gleiche Aktivität besitzt wie die Polymerase PB2 701N. Nicht zu erklären ist dadurch allerdings, wie es in aviären

Zellen durch die Mutation S714R trotzdem zu einer gesteigerten Polymerase-Aktivität kommt.

5.2.3 Auswirkung der Mutationen S714I und S714R auf die Pathogenität in der Maus

Um die potentielle adaptive Wirkung der Mutationen an Position 714 im PB2-Protein auch *in vivo* zu untersuchen, wurden 4-8 Wochen alte Balb/c Mäuse mit den rekombinanten Viren PB2 701D-714I, PB2 701D-714R, PB2 701N-714I sowie PB2 701N-714R infiziert. Als Maß für die Schwere der Infektion wurde in zweitägigem Abstand das Gewicht der Mäuse kontrolliert. Es zeigt sich, dass die Tiere, die mit den Mutanten PB2 701D-714I und PB2 701D-714R infiziert wurden, zu keinem Zeitpunkt an Gewicht verlieren und damit der Gewichtskurve der PBS-Kontrollgruppe entsprechen. Alle infizierten Tiere aus den beiden Virusgruppen überlebten bis zum Ende des Versuchs. Die Untersuchung der Lungenhomogenisate von an Tag drei nach Infektion getöteten Tieren zeigt allerdings eine geringe Viruslast in den Lungen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Infektion erfolgt ist. Trotzdem scheinen die Tiere nicht erkennbar zu erkranken. Die hundertprozentige Überlebensrate und der nicht vorhandene Gewichtsverlust suggerieren, dass die Mutation S714I/S714R zu einer Attenuierung der Viren führt. Dies steht in starkem Kontrast zur Mausgruppe, die mit den aviär-typischen Viren PB2 701D-714S infiziert wurde. Wie im Abschnitt über die Auswirkung der Mutation D701N bereits beschrieben, starben in dieser Gruppe fünf von zehn Tieren an der Infektion und in den Lungen der drei Kontrolltiere waren deutliche Virustiter detektierbar.

Die Hypothese, dass eine Mutation des 714S zu 714I oder 714R allein für eine Erhöhung der Pathogenität für die Maus verantwortlich sein kann, ist demnach widerlegt. Denn selbst wenn die Viren PB2 701D-714S wie weiter oben diskutiert während der Infektion adaptive Mutationen erworben hätten und so über eine gesteigerte Pathogenität verfügten, müssten die Viren PB2 701D-714I bzw. PB2 701D-714R *per se* ebenfalls pathogener für Mäuse sein als beobachtet.

Vergleichbar mit den Untersuchungen in Zellkultur verhalten sich die Viren PB2 701N-714I und PB2 701N-714R: Die infizierten Mäuse zeigen ab dem dritten Tag nach Infektion einen deutlichen Gewichtsverlust und die Lungen der an diesem Tag zur Organentnahme getöteten Tiere wiesen deutlich sichtbare Blutungen auf. Besonders

die Lungen der mit PB2 701N-714I-infizierten Tiere wiesen die stärksten Hämorrhagien auf. Dennoch erweisen sich die Viren PB2 701N-714R als die pathogensten der getesteten Viren. In dieser Gruppe starben alle Tiere und der Gewichtsverlust war am stärksten ausgeprägt. Vergleichsweise weniger pathogen sind die Viren PB2 701N-714I, die in der Pathogenität in etwa den Viren ohne Mutation des 714S entsprechen. Die Tiere dieser Gruppe verlieren auch in gleichem Maße Gewicht wie die PB2 701N-714S-infizierten Mäuse. Auffällig ist allerdings die verzögerte Erholung der überlebenden Mäuse aus der PB2 701N-714I-Gruppe. Die verbliebenen drei Tiere erholen sich scheinbar langsamer von den Folgen der Infektion als die überlebenden Mäuse der PB2 701N-714S-Gruppe. Während die zwei Mäuse aus der Gruppe PB2 701N-714S am Ende des Versuchs wieder im Gewichtsbereich der PBS-Kontrollgruppe lagen und die Tiere wieder relativ fit wirkten, zeigten sich die Tiere der PB2 701N-714I-Gruppe noch deutlich geschwächt, was der um etwa zwei Tage langsamer verlaufenden Erholung entspricht.

Dies, zusammen mit der Beobachtung, dass die Lungen der PB2 701N-714I-infizierten Mäuse bereits nach drei Tagen die stärksten Blutungen aufwiesen, in den Homogenisaten aber weniger infektiöse Partikel vorhanden waren als in den Lungen der mit PB2 701N-714S-infizierten Tiere, könnte darauf hinweisen, dass die Pathogenität der PB2 701N-714I-Viren nicht allein auf den Virustiter zurückzuführen ist, sondern z.B. auf eine verstärkte Schädigung des Lungengewebes.

Die PB2 701N-714R-Viren dagegen sind für Mäuse besonders pathogen. Dies zeigt sich wie oben beschrieben an dem besonders ausgeprägten Gewichtsverlust und der hundertprozentigen Mortalitätsrate. Einhergehend damit sind auch die Virustiter in der Lunge drei Tage nach Infektion am höchsten und in einem der drei Tiere konnte Virus sogar aus dem Gehirn isoliert werden. Die Viren verhalten sich also ähnlich wie für SC35M beschrieben, womit gezeigt werden kann, dass die Mutation S714R im PB2-Protein in Zusammenhang mit der Mutation D701N unabhängig vom Virus-Subtyp die Pathogenität für Mäuse steigern kann. Da sowohl aus den PB2 701N-714S-infizierten als auch aus den PB2 701N-714R-infizierten Mäusen in je einem von drei Fällen Virus im Gehirn nachgewiesen werden konnte, ist die erhöhte Pathogenität aber nicht auf einen erweiterten Organotropismus zurückzuführen. Anders als bei den PB2 701N-714I-Viren scheint hier die größere Viruslast in der Lunge die Pathogenitätssteigerung zu verursachen.

Insofern könnten die Mutationen S714I und S714R, obwohl sie an derselben Position liegen, im Kontext einer Infektion auf unterschiedliche Weise zu einer Steigerung der Pathogenität führen. Die durch die Mutation S714R bedingte Steigerung der

Transkriptionsaktivität der viralen Polymerase führt in der Mauslunge zu höheren Virustitern, die der Immunantwort aufgrund der Menge entkommen können und so in andere Organe gelangen, wo sie durch das multibasische Spaltmotiv im Hämagglutinin in der Lage sind, eine Infektion auszulösen. Daneben könnte die Steigerung der Polymerase-Aktivität durch den Austausch S714I zwar ebenfalls zu einer gesteigerten Virusproduktion führen, es werden aber nicht genug Viren gebildet, die aus der Lunge übertreten können. Stattdessen führt die erhöhte Partikelzahl zu einer verstärkten Immunreaktion, die sich in einer Entzündung des Lungengewebes zeigt. Es konnte mittlerweile mehrfach gezeigt werden, dass eine Infektion durch hochpathogene H5N1 Viren in Mäusen und Menschen zu einem extremen Überschießen des angeborenen Immunsystems führen kann (Chan et al., 2005; Cheung et al., 2002; Cilloniz et al., 2010; de Jong et al., 2006). Cilloniz et al. konnten auch zeigen, dass die systemische Ausbreitung der hochpathogenen H5N1-Viren durch die frühe Aktivierung des Typ I Interferon-Systems und darüber hinaus eine dämpfende Wirkung auf anti-inflammatorische Mechanismen positiv beeinflusst wird. Es wird diskutiert, dass die durch die Entzündung hervorgerufenen Gewebeschäden einen Übertritt der Viren aus der Lunge erleichtern und so die systemische Ausbreitung unterstützen.

Daneben gibt es aber auch Hinweise, dass der C-Terminus des PB2-Proteins eine Rolle bei der Transkriptions- und Replikationsaktivität der viralen Polymerase spielt. So konnte gezeigt werden, dass ein chimäres PB2-SV40 Protein, bei dem das PB2-Kernlokalisationsignal (PB2-KLS) durch das SV40-TAg-Kernlokalisationsignal (SV-KLS) ersetzt wurde, zwar effizient in den Zellkern transportiert wird, die Polymerase aber keine Aktivität mehr besitzt (Resa-Infante et al., 2008). Allein das Anfügen des fremden SV-KLS reduziert die Aktivität der chimären Polymerase auf etwa 40% im Vergleich zur wildtypischen Polymerase. Die Autoren diskutieren zwei unterschiedliche Möglichkeiten für diese Beobachtung: Entweder ist die Importin-Bindung wichtig für die korrekte Zusammensetzung des trimeren Polymerase-Komplexes im Zellkern oder das Importin dient als Ko-Faktor bei der Replikation viraler RNA (Resa-Infante et al., 2008).

Dass die Importin-Bindung eine Rolle bei der Zusammenlagerung der viralen Polymerase spielen könnte, wird durch neuere Studien von Boivin & Hart, 2011 unterstützt. So konnte für die Mutationen D701N und S714R im PB2-Protein nachgewiesen werden, dass sie *in vitro* zu einer Steigerung der Affinität der PB2 NLS-Domäne (Tarendeau et al., 2007) für die Importin-Isoformen α 1, 3, 5 und 7 führen (Boivin and Hart, 2011). Die Diskrepanz zwischen der indifferenten Affinität *in vitro* und der beobachteten Abhängigkeit *in vivo* (Gabriel et al., 2011) erklären die Autoren durch die unterschiedliche Verfügbarkeit der Importin-Isoformen in den einzelnen Geweben

und Zelltypen. Darüber hinaus hat die speziesspezifische Sequenz der PB2 627-Domäne (Tarendeau et al., 2008) aber keinen Einfluss auf die Importin-Bindungseigenschaften der PB2 NLS-Domäne. Sowohl die aviäre als auch die humane PB2 627-NLS Domäne zeigen die gleiche Affinität für humanes Importin $\alpha 1$. Allerdings moduliert die 627-Domäne durch sterische Überlappung mit gebundenem Importin die Orientierung der beiden PB2-Domänen 627 und NLS, so dass die Bindungsgeschwindigkeit der PB2 627-NLS-Domäne gegenüber der reinen PB2 NLS-Domäne verlangsamt wird. Die Autoren entwickeln aufgrund dieser Beobachtung ein Model für den Zusammenhang zwischen Importin-Bindung, Kernimport und Funktionalität der viralen Polymerase: die Bindung des Importins verursacht eine Konformationsänderung in der PB2-Untereinheit, die nach Eintritt des Proteins in den Zellkern entscheidend für die richtige Zusammenlagerung der Polymerase-Untereinheiten ist.

5.3 Schlussfolgerungen

Fasst man alle Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, zusammen, so kann gezeigt werden, dass der Mutation D701N im PB2-Protein der viralen Polymerase eine entscheidende Rolle bei der Anpassung hochpathogener aviärer Influenza A Viren an den Menschen zukommt. Tritt diese Mutation während der Replikation eines frisch übertragenen vogel-typischen Virus im Menschen auf, so führt sie zu einer deutlich verbesserten Replikation in allen Bereichen des humanen Atemwegtrakts. Darüber hinaus ermöglicht die Mutation D701N den Viren zumindest in der Maus eine Ausbreitung der Viren über die Lunge hinaus in andere Organe wie z.B. das Gehirn. Dass es im Verlauf der Übertragung aviärer H5N1-Viren auf den Menschen zum spontanen Erwerb adaptiver Mutationen kommt, konnte auch hier in einigen Proben beobachtet werden, und entspricht den veröffentlichten Daten zu humanen H5N1-Infektionen. So finden sich in den Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> oder auch <http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>) 190 PB2-Sequenzen von hochpathogenen H5N1-Viren, die aus Menschen isoliert wurden. 185 der Sequenzen stellen dabei den Bereich dar, der für die Positionen 627 und 701 (182 Sequenzen) im PB2-Protein kodiert. Innerhalb dieser Gruppe weisen 76 Sequenzen, also rund ein Drittel, entweder die Substitution E627K (62 Sequenzen, 33,5%) oder D701N (14 Sequenzen, 7,7%) auf. Alle anderen verfügbaren Sequenzen zeigen die aviär-typischen Aminosäuren 627E und 701D. Trotz der fehlenden adaptiven

Mutationen konnten die aviär-typischen Viren im Menschen replizieren und es kann keine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten adaptiver Mutationen und der Schwere des Infektionsverlaufs hergestellt werden, da aus Fällen mit tödlichem Verlauf neben Viren mit den Mutationen PB2 E627K oder PB2 D701N auch aviär-typische Viren ohne bekannte säuger-adaptive Mutationen isoliert wurden.

Die Untersuchungen zur Mutation S714R, bekannt aus dem Adaptations-Model SC35/SC35M und der dazu alternativen Mutation S714I, wie sie in den Gs/Gd-ähnlichen Viren von 2001 beobachtet wurde, zeigen, dass der genetische Kontext eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Pathogenität spielt. So führen die Mutationen allein zwar zu einer Veränderung der reinen Polymerase-Aktivität, nicht aber zu einer Steigerung der Pathogenität der Viren für die Maus. Erst in Kombination mit der adaptiven Mutation an Position 701 kann das Arginin oder auch das Isoleucin zur Steigerung der Pathogenität führen. Damit ist die zu Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese, dass eine Mutation an Position 714 im PB2-Protein allein für die gesteigerte Pathogenität der Genotyp A- und B-Viren verantwortlich ist, widerlegt. Damit bleibt allerdings die Frage offen, welche komplementären Mutationen im PB2-Protein oder auch in anderen viralen Proteinen auftreten müssen, um die beobachtete Pathogenität zu verursachen. Klar ist, dass die Proteine der Gs/Gd-ähnlichen Viren keine der bekannten säuger-adaptiven Mutationen tragen (Finkelstein et al., 2007). Das bedeutet, dass es im PB2-Protein der Gs/Gd-ähnlichen Viren mindestens eine weitere Mutation geben muss, die in Kombination mit der Mutation S714I wirkt. Dass solche kombinatorischen Effekte existieren, zeigt zum Beispiel die Oseltamivir-Resistenz der saisonalen H1N1-Viren vor 2009: es ist bekannt, dass die Mutation H274Y allein zwar die Resistenz gegenüber dem Neuraminidase-Inhibitor bewirkt (Collins et al., 2008; Gubareva et al., 2001), parallel aber zu einer deutlich verminderten Oberflächenexpression des Enzyms führt (Bloom et al., 2010). Diese Reduktion sorgt dafür, dass Viren schlechter übertragen werden können (Herlocher et al., 2002; Ives et al., 2002), wodurch es bis 2007 nur in individuellen Fällen zur Resistenzbildung kam. Da der Inhibitor aber während der saisonalen Epidemie in der Regel nicht flächendeckend eingesetzt wird, konnten sich die oseltamivir-resistenten Viren nicht gegen die oseltamivir-sensitiven Viren durchsetzen. Zu einer Ausbreitung der resistenten Viren kam es erst nach dem Erwerb weiterer Mutationen, die das Expressionsdefizit aufheben konnten (Bloom et al., 2010). So konnten sich die oseltamivir-resistenten Viren seit 2007 global ausbreiten (Moscona, 2009).

Dieses Beispiel soll belegen, dass es neben den bekannten Marker-Aminosäuren, die für die Adaptation aviärer Viren an den Menschen wichtig sind, auch Mutationen geben

kann, die nur im Kontext mit anderen, kompensatorischen oder permissiven Mutationen, adaptive Wirkung entfalten können. Für adaptive Mutationen wie E627K oder D701N im PB2-Protein konnte hier und in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass sie kontext-unabhängig und subtyp-übergreifend zur Anpassung aviärer Influenza A-Viren an den Menschen führen. Im Fall der Mutation S714I/R scheint sich die adaptive Wirkung nur in Zusammenhang mit der Mutation D701N oder anderen, bisher nicht identifizierten Mutationen auszuprägen. Das PB2-Protein des Kan-1-Virus unterscheidet sich an 12 Positionen vom PB2-Protein der Gs/Gd-ähnlichen Viren, die insgesamt aufgrund ihres vermuteten gemeinsamen Ursprungs identisch sind. Es wäre interessant, durch sukzessive Punktmutation die Aminosäure(n) zu identifizieren, die im PB2-Protein der Gs/Gd-ähnlichen Viren das Fehlen des PB2 701N kompensieren können.

5.4 HPAIV des Subtyps H5N1 im Menschen – ein Ausblick

Im Grunde ist es bemerkenswert, dass es mit Ausnahme von zwei Fällen (H7N7 1980 (Lang et al., 1981) und 1995 (Banks et al., 1998)) bis 1997 trotz der hohen Infektiosität und Pathogenität für Geflügel nie zu einer dokumentierten Übertragung von HPAIV auf den Menschen gekommen ist (Bean et al., 1985).

Dementsprechend groß war die Sorge vor einer möglichen neuen Influenza-Pandemie, als im Jahr 1997 in Hong Kong gleich 18 Menschen an HPAIV des Subtyps H5N1 erkrankten (de Jong et al., 1997). Die Viren gleichen Subtyps konnten damals zeitgleich auf Geflügelfarmen und -märkten aus Hühnern, Enten, Gänsen und anderem Geflügel isoliert werden (Claas et al., 1998; Suarez et al., 1998; Subbarao et al., 1998). Die weite Verbreitung dieser nun auch für Menschen infektiösen Viren war der Ausgangspunkt für die bislang vermutlich intensivste Charakterisierung und Dokumentation eines Influenza A Virus-Subtyps überhaupt (Beispielsweise die Reviews Dugan et al., 2008; Neumann et al., 2010). Nachdem die ursprünglich aviären H5N1-Viren, die aus Menschen und anderen Säugetieren isoliert werden konnten, Anzeichen einer Adaptation vom Vogel an den Säuger durch den Erwerb von sogenannten Marker-Aminosäuren (z.B. die Mutation PB2 E627K (Subbarao et al., 1993; Finkelstein et al., 2007)) erkennen ließen (Hatta et al., 2001), stellte sich im Grunde nur noch die Frage, wann es zu einer ersten Mensch-zu-Mensch-Übertragung kommen würde und welche Mutationen für die dauerhafte Etablierung des Subtyps in der menschlichen Bevölkerung verantwortlich sein würden.

Die Einschätzung des pandemischen Potentials der damals kursierenden hochpathogenen H5N1-Viren wurde durch die extrem hohe Mutations- und Reassortationsrate der Viren erschwert (Guan et al., 2002). Die retrospektiv durchgeführten Analysen zur genetischen Zusammensetzung der Viren (z.B. (Dugan et al., 2008); Neumann et al., 2010) erwecken den Eindruck, als ob die H5N1-Viren im Verlauf der Jahre durch Selektion in Richtung einer optimalen genetischen Komposition zustrebten, die ihnen ein möglichst breites Wirtsspektrum eröffnet.

„[...]This finding suggested that the accumulated point mutations are not merely the result of the error rate of the viral replication complex, but, at least in part, reflected evolutionary pressure. [...] Frequent changes in HA clade or internal genes early in H5N1 virus evolution may reflect the need to find a good ‘match’, leading to recent H5N1 viruses characterized by greater genetic stability.” [Neumann et al., 2010]

So konnten bis zum Jahr 2010 mindestens 35 unterschiedliche H5N1-Genotypen charakterisiert werden (Neumann et al., 2010). Viele dieser Genotypen verschwanden kurz nach ihrem Auftreten wieder, weil sie sich entweder nicht gegen andere Genotypen durchsetzen konnten oder durch Reassortation zu neuen Genotypen wurden.

Mit der weltweiten Ausbreitung der H5N1 Viren durch wildlebende Zugvögel und Zuchtgeflügel (Dubey et al., 2011; Normile, 2006; Rios-Soto et al., 2011; Sakoda et al., 2011) häuften sich in der Folge auch die Fälle von Tier-zu-Mensch Übertragungen. Die von der WHO veröffentlichte Karte (Abb. 5.2) gibt einen Überblick über die bislang gemeldeten Fälle menschlicher H5N1 Infektionen (Vgl. auch Tab 5.1). Bislang wurden HPAIV nur direkt vom Vogel auf den Menschen, nicht aber von Mensch zu Mensch übertragen, mit wenigen Ausnahmen wie zum Beispiel bei dem Ausbruch hochpathogener H7N7 Viren in den Niederlanden 2003 (Du Ry van Beest Holle et al., 2005) oder einer innerfamiliären Übertragung von H5N1 Viren in Indonesien (Butler, 2006). Betroffen sind meist Menschen, die auf Geflügelfarmen, Märkten oder in privater Geflügelhaltung in engem Kontakt zu den Tieren, deren Exkrementen oder dem verseuchten Fleisch stehen (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html).

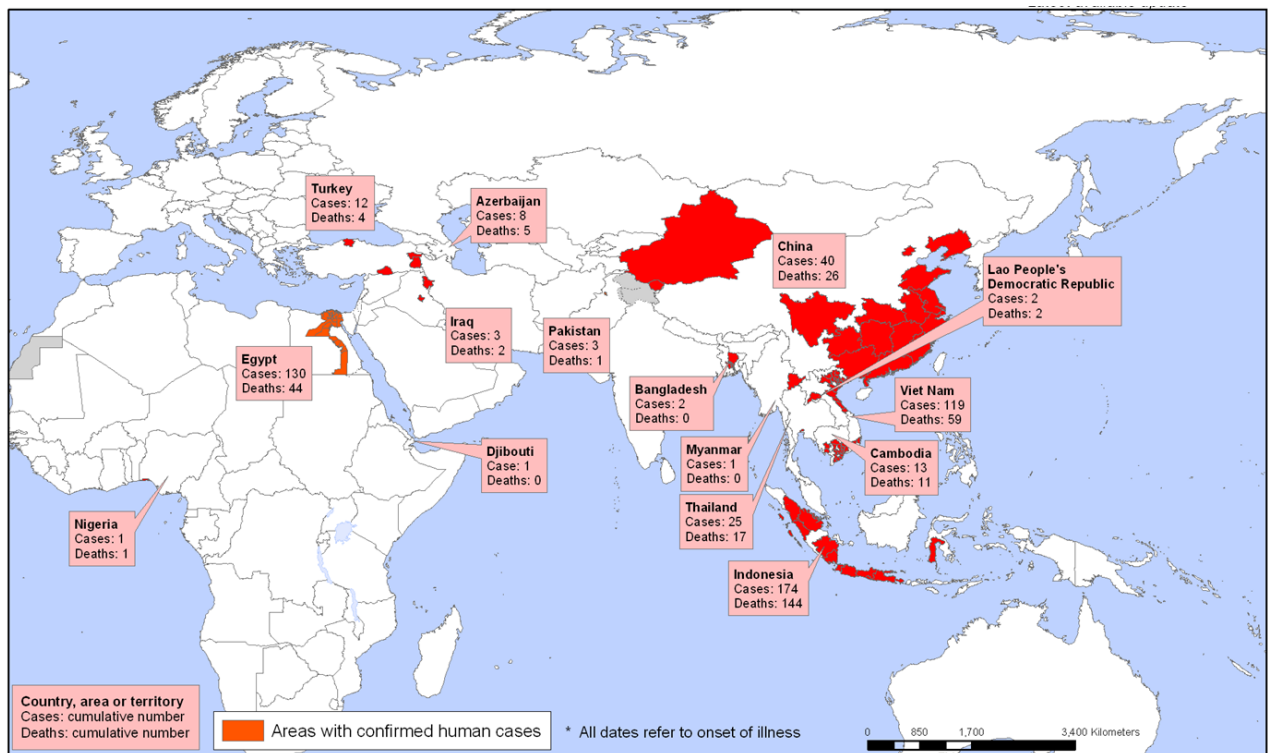


Abb. 5.2 Karte der WHO, auf der alle bis März 2011 gemeldeten Fälle einer humanen Infektion durch HPAIV des Subtyps H5N1 seit 2003 eingetragen sind. Übernommen aus <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Auffällig ist die starke Inzidenz im südostasiatischen und vorderasiatischen Raum, Ländern, in denen Menschen und landlebendes Zuchtgeflügel in engem Kontakt stehen. Aus Amerika (Nord- und Süd-) und Australien wurden bislang keine humanen Fälle von H5N1 Infektionen gemeldet.

Laut der aktuellsten WHO-Statistik (Stand August 2011) gab es seit 2003 weltweit 565 laborbestätigte Fälle humaner Infektionen durch H5N1 Viren, von denen 330 tödlich verliefen. Dies entspricht einer Gesamtmortalitätsrate von 58%. Die bislang dokumentierten Fälle lassen nicht darauf schließen, dass die Dunkelziffer an subklinischen Infektionsverläufen besonders hoch ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch die geringe Serokonversionsrate in der menschlichen Bevölkerung (Buxton Bridges et al., 2000; Liem and Lim, 2005; Schultz et al., 2005; Vong et al., 2006). Betrachtet man die von der WHO gesammelten und veröffentlichten Daten zu den Fallzahlen im Einzelnen (Abb. 5.3), so ist seit 2007 ein leichtes Abfallen der Mortalitätsrate zu beobachten, die aber derzeit auf vergleichsweise hohem Niveau stagniert, und es ist zu erwarten, dass für 2011 die Fallzahlen wieder leicht über denen von 2010 liegen (siehe auch Tab. 5.1).

Land	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		Gesamt	
	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote	Fälle	Tote
Aserbaidschan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	0
Kambodscha	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	1	0	1	1	7	7	17	15
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	7	4	2	1	0	0	40	26
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ägypten	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	39	4	29	13	32	12	151	52
Indonesien	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	21	19	9	7	7	5	178	146
Irak	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao VDR	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nigerien	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17
Türkei	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	5	5	7	2	0	0	119	59
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	45	33	73	32	48	24	48	24	565	330

Tab. 5.1 Die von der WHO veröffentlichten Fallzahlen humaner H5N1-Infektionen nach Ländern sortiert. In rot, die nach 2005 in Europa und Afrika erstmals dokumentierten humanen Infektionen. Mit Ausnahme Ägyptens, wo sich die hochpathogenen H5N1 Viren dauerhaft etablieren konnten, blieben die dokumentierten Fälle in den anderen Ländern Einzelereignisse. Quelle: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_08_09/en/index.html

Wie in Tabelle 5.1 und der davon abgeleiteten graphischen Darstellung (Abb. 5.3) zu sehen ist, war mit der Ausbreitung der hochpathogenen H5N1 Viren von Asien in Richtung Europa und Afrika ein Anstieg der Infektionen in der menschlichen Bevölkerung verbunden: 2004 46 Fälle (ausschließlich Asien), 2005 98 Fälle (Asien und erstmals Europa und Afrika), 2006 115 Fälle; (Abb. 5.3 blaue Kurve). Seitdem sinken die Fallzahlen jedoch (mit Ausnahme 2009: 73 Fälle), genauso wie die Anzahl der Toten, die sogar 2009 trotz der großen Anzahl an Infektionen nicht anstieg (Abb. 5.3 rote Kurve). Entsprechend sinkt die Mortalitätsrate (Abb. 5.3 grüne Kurve), dieser Trend ist aber nicht so deutlich ausgeprägt. Die Rate liegt im Mittel (1997 – 2008) bei $65,4\% \pm 21,6\%$ und erst seit 2009 (2009 – 2011) mit $47,95\% \pm 3,5\%$ deutlich, statistisch aber nicht signifikant ($p = 0,16$), darunter. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch zu beobachten, dass sich die Häufung der humanen Infektionen von Asien scheinbar nach Afrika verlagert.

So nimmt die Anzahl der humanen Fälle z.B. in Vietnam und Indonesien im Laufe der Jahre stetig ab, während in Ägypten die Anzahl der Infektionen eher anzusteigen scheint. Sehr deutlich ist auch, dass im Jahr 2011 bis in den August allein aus Ägypten 66,6% (32 von 48) der weltweiten Infektionen gemeldet wurden und 50% der weltweiten Todesfälle allein auf dieses Land fallen.

Trotzdem lässt sich aus dieser Darstellung keine Entwarnung für eine mögliche H5N1-Pandemie ableiten. Die unter http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/ abrufbare Auflistung der aktuellsten Meldungen laborbestätigter H5N1-Ausbrüche in Menschen und Vögeln zeigt, dass die Viren weiterhin auch im asiatischen Raum weit

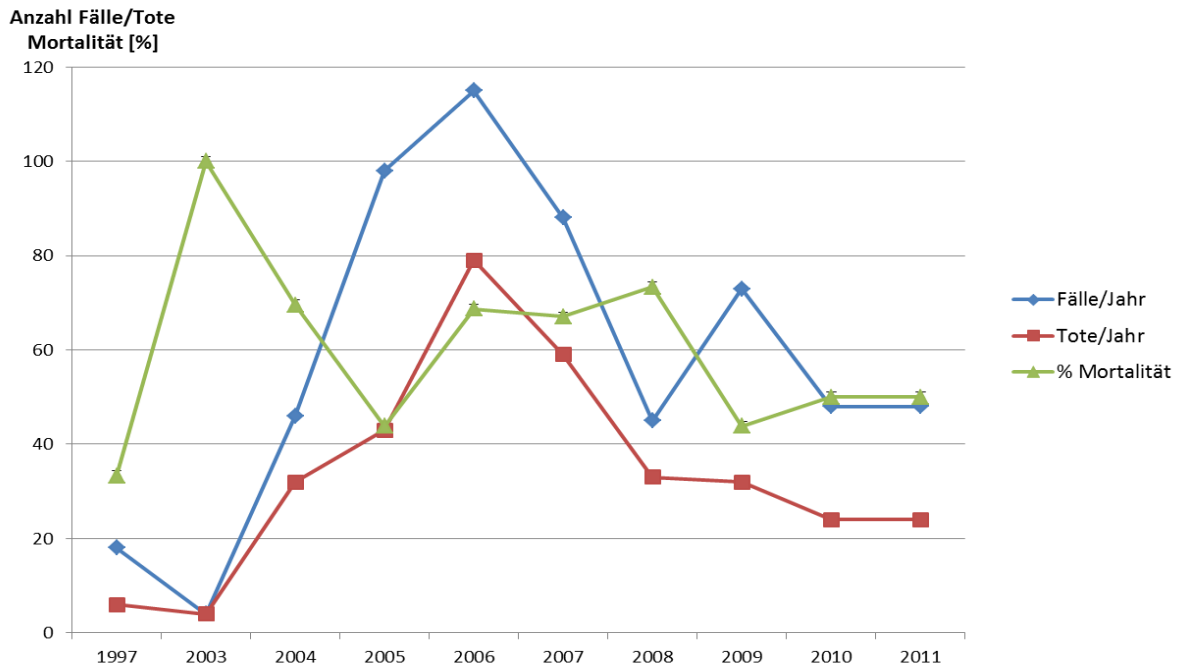


Abb. 5.3 Graphische Darstellung der weltweiten humanen H5N1 Infektionen seit 1997. In den ersten Jahren kam es nur seltenen zu Übertragungen, die mit der weltweiten Ausbreitung ab 2005 stark zunahm, seit 2007 aber wieder seltener werden (blaue Kurve). Die Anzahl der Toten stieg mit den Infektionsfällen ebenfalls an, sinkt aber gleichfalls seit 2007 (rote Kurve). In Grün die sich daraus ermittelte Mortalitätsrate. Quelle: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_04_11/en/index.html

verbreitet sind und zu kleineren bis mittleren Ausbrüchen in Geflügelbeständen führen. Interessant ist allerdings auch, dass z.B. aus der Volksrepublik China seit Anfang 2010 keine Ausbrüche mehr gemeldet wurden (die Sonderverwaltungszone Hong Kong dagegen registriert immer wieder vereinzelte Infektionen). Inwieweit sich diese Situation mit den jährlichen Vogelwanderungen ändern wird, ist schwer abzuschätzen.

Dazu kommt, dass sich seit 2005 die säuger-adaptive Mutation E627K im PB2-Protein der H5N1-Viren fest etabliert hat. In diesem Jahr kam es in China am Qinghai-See zu einem großen Ausbruch hochpathogener H5N1-Viren in wildlebenden Wasservögeln (Chen et al., 2005; Liu et al., 2005). In Viren, die während dieses Ausbruchs aus Gänsen und Möwen isoliert wurden, liegt im PB2-Protein die Aminosäure 627K vor. Die Nachkommen dieser Viren, deren HA in die Klade 2.2 eingeordnet wird, verbreiteten sich weiter in Asien und bis nach Europa und Afrika (Ducatez et al., 2007; Kiss et al., 2006; Salzberg et al., 2007; Starick et al., 2008). Sie sind bis heute zum Beispiel in

Ägypten prävalent und für die H5N1-Infektionen von Menschen dort verantwortlich (Kayali et al., 2011a; Kayali et al., 2011b). Nach wie vor ist nicht bekannt, wann und wo die H5N1-Viren des Qinghai-Ausbruchs die Mutation E627K im PB2-Protein erworben haben. Die phylogenetische Analyse des PB2-Proteins zeigt als nächstes verwandtes Isolat ein 2004 aus einem Wanderfalken in Hong Kong isoliertes H5N1-Virus, welches aber noch das aviär-typische 627E trägt (Li et al., 2004; Liu et al., 2005). Ein Modell für die Einführung säuger-adaptiver Mutationen in aviäre Influenza-Viren könnte so aussehen, dass ein wildlebendes Säugetier durch den Verzehr verseuchten Fleisches infiziert wird und die Viren dann entweder über den Besuch einer Wasserquelle wieder an Zugvögel weitergibt oder nach Verenden des Säugers andere fleischkonsumierende Vögel die Viren in die Vogelpopulation zurücktragen.

So konnte 2003 zum ersten Mal überhaupt die Infektion von vier Großkatzen (zwei Leoparden und zwei Tiger) in einem thailändischen Zoo, übertragen durch verseuchtes Hühnerfleisch, nachgewiesen werden (Keawcharoen et al., 2004). Und auch hier konnte in einem der zwei sequenzierten Isolate die Mutation PB2 E627K nachgewiesen werden. 2006 verendeten ein Hund und eine Katze in Thailand nach dem Verzehr H5N1-verseuchten Taubenfleisches (Songserm et al., 2006a; Songserm et al., 2006b). Auch hier konnte in beiden Fällen die adaptive Aminosäure PB2 627K festgestellt werden. Dies verdeutlicht zum einen, dass Influenza A-Viren die Mutation PB2 E627K vermutlich auch in Katzen erwerben können. Zum anderen zeigt dieser Fall aber auch, dass mit wildlebenden Großkatzen, Hauskatzen und Hunden im Sinne des oben beschriebenen Modells ein weiterer Pool an möglichen Überträgern für hochpathogene H5N1 Viren besteht, in dem sich säugeradaptive Mutationen entwickeln können.

Darüber hinaus konnte mittlerweile gezeigt werden, dass hochpathogene aviäre H5N1-Viren in Straußenvögeln dazu neigen, an den Positionen 627 oder 701 im PB2-Protein hin zu den säuger-adaptiven Markeraminoaciden Lysin bzw. Asparagin zu mutieren (Shinya et al., 2009). Warum die Viren in diesen Vögeln säugertypische adaptive Mutationen erwerben, ist nicht klar. Die Autoren der Studie diskutieren die evolutionär-verwandtschaftliche Nähe der Straußenvögel zu Reptilien als möglichen Grund, womit natürlich die Frage verbunden ist, ob Mitglieder der Klasse *Reptilia* überhaupt empfänglich für Influenza-Viren sind. Immerhin teilen sich wildlebende Krokodile in Afrika, Asien und auch Amerika den Lebensraum mit wildlebenden Wasservögeln, die als Träger von Influenza-Viren diese über ihre Fäkalien in hohen Titern ins Wasser abgeben (Webster et al., 1978) oder als Nahrung für Krokodile dienen. Interessanterweise konnte die Infektion durch Influenza-C-Viren in Nilkrokodilen bereits

nachgewiesen werden (Huchzermeyer, 2003). Darüber hinaus sind Krokodile durch West-Nil-Viren infizierbar und können diese Viren auch übertragen (Klenk et al., 2004). Für Influenza A-Viren dagegen ist die Frage bislang nicht abschließend geklärt (Davis and Spackman, 2008). Von Mancini et al. konnten 2004 aber zumindest in einigen Schlangen und sogar Fröschen und Kröten in Brasilien Antikörper gegen humane und equine Influenza A- und B-Viren nachgewiesen werden (Mancini et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die hochpathogenen Viren des Subtyps H5N1, die seit 1996 in Asien und Teilen der westlichen Welt kursieren, nach wie vor ein schwer abzuschätzendes Pandemie-Risiko darstellen. Sollte sich die bislang nicht nachgewiesene Mensch-zu-Mensch-Übertragung aufgrund der Akkumulation adaptiver Mutationen einstellen (Watanabe et al., 2011), könnte eine durch H5N1-Viren verursachte Pandemie weitaus größeren Schaden in der Weltbevölkerung anrichten als die Spanische Grippe von 1918. Die hohe Mortalitätsrate der H1N1-Viren von damals basiert nach dem derzeitigen Wissensstand auch auf durch bakterielle Superinfektion verursachten Pneumonien (Fedson, 2009; McAuley et al., 2007; Morens et al., 2008) und dem Fehlen antiviraler und antibakterieller Therapeutika, während die hochpathogenen H5N1-Viren *per se* für eine relativ hohe Sterblichkeitsrate verantwortlich sind. Die hohe Viruslast, die systemische Ausbreitung der Viren (Claas et al., 1998) und die oft beobachtete Dysregulation der angeborenen Immunantwort (Cilloniz et al., 2010; Cilloniz et al., 2009; de Jong et al., 2006) sind viruseigene Eigenschaften, die trotz hoher Hygiene- und Therapiestandards zu schwersten Krankheitsverläufen führen, und die vergleichsweise hohe Mutationsrate im Hämagglutinin könnte darüber hinaus die Etablierung einer breiten Immunität gegen das HA des Subtyps H5 in der Bevölkerung erschweren (Vergl. Dazu, die aktuellste Stellungnahme der WHO zur Entwicklung der HA-Phylogenie (WHO/OIE/FAO, 2012)).

6.1 Zusammenfassung

Die sporadische Übertragung von HPAIV des Subtyps H5N1 vom Vogel auf den Menschen und andere Säugetiere ist nach wie vor mit einer hohen Mortalität verbunden. Die zugrundeliegenden Mechanismen für die besondere Pathogenität dieser Viren im Vergleich zu anderen HPAIV wie zum Beispiel A/FPV/Rostock/34 (H7N1), sind aber bislang kaum geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, anhand des humanen H5N1-Isolats A/Thailand/1(Kan-1)/04 die Auswirkung von zwei Mutationen im PB2-Protein der viralen Polymerase auf die Anpassung und gesteigerte Virulenz von HPAIV des Subtyps H5N1 für Säuger eingehender zu untersuchen.

1. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mutationen PB2 D701N und PB2 S714I und PB2 S714R auf ihre Auswirkung auf die Aktivität der viralen Polymerase in Säuger- und Vogelzellen hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die eingeführten Mutationen sowohl allein als auch in Kombination zu einer signifikanten Steigerung der Polymerase-Aktivität führen.
2. Des Weiteren wurden rekombinante Viren erzeugt, die die entsprechenden Mutationen im PB2-Protein einzeln oder in Kombination tragen.
3. Die durchgeführten Studien zum viralen Wachstum in verschiedenen Zellen aus Säugern zeigen, dass die Mutation PB2 D701N eine maßgebliche Rolle bei der viralen Replikation in Säugern spielt. Die Mutationen S714I und S714R dagegen führen nur in Kombination mit der Mutation D701N zu einer weiteren Steigerung der Virusreplikation in Säugern.
4. Für die Mutationen S714I und S714R konnte gezeigt werden, dass sie wirtsunabhängig zu einer Steigerung der Polymerase-Aktivität führen. Diese gesteigerte Aktivität resultiert in aviären Zellen aber nicht in einer gesteigerten Virusreplikation.
5. Zur Überprüfung der Bedeutung der eingeführten Mutationen für die Pathogenität der Viren wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Studien in der Maus durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation D701N auch in der Maus den größten Einfluss auf die Pathogenität der Viren hat.
6. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mutationen S714I und S714R in Kombination mit der Mutation D701N die Pathogenität der Viren für die Maus weiter steigern können, dass die Einzelpunktmutanten S714I und S714R aber attenuiert sind.
7. Im Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aviär-typischen Viren unter starkem Selektionsdruck stehen und in Zellkultur zum Erwerb adaptiver Mutationen neigen.

6.2 Summary

The sporadic transmission of HPAIV of subtype H5N1 from poultry to humans and other mammals is associated with a high mortality rate of about 59%. Although H5N1 viruses have been studied extensively, the underlying mechanisms that confer the high morbidity and mortality of these viruses, in comparison to other HPAIV like A/FPV/Rostock/34 (H7N1), are still not fully understood. The aim of this work was elucidate the role of two mutations (D701N and S714I or S714R) in the PB2 subunit of the viral polymerase that were found in H5N1 isolates of humans and poultry and are associated with an increase in host-range and pathogenicity for mammals. The human H5N1 isolate A/Thailand/1 (Kan-1)/04 was used as a model to study the effect of the mentioned mutations.

1. It can be shown, that all introduced mutations, D701N, S714I or S714R in the PB2 protein are capable of increasing the activity of the viral polymerase in mammalian cells significantly. In combination with D701N, either mutation S714I or S714R increases the polymerase activity even further.
2. Recombinant Influenza A viruses bearing the respective mutations alone or in combination were generated and used in growth kinetics and animal experiments.
3. In recombinant viruses, the mutation D701N alone is responsible for a significantly faster replication of viruses in cells of mammalian origin. The mutations S714I or S714R alone do not enhance viral replication. Only a combination of either substitution at position 714 with 701N results in an enhanced replication.
4. In contrast to mammalian cells, mutations S714I and S714R enhance polymerase activity in avian cells, while D701N has no positive effect. However, this enhanced polymerase activity does not lead to an increased replication rate in avian cells.
5. To assess the influence of the aforementioned mutations on pathogenicity, infection studies in mice were done. Here it could be observed, that mutation D701N alone is the major contributor to an increase in pathogenicity. Again, mutations S714I and S714R, in combination with 701N, increase pathogenicity even further. If position 701 is avian-like however, mutant viruses with S714I or S714R are attenuated.
6. While performing the growth kinetics in mammalian cells, viruses with avian-like 701D often mutated to the mammalian-like 701N or even at other, adaption-related positions in the PB2 subunit, indicating a strong selective pressure.

7 Literaturverzeichnis

- Albertini, A. A., Wernimont, A. K., Muziol, T., Ravelli, R. B., Clapier, C. R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R. W. (2006). Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785), 360-3.
- Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* **74**(1-2), 3-13.
- Alexander, D. J., and Brown, I. H. (2009). History of highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* **28**(1), 19-38.
- Almond, J. W. (1977). A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature* **270**(5638), 617-8.
- Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., and Ortin, J. (2004). 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1), 308-13.
- Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**(21), 9909-16.
- Banks, J., Speidel, E., and Alexander, D. J. (1998). Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human--is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses? *Arch Virol* **143**(4), 781-7.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* **13**(13), 3158-65.
- Baum, L. G., and Paulson, J. C. (1990). Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl* **40**, 35-8.
- Bean, W. J., Kawaoka, Y., Wood, J. M., Pearson, J. E., and Webster, R. G. (1985). Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in nature. *J Virol* **54**(1), 151-60.
- Beare, A. S., and Webster, R. G. (1991). Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* **119**(1-2), 37-42.
- Beaton, A. R., and Krug, R. M. (1981). Selected host cell capped RNA fragments prime influenza viral RNA transcription in vivo. *Nucleic Acids Res* **9**(17), 4423-36.
- Beaton, A. R., and Krug, R. M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17), 6282-6.
- Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., Steffen, I., Choi, S. Y., Park, Y., Schneider, H., Schughart, K., and Pohlmann, S. (2010). TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol* **84**(19), 10016-25.
- Billharz, R., Zeng, H., Proll, S. C., Korth, M. J., Lederer, S., Albrecht, R., Goodman, A. G., Rosenzweig, E., Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A., and Katze, M. G. (2009). The NS1 protein of the 1918 pandemic influenza virus blocks host interferon and lipid metabolism pathways. *J Virol* **83**(20), 10557-70.
- Biswas, S. K., and Nayak, D. P. (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**(3), 1819-26.
- Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E. (1982). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**(15), 4803-12.
- Bloom, J. D., Gong, L. I., and Baltimore, D. (2010). Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* **328**(5983), 1272-5.
- Boivin, S., and Hart, D. J. (2011). Interaction of the Influenza A Virus Polymerase PB2 C-terminal Region with Importin α Isoforms Provides Insights into Host Adaptation and Polymerase Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **286**(12), 10439-10448.
- Bottcher-Friebertshausen, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D., and Garten, W. (2010). Cleavage of influenza virus

- hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **84**(11), 5605-14.
- Bottcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W., and Matrosovich, M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **80**(19), 9896-8.
- Bouloy, M., Plotch, S. J., and Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10), 4886-90.
- Bourmakina, and Garcia-Sastre (2003). Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *Journal of General Virology* **84**(3), 517-527.
- Bullido, R., Gomez-Puertas, P., Saiz, M. J., and Portela, A. (2001). Influenza A Virus NP (NS2 Protein) Downregulates RNA Synthesis of Model Template RNAs. *Journal of Virology* **75**(10), 4912-4917.
- Butler, D. (2006). Family tragedy spotlights flu mutations. *Nature* **442**(7099), 114-5.
- Buxton Bridges, C., Katz, J. M., Seto, W. H., Chan, P. K., Tsang, D., Ho, W., Mak, K. H., Lim, W., Tam, J. S., Clarke, M., Williams, S. G., Mounts, A. W., Bresee, J. S., Conn, L. A., Rowe, T., Hu-Primmer, J., Abernathy, R. A., Lu, X., Cox, N. J., and Fukuda, K. (2000). Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis* **181**(1), 344-8.
- Carter, M. J. (2007). A rationale for using steroids in the treatment of severe cases of H5N1 avian influenza. *Journal of Medical Microbiology* **56**(7), 875-883.
- Caton, A. J., and Robertson, J. S. (1980). Structure of the host-derived sequences present at the 5' ends of influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res* **8**(12), 2591-603.
- Chan, A. Y., Vreede, F. T., Smith, M., Engelhardt, O. G., and Fodor, E. (2006). Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**(1), 210-7.
- Chan, M. C., Cheung, C. Y., Chui, W. H., Tsao, S. W., Nicholls, J. M., Chan, Y. O., Chan, R. W., Long, H. T., Poon, L. L., Guan, Y., and Peiris, J. S. (2005). Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* **6**, 135.
- Chen, H., Smith, G. J., Zhang, S. Y., Qin, K., Wang, J., Li, K. S., Webster, R. G., Peiris, J. S., and Guan, Y. (2005). Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* **436**(7048), 191-2.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12), 1306-12.
- Cheung, C., Poon, L., Lau, A., Luk, W., Lau, Y., Shortridge, K., Gordon, S., Guan, Y., and Peiris, J. (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *The Lancet* **360**(9348), 1831-1837.
- Cheung, C. L., Vijaykrishna, D., Smith, G. J., Fan, X. H., Zhang, J. X., Bahl, J., Duan, L., Huang, K., Tai, H., Wang, J., Poon, L. L., Peiris, J. S., Chen, H., and Guan, Y. (2007). Establishment of influenza A virus (H6N1) in minor poultry species in southern China. *J Virol* **81**(19), 10402-12.
- Cilloniz, C., Pantin-Jackwood, M. J., Ni, C., Goodman, A. G., Peng, X., Proll, S. C., Carter, V. S., Rosenzweig, E. R., Szretter, K. J., Katz, J. M., Korth, M. J., Swayne, D. E., Tumpey, T. M., and Katze, M. G. (2010). Lethal Dissemination of H5N1 Influenza Virus Is Associated with Dysregulation of Inflammation and Lipoxin Signaling in a Mouse Model of Infection. *Journal of Virology* **84**(15), 7613-7624.
- Cilloniz, C., Shinya, K., Peng, X., Korth, M. J., Proll, S. C., Aicher, L. D., Carter, V. S., Chang, J. H., Kobasa, D., Feldmann, F., Strong, J. E., Feldmann, H., Kawaoka, Y., and Katze, M. G. (2009). Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS Pathog* **5**(10), e1000604.
- Claas, E. C. J., Osterhaus, A. D. M. E., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F., and Webster, R. G. (1998). Human

- influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *The Lancet* **351**(9101), 472-477.
- Collins, P. J., Haire, L. F., Lin, Y. P., Liu, J., Russell, R. J., Walker, P. A., Skehel, J. J., Martin, S. R., Hay, A. J., and Gamblin, S. J. (2008). Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature* **453**(7199), 1258-61.
- Coloma, R., Valpuesta, J. M., Arranz, R., Carrascosa, J. L., Ortin, J., and Martin-Benito, J. (2009). The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**(6), e1000491.
- Conenello, G. M., and Palese, P. (2007). Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe* **2**(4), 207-9.
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., Tumpey, T., and Palese, P. (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**(10), 1414-21.
- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G., and Paulson, J. C. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**(1), 17-23.
- Corden, J. L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**(10), 383-7.
- Couceiro, J. N., Paulson, J. C., and Baum, L. G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* **29**(2), 155-65.
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**(3), 205-13.
- Davis, L. M., and Spackman, E. (2008). Do crocodilians get the flu? Looking for influenza A in captive crocodilians. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **309A**(10), 571-580.
- de Jong, J. C., Claas, E. C., Osterhaus, A. D., Webster, R. G., and Lim, W. L. (1997). A pandemic warning? *Nature* **389**(6651), 554.
- de Jong, M. D., Simmons, C. P., Thanh, T. T., Hien, V. M., Smith, G. J. D., Chau, T. N. B., Hoang, D. M., Van Vinh Chau, N., Khanh, T. H., Dong, V. C., Qui, P. T., Van Cam, B., Ha, D. Q., Guan, Y., Peiris, J. S. M., Chinh, N. T., Hien, T. T., and Farrar, J. (2006). Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medicine* **12**(10), 1203-1207.
- Deng, T., Vreede, F. T., and Brownlee, G. G. (2006). Different De Novo Initiation Strategies Are Used by Influenza Virus RNA Polymerase on Its cRNA and Viral RNA Promoters during Viral RNA Replication. *Journal of Virology* **80**(5), 2337-2348.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. H. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240), 914-918.
- Du Ry van Beest Holle, M., Meijer, A., Koopmans, M., and de Jager, C. M. (2005). Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. *Euro Surveill* **10**(12), 264-8.
- Duan, L., Bahl, J., Smith, G., Wang, J., Vijaykrishna, D., Zhang, L., Zhang, J., Li, K., Fan, X., and Cheung, C. (2008). The development and genetic diversity of H5N1 influenza virus in China, 1996–2006. *Virology* **380**(2), 243-254.
- Dubey, S. C., Dahal, N., Nagarajan, S., Tosh, C., Murugkar, H. V., Rinzin, K., Sharma, B., Jain, R., Katare, M., Patil, S., Khandia, R., Syed, Z., Tripathi, S., Behera, P., Kumar, M., Kulkarni, D. D., and Krishna, L. (2011). Isolation and characterization of influenza A virus (subtype H5N1) that caused the first highly pathogenic avian influenza outbreak in chicken in Bhutan. *Vet Microbiol*.
- Ducatez, M. F., Olinger, C. M., Owoade, A. A., Tarnagda, Z., Tahita, M. C., Sow, A., De Landtsheer, S., Ammerlaan, W., Ouedraogo, J. B., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A., and Muller, C. P. (2007). Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2297-306.

- Dugan, V. G., Chen, R., Spiro, D. J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Ghedin, E., Nolting, J., Swayne, D. E., Runstadler, J. A., Happ, G. M., Senne, D. A., Wang, R., Slemons, R. D., Holmes, E. C., and Taubenberger, J. K. (2008). The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* **4**(5), e1000076.
- Engelhardt, O. G., Smith, M., and Fodor, E. (2005). Association of the Influenza A Virus RNA-Dependent RNA Polymerase with Cellular RNA Polymerase II. *Journal of Virology* **79**(9), 5812-5818.
- Fedson, D. S. (2009). Was bacterial pneumonia the predominant cause of death in the 1918-1919 influenza pandemic? *J Infect Dis* **199**(9), 1408-9; author reply 1409-10.
- Finkelstein, D. B., Mukatira, S., Mehta, P. K., Obenauer, J. C., Su, X., Webster, R. G., and Naeve, C. W. (2007). Persistent Host Markers in Pandemic and H5N1 Influenza Viruses. *Journal of Virology* **81**(19), 10292-10299.
- Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., Van Doornum, G. J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., and Osterhaus, A. D. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5), 1356-61.
- Gabriel, G., Abram, M., Keiner, B., Wagner, R., Klenk, H. D., and Stech, J. (2007). Differential Polymerase Activity in Avian and Mammalian Cells Determines Host Range of Influenza Virus. *Journal of Virology* **81**(17), 9601-9604.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H. D., and Stech, J. (2005). The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18590-5.
- Gabriel, G., Herwig, A., and Klenk, H.-D. (2008). Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin α 1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathogens* **4**(2), e11.
- Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Schmidt, T., Rother, F., Baumgarte, S., Keiner, B., Hartmann, E., Bader, M., Brownlee, G. G., Fodor, E., and Klenk, H.-D. (2011). Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nature Communications* **2**(1), 156.
- Gack, M. U., Albrecht, R. A., Urano, T., Inn, K. S., Huang, I. C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J. U., and Garcia-Sastre, A. (2009). Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**(5), 439-49.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P., and Muster, T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**(2), 324-30.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivailler, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C. A., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. A., Clark, P. A., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I., and Cox, N. J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**(5937), 197-201.
- Garten, W., Vey, M., Ohuchi, R., Ohuchi, M., and Klenk, H. D. (1991). Modification of the cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin by site-specific mutagenesis. *Behring Inst Mitt*(89), 12-22.
- Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W., and Luo, M. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785), 357-60.

- Guan, Y., Peiris, J. S., Lipatov, A. S., Ellis, T. M., Dyrting, K. C., Krauss, S., Zhang, L. J., Webster, R. G., and Shortridge, K. F. (2002). Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13), 8950-5.
- Guan, Y., Peiris, J. S., Poon, L. L., Dyrting, K. C., Ellis, T. M., Sims, L., Webster, R. G., and Shortridge, K. F. (2003). Reassortants of H5N1 influenza viruses recently isolated from aquatic poultry in Hong Kong SAR. *Avian Dis* **47**(3 Suppl), 911-3.
- Gubareva, L. V., Kaiser, L., Matrosovich, M. N., Soo-Hoo, Y., and Hayden, F. G. (2001). Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. *J Infect Dis* **183**(4), 523-31.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W., Ortin, J., Hart, D. J., and Cusack, S. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5), 500-6.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**(7), 690-8.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., and Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**(5536), 1840-2.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A., Zeng, Z., Ge, R., Rao, Z., and Liu, Y. (2008). Crystal structure of the polymerase PAC-PB1N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**(7208), 1123-1126.
- Herlocher, M. L., Carr, J., Ives, J., Elias, S., Truscon, R., Roberts, N., and Monto, A. S. (2002). Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res* **54**(2), 99-111.
- Hinshaw, V. S., Webster, R. G., and Turner, B. (1980). The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol* **26**(5), 622-9.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., and Webster, R. G. (2000a). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11), 6108-13.
- Hoffmann, E., Stech, J., Leneva, I., Krauss, S., Scholtissek, C., Chin, P. S., Peiris, M., Shortridge, K. F., and Webster, R. G. (2000b). Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J Virol* **74**(14), 6309-15.
- Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. (1999). Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **4**(8), 475-85.
- Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. (2002). Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20), 13166-71.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22), 8140-4.
- Huchzermeyer, F. (2003). "Crocodiles: biology, husbandry and diseases." CABI Publishing.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G., and Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**(9), 7367-73.
- Ives, J. A., Carr, J. A., Mendel, D. B., Tai, C. Y., Lambkin, R., Kelly, L., Oxford, J. S., Hayden, F. G., and Roberts, N. A. (2002). The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **55**(2), 307-17.
- Johnson, N. P., and Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**(1), 105-15.
- Jorba, N., Coloma, R., and Ortin, J. (2009). Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**(5), e1000462.

- Kandun, I. N., Wibisono, H., Sedyaningsih, E. R., Yusharmen, Hadisoedarsuno, W., Purba, W., Santoso, H., Septiawati, C., Tresnaningsih, E., Heriyanto, B., Yuwono, D., Harun, S., Soeroso, S., Giriputra, S., Blair, P. J., Jeremijenko, A., Kosasih, H., Putnam, S. D., Samaan, G., Silitonga, M., Chan, K. H., Poon, L. L., Lim, W., Klimov, A., Lindstrom, S., Guan, Y., Donis, R., Katz, J., Cox, N., Peiris, M., and Uyeki, T. M. (2006). Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* **355**(21), 2186-94.
- Kawaoka, Y., and Webster, R. G. (1988). Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2), 324-8.
- Kayali, G., El-Shesheny, R., Kutkat, M. A., Kandeil, A. M., Mostafa, A., Ducatez, M. F., McKenzie, P. P., Govorkova, E. A., Nasraa, M. H., Webster, R. G., Webby, R. J., and Ali, M. A. (2011a). Continuing Threat of Influenza (H5N1) Virus Circulation in Egypt. *Emerg Infect Dis* **17**(12), 2306-8.
- Kayali, G., Webby, R. J., Ducatez, M. F., El Shesheny, R. A., Kandeil, A. M., Govorkova, E. A., Mostafa, A., and Ali, M. A. (2011b). The epidemiological and molecular aspects of influenza H5N1 viruses at the human-animal interface in Egypt. *PLoS ONE* **6**(3), e17730.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D. M., and Poovorawan, Y. (2004). Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* **10**(12), 2189-91.
- Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., Kishino, Y., Fukutomi, A., and Katunuma, N. (1992). 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* **267**(19), 13573-9.
- Kiss, I., German, P., Sami, L., Antal, M., Farkas, T., Kardos, G., Kecskemeti, S., Dan, A., and Belak, S. (2006). Application of real-time RT-PCR utilising lux (light upon extension) fluorogenic primer for the rapid detection of avian influenza viruses. *Acta Vet Hung* **54**(4), 525-33.
- Klenk, H. D. (2005). Infection of the endothelium by influenza viruses. *Thromb Haemost* **94**(2), 262-5.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M., and Blodorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**(2), 426-39.
- Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens, M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar, N., Gubler, D., and Bunning, M. (2004). Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* **10**(12), 2150-5.
- Köhler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., and Pulverer, G. (2001). "Medizinische Mikrobiologie." 8 ed. Urban Fischer Verlag, München, Jena.
- Lang, G., Gagnon, A., and Geraci, J. R. (1981). Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch Virol* **68**(3-4), 189-95.
- Lee, M. T., Bishop, K., Medcalf, L., Elton, D., Digard, P., and Tiley, L. (2002). Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **30**(2), 429-38.
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Estoepangestie, A. T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H. T., Hanh, N. T., Webby, R. J., Poon, L. L., Chen, H., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Webster, R. G., and Peiris, J. S. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**(6996), 209-13.
- Li, M. L., Rao, P., and Krug, R. M. (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* **20**(8), 2078-86.
- Li, S. Q., Orlich, M., and Rott, R. (1990). Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. *J Virol* **64**(7), 3297-303.

- Li, X., and Palese, P. (1994). Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* **68**(2), 1245-9.
- Li, Z., Chen, H., Jiao, P., Deng, G., Tian, G., Li, Y., Hoffmann, E., Webster, R. G., Matsuoka, Y., and Yu, K. (2005). Molecular Basis of Replication of Duck H5N1 Influenza Viruses in a Mammalian Mouse Model. *Journal of Virology* **79**(18), 12058-12064.
- Liem, N. T., and Lim, W. (2005). Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis* **11**(2), 210-5.
- Liu, J., Xiao, H., Lei, F., Zhu, Q., Qin, K., Zhang, X. W., Zhang, X. L., Zhao, D., Wang, G., Feng, Y., Ma, J., Liu, W., Wang, J., and Gao, G. F. (2005). Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* **309**(5738), 1206.
- Lupiani, B., and Reddy, S. M. (2009). The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **32**(4), 311-23.
- Mancini, D. A., Mendonca, R. M., Cianciarullo, A. M., Kobashi, L. S., Trindade, H. G., Fernandes, W., and Pinto, J. R. (2004). [Influenza in heterothermic animals]. *Rev Soc Bras Med Trop* **37**(3), 204-9.
- Manz, B., Matrosovich, M., Bovin, N., and Schwemmler, M. (2010). A Polymorphism in the Hemagglutinin of the Human Isolate of a Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Determines Organ Tropism in Mice. *Journal of Virology* **84**(16), 8316-8321.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**(6), 951-61.
- Martin-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., and Ortin, J. (2001). Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **2**(4), 313-7.
- Massin, P., van der Werf, S., and Naffakh, N. (2001). Residue 627 of PB2 Is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology* **75**(11), 5398-5404.
- Masunaga, K., Mizumoto, K., Kato, H., Ishihama, A., and Toyoda, T. (1999). Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies. *Virology* **256**(1), 130-41.
- Matrosovich, M., and Klenk, H.-D. (2003). Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding. *Reviews in Medical Virology* **13**(2), 85-97.
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., and Klenk, H. D. (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J* **3**, 63.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., and Webster, R. (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* **73**(2), 1146-55.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13), 4620-4.
- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I. W., and Cusack, S. (2002a). Co-crystallization of the human nuclear cap-binding complex with a m7GpppG cap analogue using protein engineering. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 12), 2194-7.
- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I. W., and Cusack, S. (2002b). Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO J* **21**(20), 5548-57.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W., and McCullers, J. A. (2007). Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. *Cell Host & Microbe* **2**(4), 240-249.
- Mehle, A., and Doudna, J. A. (2008). An Inhibitory Activity in Human Cells Restricts the Function of an Avian-like Influenza Virus Polymerase. *Cell Host & Microbe* **4**(2), 111-122.

- Mena, I., Jambrina, E., Albo, C., Perales, B., Ortin, J., Arrese, M., Vallejo, D., and Portela, A. (1999). Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* **73**(2), 1186-94.
- Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U. (2003). "Molekulare Virologie." 2 ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., Iwamatsu, A., Palese, P., and Nagata, K. (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4), 1899-908.
- Moncorge, O., Mura, M., and Barclay, W. S. (2010). Evidence for Avian and Human Host Cell Factors That Affect the Activity of Influenza Virus Polymerase. *Journal of Virology* **84**(19), 9978-9986.
- Morens, David M., Taubenberger, Jeffery K., and Fauci, Anthony S. (2008). Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *The Journal of Infectious Diseases* **198**(7), 962-970.
- Moscona, A. (2009). Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* **360**(10), 953-6.
- Mukaigawa, J., and Nayak, D. P. (1991). Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* **65**(1), 245-53.
- Muller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D. H., and Bouloy, M. (1994). Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* **75** (Pt 6), 1345-52.
- Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., Akao, M., Okumura, Y., Parry, M. A., and Kido, H. (2001). Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem* **268**(10), 2847-55.
- Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., and Nagata, K. (2007). Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**(3), 1339-49.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W., and Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**(7), 991-1000.
- Neumann, G., Green, M. A., and Macken, C. A. (2010). Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gen Virol* **91**(Pt 8), 1984-95.
- Newcomb, L. L., Kuo, R. L., Ye, Q., Jiang, Y., Tao, Y. J., and Krug, R. M. (2009). Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* **83**(1), 29-36.
- Ng, A. K. L., Zhang, H., Tan, K., Li, Z., Liu, J. h., Chan, P. K. S., Li, S. M., Chan, W. Y., Au, S. W. N., Joachimiak, A., Walz, T., Wang, J. H., and Shaw, P. C. (2008). Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *The FASEB Journal* **22**(10), 3638-3647.
- Nobusawa, E., and Sato, K. (2006). Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* **80**(7), 3675-8.
- Normile, D. (2006). Avian influenza. Evidence points to migratory birds in H5N1 spread. *Science* **311**(5765), 1225.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., and Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**(39), 22701-4.
- O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**(1), 288-96.
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J. R. H., and Park, S.-Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**(7208), 1127-1131.

- Ohtsu, Y., Honda, Y., Sakata, Y., Kato, H., and Toyoda, T. (2002). Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**(3), 167-75.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., and Ortin, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**(1), 156-63.
- Palese, P., and Compans, R. W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **33**(1), 159-63.
- Palese, P., Schulman, J. L., Bodo, G., and Meindl, P. (1974). Inhibition of influenza and parainfluenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA). *Virology* **59**(2), 490-8.
- Palese, P., and Shaw, M. L. (2007). "Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication." 5th ed. Fields Virology (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), 2. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Pereira, H. G., Tumova, B., and Law, V. G. (1965). Avian influenza A viruses. *Bull World Health Organ* **32**(6), 855-60.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (1995). A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**(11), 6932-9.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (2001). Functional Analysis of PA Binding by Influenza A Virus PB1: Effects on Polymerase Activity and Viral Infectivity. *Journal of Virology* **75**(17), 8127-8136.
- Perez, J. T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Garcia-Sastre, A., and tenOever, B. R. (2010). Cozzarelli Prize Winner: From the Cover: Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(25), 11525-11530.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R. M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**(3), 847-58.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**(12), 3867-74.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P. C., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Boonnak, K., Khanyok, R., Thawachsupa, P., Kijphati, R., and Sawanpanyalert, P. (2005). Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* **86**(Pt 2), 423-33.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., and Ortin, J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* **8**(2), 207-15.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Zamarreno, N., Fernandez, Y., Juarez, S., and Ortin, J. (2008). The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* **3**(12), e3904.
- Rios-Soto, K. R., Song, B., and Castillo-Chavez, C. (2011). Epidemic spread of influenza viruses: The impact of transient populations on disease dynamics. *Math Biosci Eng* **8**(1), 199-222.
- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T., and Fodor, E. (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *Journal of General Virology* **90**(6), 1398-1407.
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., and Nieto, A. (2007). Influenza Virus Infection Causes Specific Degradation of the Largest Subunit of Cellular RNA Polymerase II. *Journal of Virology* **81**(10), 5315-5324.
- Ruigrok, R. W., Crepin, T., Hart, D. J., and Cusack, S. (2010). Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr Opin Struct Biol* **20**(1), 104-13.
- Sakoda, Y., Ito, H., Uchida, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, N., Soda, K., Nomura, N., Kuribayashi, S., Shichinohe, S., Sunden, Y., Umemura, T., Usui, T., Ozaki, H.,

- Yamaguchi, T., Murase, T., Ito, T., Saito, T., Takada, A., and Kida, H. (2011). Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol*.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E. A., Ilyushina, N. A., Yen, H. L., Hulse-Post, D. J., Humberd, J., Trichet, M., Rehg, J. E., Webby, R. J., Webster, R. G., and Hoffmann, E. (2006). The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* **203**(3), 689-97.
- Salzberg, S. L., Kingsford, C., Cattoli, G., Spiro, D. J., Janies, D. A., Aly, M. M., Brown, I. H., Couacy-Hymann, E., De Mia, G. M., Dung do, H., Guercio, A., Joannis, T., Maken Ali, A. S., Osmani, A., Padalino, I., Saad, M. D., Savic, V., Sengamalay, N. A., Yingst, S., Zaborsky, J., Zorman-Rojs, O., Ghedin, E., and Capua, I. (2007). Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg Infect Dis* **13**(5), 713-8.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(12), 5463-7.
- Schäfer, W. (1955). Vergleichender sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. *Z Naturforsch B*(10b), 81-91.
- Scheiblaue, H., Kendal, A. P., and Rott, R. (1995). Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species. *Arch Virol* **140**(2), 341-8.
- Scholtissek, C. (1990). Pigs as 'Mixing Vessels' for the Creation of New Pandemic Influenza A Viruses. *Med Principles Pract* **1990/1991**(2), 65-71.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., and Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**(1), 13-20.
- Schultsz, C., Dong, V. C., Chau, N. V., Le, N. T., Lim, W., Thanh, T. T., Dolecek, C., de Jong, M. D., Hien, T. T., and Farrar, J. (2005). Avian influenza H5N1 and healthcare workers. *Emerg Infect Dis* **11**(7), 1158-9.
- Seo, S. H., Hoffmann, E., and Webster, R. G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**(9), 950-4.
- Shapiro, G. I., and Krug, R. M. (1988). Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**(7), 2285-90.
- Shih, S. R., and Krug, R. M. (1996). Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* **226**(2), 430-5.
- Shinya, K., Hatta, M., Yamada, S., Takada, A., Watanabe, S., Halfmann, P., Horimoto, T., Neumann, G., Kim, J. H., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., Kiso, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Kawaoka, Y. (2005). Characterization of a Human H5N1 Influenza A Virus Isolated in 2003. *Journal of Virology* **79**(15), 9926-9932.
- Shinya, K., Makino, A., Ozawa, M., Kim, J. H., Sakai-Tagawa, Y., Ito, M., Le, Q. M., and Kawaoka, Y. (2009). Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus possessing mammalian-type amino acids in the PB2 protein. *J Virol* **83**(24), 13015-8.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., Cheung, C. L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J. S., Guan, Y., and Rambaut, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**(7250), 1122-5.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. (2006a). Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis* **12**(4), 681-3.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., Thanawongnuwech, R., and Poovorawan, Y. (2006b). Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis* **12**(11), 1744-7.
- Starick, E., Beer, M., Hoffmann, B., Staubach, C., Werner, O., Globig, A., Strebelow, G., Grund, C., Durban, M., Conraths, F. J., Mettenleiter, T., and Harder, T. (2008). Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from

- Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. *Vet Microbiol* **128**(3-4), 243-52.
- Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, H., and Egorov, A. (2005). Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol* **86**(Pt 1), 185-95.
- Steel, J., Lowen, A. C., Mubareka, S., and Palese, P. (2009). Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* **5**(1), e1000252.
- Steinhauer, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* **258**(1), 1-20.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., and Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* **11**(7), 2407-14.
- Suarez, D. L., Perdue, M. L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J., and Swayne, D. E. (1998). Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol* **72**(8), 6678-88.
- Subbarao, E. K., London, W., and Murphy, B. R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* **67**(4), 1761-4.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., and Cox, N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**(5349), 393-6.
- Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J. R. H., Nagata, K., and Park, S.-Y. (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *The EMBO Journal* **28**(12), 1803-1811.
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P. J., Bougault, C. M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R. W. H., Daigle, N., Ellenberg, J., Cusack, S., Simorre, J.-P., and Hart, D. J. (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**(3), 229-233.
- Tarendeau, F., Crepin, T., Guilligay, D., Ruigrok, R. W., Cusack, S., and Hart, D. J. (2008). Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**(8), e1000136.
- Thierry, F., and Danos, O. (1982). Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**(9), 2925-38.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T., and Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* **68**(8), 5108-16.
- Tindall, K. R., and Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**(16), 6008-13.
- Tomassini, J., Selnick, H., Davies, M. E., Armstrong, M. E., Baldwin, J., Bourgeois, M., Hastings, J., Hazuda, D., Lewis, J., McClements, W., and et al. (1994). Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(12), 2827-37.
- Toyoda, T., Adyshev, D. M., Kobayashi, M., Iwata, A., and Ishihama, A. (1996). Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol* **77** (Pt 9), 2149-57.
- Ulmanen, I., Broni, B. A., and Krug, R. M. (1981). Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7355-9.
- Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H. D., Rott, R., and Garten, W. (1992). Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **188**(1), 408-13.

- Vong, S., Coghlan, B., Mardy, S., Holl, D., Seng, H., Ly, S., Miller, M. J., Buchy, P., Froehlich, Y., Dufourcq, J. B., Uyeki, T. M., Lim, W., and Sok, T. (2006). Low frequency of poultry-to-human H5N1 virus transmission, southern Cambodia, 2005. *Emerg Infect Dis* **12**(10), 1542-7.
- Vreede, F. T., and Brownlee, G. G. (2007). Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**(5), 2196-204.
- Vreede, F. T., Gifford, H., and Brownlee, G. G. (2008). Role of Initiating Nucleoside Triphosphate Concentrations in the Regulation of Influenza Virus Replication and Transcription. *Journal of Virology* **82**(14), 6902-6910.
- Wagner, R., Matrosovich, M., and Klenk, H.-D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology* **12**(3), 159-166.
- Watanabe, Y., Ibrahim, M. S., Ellakany, H. F., Kawashita, N., Mizuike, R., Hiramatsu, H., Sriwilaijaroen, N., Takagi, T., Suzuki, Y., and Ikuta, K. (2011). Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog* **7**(5), e1002068.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**(1), 152-79.
- Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., and Murti, K. G. (1978). Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* **84**(2), 268-78.
- Whittaker, G., Bui, M., and Helenius, A. (1996a). Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* **70**(5), 2743-56.
- Whittaker, G., Bui, M., and Helenius, A. (1996b). The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol* **6**(2), 67-71.
- WHO/OIE/FAO (2012). Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *Influenza Other Respi Viruses* **6**(1), 1-5.
- Wong, K. K., Bull, R. A., Rockman, S., Scott, G., Stelzer-Braid, S., and Rawlinson, W. (2011). Correlation of polymerase replication fidelity with genetic evolution of influenza A/Fujian/411/02(H3N2) viruses. *J Med Virol* **83**(3), 510-6.
- Xu, X., Subbarao, Cox, N. J., and Guo, Y. (1999). Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* **261**(1), 15-9.
- Ye, Q., Krug, R. M., and Tao, Y. J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**(7122), 1078-1082.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., Fodor, E., Rao, Z., and Liu, Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240), 909-913.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- 1.1 Struktur des Influenza-A-Virus und eines vRNP
- 1.2 Schematische Darstellung der viralen Polymerase-Untereinheiten
- 1.3 Computermodell eines vRNP aus EM-Bildern
- 1.4 Cryo-EM-Modell eines vRNP
- 1.5 Darstellung der Oberflächenladung des Nukleoproteins
- 1.6 Modell der NP-NP-Interaktionsdomäne
- 1.7 Modell der PA-PB1-Interaktionsdomäne
- 1.8 Modell des katalytischen Zentrums der PA-Untereinheit
- 1.9 Modell des Cap-Bindungszentrums der PB2-Untereinheit
- 1.10 Darstellung der Oberflächenladung der PB2-627-Domäne
- 1.11 Modell der PB2-627-NLS-Domäne
- 1.12 Modell der PB2-Importin α -Interaktion und des PB2-NLS
- 1.13 Modell der PB2-PB1-Interaktionsdomäne
- 1.14 Schematische Darstellung des Influenza-Replikationszyklus
- 1.15 Schematische Darstellung der HA-vermittelten Membranfusion
- 1.16 Schematische Darstellung der Transkriptions-Initiation
- 1.17 Schematische Darstellung der Genom-Replikation
- 1.18 Wirtsspektrum der Influenza-A-Viren
- 1.19 Beispiel für die Pathogenitätsunterschiede zwischen LPAIV und HPAIV
- 1.20 Phylogenie der H5-HA nach 1996
- 3.1 Schematische Darstellung der Klonierung nach Stargate®
- 4.1 Die Polymerase-Aktivität von Kan-1 im Vergleich zu einer H3N2-Polymerase
- 4.2 Vergleich der Polymerase-Aktivität der Kan-1 PB2-Punktmutanten in HEK293T-Zellen
- 4.3 Vergleich der Polymerase-Aktivität der Gs/Gd/96 PB2-Punktmutanten in HEK293T-Zellen
- 4.4 Vergleich der Polymerase-Aktivität der Kan-1 PB2-Punktmutanten in LMH-Zellen
- 4.5 Vergleich der Polymerase-Aktivität der Kan-1 PB2-Punktmutanten in QT-6-Zellen
- 4.6 Schematische Darstellung zur Generierung rekombinanter Viren nach Hoffmann et al., 2000
- 4.7 Vergleich der Plaque-Größe rekombinanter Kan-1 PB2-Punktmutanten
- 4.8 Darstellung des Plaque-Größenvergleichs der Kan-1 PB2-Punktmutanten
- 4.9 Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren Kan-1 PB2_{701N} und Kan-1 PB2_{701D} in MDCK II-Zellen, MOI 0,0001
- 4.10 Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren Kan-1 PB2_{701N} und Kan-1 PB2_{701D} in MDCK II-Zellen, MOI 0,00001
- 4.11 Wachstumsverhalten aller rekombinanten Kan-1 PB2-Punktmutanten in MDCK II-Zellen
- 4.12 Wachstumsverhalten aller rekombinanten Kan-1 PB2-Punktmutanten in A549-Zellen
- 4.13 Zelltropismus von Kan-1 in HTBE-Zellen
- 4.14 Wachstumsverhalten der rekombinanten Kan-1-Viren PB2_{701N-714S}, PB2_{701D-714S}, PB2_{701D-714I} und PB2_{701D-714R} in HTBE-Zellen
- 4.15 Zeitlicher Verlauf der Mutation PB2 E627K im Kan-1 PB2_{701D-714S}-Virus in HTBE-Zellen
- 4.16 Vergleich des Wachstumsverhalten des rekombinanten Kan-1-Virus mit dem Virusisolat und einem pandemischen H1N1-Virus in HTBE-Zellen
- 4.17 Wachstumsverhalten aller rekombinanten Kan-1 PB2-Punktmutanten in LMH-Zellen

- 4.18 Wachstumsverhalten aller rekombinanten Kan-1 PB2-Punktmutanten in QT-6-Zellen
- 4.19 Darstellung der ermittelten mittleren Todeszeit von Mäusen nach Infektion mit rekombinarem Kan-1-Virus
- 4.20 Gewichtsverlust der mit rekombinanten Kan-1-Viren und PB2-Mutanten infizierten Mäuse
- 4.21 Überlebensrate der mit rekombinanten Kan-1-Viren und PB2-Mutanten infizierten Mäuse
- 4.22 Darstellung der Virustiter in den Organen infizierter Mäuse
- 5.1** Vergleich der PB2-Sequenz von Kan-1 mit Konsensus Sequenzen aviärer und humaner Isolate
- 5.2 Übersichtskarte der WHO: humane H5N1-Infektionen 2003-2011
- 5.3 Darstellung der Mortalität humaner H5N1-Infektionen 2003-2011

Tabellen

- 1.1** Übersichtstabelle über die fünf Genera der Familie Orthomyxoviridae
- 1.2 Übersichtstabelle über Eigenschaften und Funktionen der viralen Proteine
- 1.3 Auflistung der weltweit gemeldeten H5N1-Ausbrüche in Vögeln seit 1996
- 1.4 Mutationen in der viralen Polymerase, die im Zusammenhang mit dem Wirtswechsel beschrieben wurden
- 4.1** Auflistung der verwendeten Mutagenese-primere
- 4.2 Auflistung der eingeführten Punktmutationen im PB2-Protein des Kan-1-Virus
- 4.3 Übersichtstabelle über die Überlebensrate und Organtiter der infizierten Mäuse
- 5.1** Auflistung aller seit 2003 dokumentierten humanen H5N1-Infektionen, weltweit

9. Appendix

Zur Erstellung der humanen und aviäre PB2-Konsensus-Sequenz wurden die im Folgenden aufgelisteten Aminosäure-Sequenzen aus der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> herangezogen:

Humane H5N1 Isolate 2001-2011

<u>Isolatbezeichnung</u>	<u>GenBank Nr.</u>	<u>Isolatbezeichnung</u>	<u>GenBank Nr.</u>
A/Hong Kong/378.1/2001	ACZ45426	A/Indonesia/CDC644/2006	ABI36482
A/HK/212/03	AAT39029	A/Indonesia/CDC742/2006	ABI49403
A/Vietnam/UT3035/2003	ADF83734	A/Indonesia/CDC938/2006	ABL07004
A/Vietnam/UT3030/2003	ADF83735	A/Indonesia/CDC940/2006	ABL07026
A/Hong Kong/213/2003	AAT39030	A/Indonesia/CDC835/2006	ABL31740
A/Hong Kong/213/2003	BAE07198	A/Indonesia/CDC836/2006	ABL31751
A/Vietnam/UT3028/2003	ADF83737	A/Indonesia/CDC759/2006	ABL31773
A/Beijing/01/2003	ABQ58976	A/Shenzhen/406H/2006	ABO36651
A/Viet Nam/1194/2004	AAT73549	A/Turkey/12/2006	ABQ58902
A/Viet Nam/3046/2004	AAT73551	A/Turkey/651242/2006	ABQ58903
A/Thailand/5(KK-494)/2004	AAV32645	A/Turkey/65596/2006	ABQ58904
A/Vietnam/UT3062/2004	ADF83730	A/Azerbaijan/008-208/2006	ABV23967
A/Vietnam/UT3040II/2004	ADF83732	A/Azerbaijan/006-207/2006	ABV23976
A/Thailand/2(SP-33)/2004	AAV32653	A/Iraq/1/2006	ABV23985
A/Thailand/1(KAN-1)/2004	AAV35117	A/Iraq/755/2006	ABV23996
A/Vietnam/CL01/2004	ABF01743	A/Egypt/902786/2006	ABV24005
A/Vietnam/CL02/2004	ABF01744	A/Egypt/902782/2006	ABV24016
A/Vietnam/CL26/2004	ABF01745	A/Indonesia/583H/2006	ABW06109
A/Vietnam/CL36/2004	ABF01746	A/Indonesia/604H/2006	ABW06131
A/Vietnam/CL100/2004	ABF01747	A/Indonesia/560H/2006	ABW06152
A/Vietnam/CL20/2004	ABH01086	A/Indonesia/542H/2006	ABW06163
A/Thailand/SP83/2004	ABO10164	A/Indonesia/536H/2006	ABW06181
A/Viet Nam/1204/2004	ABO21695	A/Indonesia/535H/2006	ABW06192
A/Thailand/16/2004	ABO21696	A/Indonesia/567H/2006	ABW06214
A/Thailand/WRAIR1720H/2004	ADL39518	A/Indonesia/341H/2006	ABW06236
A/Vietnam/HN30262IIIM3/2004	ADF83728	A/Indonesia/321H/2006	ABW06247
A/Vietnam/UT30259/2004	ADF83729	A/Indonesia/304H/2006	ABW06269
A/Vietnam/UT3047III/2004	ADF83731	A/Indonesia/298H/2006	ABW06279
A/Vietnam/UT3040/2004	ADF83733	A/Indonesia/286H/2006	ABW06290
A/Thailand/WRAIR1721H/2004	ADL39529	A/Indonesia/283H/2006	ABW06298
A/Cambodia/P0322095/2005	ADM95267	A/Thailand/NBL1/2006	ACU46651
A/Vietnam/CL105/2005	ABF01748	A/Anhui/T2/2006	ABW24469
A/Vietnam/CL115/2005	ABF01749	A/Guangdong/01/2006	AEO89009
A/Vietnam/CL119/2005	ABF01750	A/Guangdong/2/2006	AEO89044
A/Vietnam/CL2009/2005	ABF01751	A/Cambodia/Q0321176/2006	ADM95272

A/Viet Nam/DT-036/2005	AAZ72955	A/Hunan/1/2006	AEO88993
A/Thailand/676/2005	ABC72647	A/Zhejiang/1/2006	AEO89001
A/Thailand/NK165/2005	ABD16291	A/Shanghai/1/2006	AEO89017
A/Indonesia/5/2005	ABI35999	A/Hubei/1/2006	AEO89026
A/Indonesia/CDC7/2005	ABI36008	A/Sichuan/3/2006	AEO89035
A/Indonesia/CDC184/2005	ABI36211	A/Xinjiang/1/2006	AEO89053
A/Indonesia/CDC194P/2005	ABI36213	A/Anhui/1/2006	AEO89061
A/Indonesia/CDC287E/2005	ABI36218	A/Cambodia/R0405050/2007	ADM95256
A/Indonesia/CDC287T/2005	ABI36223	A/Indonesia/CDC887/2006	ABL31776
A/Indonesia/CDC292N/2005	ABI36227	A/Indonesia/CDC1031/2007	ABM90430
A/Indonesia/CDC292T/2005	ABI36228	A/Indonesia/CDC1031T/2007	ABM90441
A/Cambodia/408008/2005	ADR78651	A/Indonesia/CDC1031RE2/2007	ABM90463
A/Guangxi/1/2005	ADG59485	A/Indonesia/CDC1032/2007	ABM90474
A/Anhui/1/2005	ADG59510	A/Indonesia/CDC1046/2007	ABM90507
A/Anhui/1/2005	AEO88937	A/Laos/Nong Khai 1/2007	ACA64016
A/Anhui/2/2005	AEO88944	A/Vietnam/HN1/2007	ACS93349
A/Guangxi/1/2005	AEO88952	A/Jiangsu/2/2007	ACB87572
A/Jiangxi/1/2005	AEO88960	A/Vietnam/HN31388M1/2007	ADF83720
A/Vietnam/UT30850/2005	ADF83726	A/Vietnam/UT31312II/2007	ADF83721
A/Vietnam/UT30408III/2005	ADF83727	A/Vietnam/UT31244III/2007	ADF83722
A/Fujian/1/2005	AEO88968	A/Vietnam/UT31244II/2007	ADF83723
A/Indonesia/6/2005	ABW06369	A/Vietnam/UT31239/2007	ADF83724
A/Indonesia/239H/2005	ABW06318	A/Vietnam/UT31203A/2007	ADF83725
A/Indonesia/175H/2005	ABW06350	A/Fujian/1/2007	AEO89070
A/Sichuan/1/2006	AEO88985	A/Anhui/1/2007	AEO89078
A/China/GD01/2006	ABI16501	A/Vietnam/HN31432M/2008	ADF83716
A/Zhejiang/16/2006	ABG23659	A/Vietnam/UT31413II/2008	ADF83717
A/Indonesia/CDC594/2006	ABI36140	A/Bangladesh/207095/2008	ACL11928
A/Indonesia/CDC597/2006	ABI36173	A/Vietnam/UT31412II/2008	ADF83718
A/Indonesia/CDC523/2006	ABI36194	A/Vietnam/UT31394II/2008	ADF83719
A/Indonesia/CDC326/2006	ABI36234	A/Hunan/1/2008	AEO89087
A/Indonesia/CDC326N/2006	ABI36239	A/Guangxi/1/2008	AEO89096
A/Indonesia/CDC326N2/2006	ABI36243	A/Guangdong/1/2008	AEO89105
A/Indonesia/CDC357/2006	ABI36254	A/Cambodia/S1211394/2008	AEN68864
A/Indonesia/CDC370/2006	ABI36259	A/Beijing/1/2009	AEO89114
A/Indonesia/CDC370P/2006	ABI36264	A/Shandong/1/2009	AEO89123
A/Indonesia/CDC370T/2006	ABI36270	A/Hunan/1/2009	AEO89132
A/Indonesia/CDC582/2006	ABI36305	A/Xinjiang/1/2009	AEO89141
A/Indonesia/CDC610/2006	ABI36311	A/Guizhou/1/2009	AEO89150
A/Indonesia/CDC623/2006	ABI36322	A/Guangxi/1/2009	AEO89159
A/Indonesia/CDC624/2006	ABI36344	A/Hunan/2/2009	AEO89168
A/Indonesia/CDC634/2006	ABI36377	A/Hong Kong/6841/2010	ADR30462
A/Indonesia/CDC634P/2006	ABI36388	A/Hubei/1/2010	AEO89177
A/Indonesia/CDC669/2006	ABI36432	A/Bangladesh/3233/2011	AEA50981

A/Indonesia/CDC669P/2006	ABI36443	A/Cambodia/V0401301/2011	AEN68868
A/Indonesia/CDC699/2006	ABI36454	A/Cambodia/V0606311/2011	AEN68870
A/Indonesia/CDC644T/2006	ABI36471		

Aviäre Isolate, subtypübergreifend 2003-2004

<u>Isolatbezeichnung</u>	<u>GenBank Nr.</u>	<u>Isolatbezeichnung</u>	<u>GenBank Nr.</u>
H3N2 A/duck/Korea/KJ/2003	AEI30007	H5N1 A/chicken/Vietnam/18/2004	ACF76200
H5N1 A/chicken/East Java/ UT1006/2003	ACR49134	H5N1 A/chicken/Vietnam/23/2004	ABY51601
H5N1 A/chicken/Hubei/wn/2003	ABI96756	H5N1 A/chicken/Vietnam/24/2004	ABY51612
H5N1 A/chicken/Hubei/wo/2003	ABI98909	H5N1 A/chicken/Vietnam/830/2004	ACF22451
H5N1 A/chicken/Indonesia/11/2003	ACZ45470	H5N1 A/chicken/Vietnam/890/2004	ACF76211
H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003	ACZ36498	H5N1 A/chicken/Vietnam/921/2004	ACK99277
H5N1 A/chicken/Jilin/ha/2003	ABI98913	H5N1 A/chicken/Vietnam/925/2004	ACK99288
H5N1 A/chicken/Jilin/hj/2003	ABI97343	H5N1 A/chicken/Vietnam/933/2004	ACK99299
H5N1 A/chicken/Jilin/hm/2003	ABJ52573	H5N1 A/chicken/Vietnam/945/2004	AEK65135
H5N1 A/chicken/Jilin/xw/2003	ABI98937	H5N1 A/chicken/Vietnam/949B/2004	AEK65146
H5N1 A/chicken/Korea/ES/03	AAV97607	H5N1 A/chicken/Vietnam/C58/04	AAW80709
H5N1 A/chicken/Legok/2003	ACZ45472	H5N1 A/chicken/Vietnam/DT171/2004	AAZ72951
H5N1 A/chicken/Shantou/ 3744/2003	ACA47787	H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004	ACZ36502
H5N1 A/chicken/West Java/ UT1001/2003	ACR49133	H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004	BAD89302
H5N1 A/chicken/Yunnan/5686/2003	ACA48084	H5N1 A/chicken/Yunnan/207/2004	ACA48161
H5N1 A/chicken/Yunnan/6797/2003	ACA48128	H5N1 A/Ck/Thailand/9.1/2004	AAT73544
H5N1 A/chicken/Yunnan/6885/2003	ACA48139	H5N1 A/Ck/Viet Nam/35/2004	AAT73554
H5N1 A/chicken/Yunnan/6957/2003	ACA48150	H5N1 A/Ck/Viet Nam/36/2004	AAT73555
H5N1 A/chukar/Shantou/4690/2003	ACA47798	H5N1 A/Ck/Viet Nam/37/2004	AAT73556
H5N1 A/Ck/Indonesia/BL/2003	AAT73538	H5N1 A/Ck/Viet Nam/38/2004	AAT73557
H5N1 A/Ck/Indonesia/PA/2003	AAT73536	H5N1 A/Ck/Viet Nam/C57/2004	AAT73559
H5N1 A/duck/China/E319-2/03	AAR99633	H5N1 A/crow/Kyoto/53/2004	BAD89332
H5N1 A/duck/Guangxi/12/2003	ABW95934	H5N1 A/crow/Osaka/102/2004	BAD89342
H5N1 A/duck/Guangxi/27/2003	ABW95945	H5N1 A/curlew/Shandong/61/04	ABI33811
H5N1 A/duck/Hubei/wp/2003	ABJ09483	H5N1 A/Dk/Indonesia/MS/2004	AAT73537
H5N1 A/duck/Hubei/wq/2003	ABJ98941	H5N1 A/Dk/Thailand/71.1/2004	AAT73547
H5N1 A/duck/Korea/ESD1/03	AAV97608	H5N1 A/Dk/Viet Nam/11/2004	AAT73560
H5N1 A/duck/Yokohama/aq10/2003	BAE07152	H5N1 A/duck/Ang Thong/71(2) /2004	ACZ36510
H5N1 A/duck/Yunnan/4072/2003	ACA48040	H5N1 A/duck/Angthong/ NIAH8246/2004	BAG80743
H5N1 A/duck/Yunnan/4645/2003	ACA48051	H5N1 A/duck/East Java/ UT1046/2004	ACR49137
H5N1 A/duck/Yunnan/5948/2003	ACA48095	H5N1 A/duck/Guangdong/173/04	AAW59405
H5N1 A/duck/Yunnan/6080/2003	ACA48106	H5N1 A/duck/Guangdong/23/2004	ADG59504
H5N1 A/duck/Yunnan/6603/2003	ACA48117	H5N1 A/duck/Guangxi/13/2004	ABD14795

H5N1 A/egret/Hong Kong/ 757.2/2003	AAV97606	H5N1 A/duck/Hunan/533/2004	ACA47897
H5N1 A/goose/Fujian/bb/2003	ABJ09510	H5N1 A/duck/Hunan/69/2004	ADG59494
H5N1 A/goose/Jilin/hb/2003	ABJ09535	H5N1 A/duck/Hunan/70/2004	ADG59488
H5N1 A/mallard/Huadong/Y/2003	ABW21674	H5N1 A/duck/Hunan/733/2004	ACA47908
H5N1 A/openbill stork/Thailand/ VSMU-12-BKK/2003	ADK22480	H5N1 A/duck/Shandong/093/2004	AAW72228
H5N1 A/partridge/Shantou/ 2886/2003	ACA47765	H5N1 A/duck/Viet Nam/CM-V7/ 2004	AAZ72954
H5N1 A/pheasant/Shantou/ 3535/2003	ACA47776	H5N1 A/duck/Viet Nam/TG-007A/ 2004	AAZ72941
H5N2 A/chicken/Taiwan/1209/2003	BAH79556	H5N1 A/duck/Viet Nam/TV-V2/2004	AAZ72953
H6N1 A/chicken/Taiwan/0706/03	ABD35800	H5N1 A/duck/Vietnam/7A/2004	ACC63273
H6N1 A/chicken/Taiwan/1203/03	ABD35801	H5N1 A/duck/Vietnam/942A/2004	ACC63284
H6N1 A/chukkar/Hong Kong/ CSW595/2003	BAJ18114	H5N1 A/duck/Yunnan/426/2004	ACA48172
H6N1 A/chukkar/Hong Kong/ SF126/2003	BAJ18098	H5N1 A/duck/Yunnan/485/2004	ACA48183
H6N1 A/chukkar/Hong Kong/ SF164/2003	BAJ18106	H5N1 A/duck/Yunnan/522/2004	ACA48194
H6N1 A/duck/Taiwan/A68/03	ABD35802	H5N1 A/golden mountain thrush/ Fujian/376/04	ABI33805
H6N1 A/duck/Taiwan/WB239/03	ABD35799	H5N1 A/goose/Guangdong/72/2004	ADG59501
H6N1 A/mallard/Jiangxi/227/2003	ADG43348	H5N1 A/little grebe/Thailand/Phichit- 01/2004	ABD48741
H6N1 A/mallard/Jiangxi/6845/2003	ADG43347	H5N1 A/magpie/Korea/Y:S-M1/2004	ACZ45475
H6N1 A/mallard/Jiangxi/7787/2003	ADG43346	H5N1 A/mallard/Guangxi/wt/2004	ABJ09544
H6N1 A/pigeon/Hong Kong/ WF47/2003	BAJ18090	H5N1 A/open-bill stork/Thailand/VSMU-20-AYA/2004	BAG80748
H6N2 A/duck/Eastern China/ 55/2003	AEF59472	H5N1 A/open-bill stork/Thailand/VSMU-9-BKK/2004	BAG80747
H6N2 A/duck/Eastern China/ 57/2003	AEF59473	H5N1 A/open-billed stork/Bangkok/ LBD0111F/04	ABO33638
H6N2 A/duck/Eastern China/ 59/2003	AEF59475	H5N1 A/open-billed stork/Bangkok/ LBD0511F/04	ABO33639
H6N2 A/duck/Shantou/1658/2003	ADG43412	H5N1 A/open-billed stork/ Nakhonsawan/ BBD0104F/ 2004	ABL67766
H6N2 A/duck/Shantou/1838/2003	ADG43411	H5N1 A/open-billed stork/ Nakhonsawan/ BBD0404F/ 2004	ABL67777
H6N2 A/duck/Shantou/2195/2003	ADG43410	H5N1 A/open-billed stork/ Suphanburi/ TSD0912F/2004	ABL67788
H6N2 A/duck/Shantou/2834/2003	ADG43409	H5N1 A/openbill stork/Thailand/ VSMU-4-NSN/2004	ADK22484
H6N2 A/duck/Shantou/3274/2003	ADG43406	H5N1 A/openbill stork/Thailand/ VSMU-5-NSN/2004	ADK22483
H6N2 A/duck/Shantou/3550/2003	ADG43404	H5N1 A/openbill stork/Thailand/ VSMU-6-BKK/2004	ADK22482
H6N2 A/duck/Shantou/3654/2003	ADG43403	H5N1 A/openbill stork/Thailand/ VSMU-8-BKK/2004	ADK22481
H6N2 A/duck/Shantou/481/2003	ADG43418	H5N1 A/peregrine falcon/HK/ D0028/2004	AAT73579
H6N2 A/duck/Shantou/487/2003	ADG43417	H5N1 A/pigeon/Thailand/KU-03/04	ABB43129
H6N2 A/duck/Shantou/689/2003	ADG43416	H5N1 A/Qa/Thailand/57/2004	AAT73545
H6N2 A/duck/Shantou/925/2003	ADG43413	H5N1 A/quail/Phathumthani/ NIAH2711/2004	BAG80740
H6N2 A/mallard/Jiangxi/7376/2003	ADG43402	H5N1 A/quail/Vietnam/36/04	AAW80710
H6N2 A/wild duck/Shantou/ 2853/2003	ADG43408	H5N1 A/quail/Vietnam/7B/2004	AEK65199
H6N2 A/wild duck/Shantou/ 3433/2003	ADG43405	H5N1 A/quail/Yogyakarta/BBVet- IX/2004	ABF01674
H6N2 A/wild duck/Shantou/ 853/2003	ADG43414	H5N1 A/quail/Yogyakarta/ UT1023/2004	ACR49135

H6N5 A/duck/Hunan/5613/2003	ADG43490	H5N1 A/silky chicken/Shantou/ 475/2004	ACA47809
H6N8 A/duck/Shantou/2954/2003	ADG43507	H5N1 A/slaty-backed gull/ Shandong/38/04	ABI33812
H7N3 A/chicken/Karachi/NARC- 23/2003	ACL11991	H5N1 A/swan/Guangxi/307/2004	AAX53570
H7N3 A/chicken/Karachi/NARC- 23/2003	ADI34004	H5N1 A/tree sparrow/Henan/1/2004	AAZ29574
H8N4 A/migratory duck/Hong Kong/ MP2553/2003	ABQ84737	H5N1 A/tree sparrow/Henan/2/2004	AAZ29575
H9N2 A/duck/Xuzhou/07/2003	ABG27050	H5N1 A/tree sparrow/Henan/3/2004	AAZ29576
H11 A/mallard/Xuyi/8/2004	ABF22672	H5N1 A/tree sparrow/Henan/4/2004	AAZ29577
H1N1 A/wild duck/Korea/SH60/2004	ADM26555	H5N1 A/wild duck/Guangdong/ 314/2004	AAX53569
H3N2 A/duck/Korea/JS49/2004	AEI30016	H5N1 A/wild duck/Shanghai/59/04	ABI33809
H3N8 A/duck/Beijing/40/04	ACC69082	H5N2 A/duck/Malaysia/F118-08- 04/2004	ABY81631
H4N6 A/duck/Shiga/8/2004	BAF93495	H5N2 A/duck/Malaysia/F189/2004	ACA61627
H4N6 A/mallard/ZhaLong/88/2004	ACI40921	H6N1 A/chicken/Taiwan/0114/04	ABD35803
H5N1 A/babbler/Fujian/320/04	ABI33804	H6N1 A/chicken/Taiwan/0305/04	ABD35804
H5N1 A/bird/Thailand/3.1/2004	AAT73546	H6N1 A/chicken/Taiwan/ch1006/04	ABD35806
H5N1 A/blackbird/Hunan/1/2004	ABI33810	H6N1 A/duck/Shantou/1275/2004	ADG43345
H5N1 A/chicken/Anhui/39/2004	ADG59502	H6N2 A/duck/Eastern China/ 29/2004	AEF59457
H5N1 A/chicken/Bangli Bali/BBPV6- 1/2004	ABF01679	H6N2 A/duck/Eastern China/ 31/2004	AEF59458
H5N1 A/chicken/Bangli Bali/BPPV6- 2/2004	ABF01680	H6N2 A/duck/Kingmen/E322/04	ABD35805
H5N1 A/chicken/East Kalimantan/ UT1035/2004	ACR49136	H6N2 A/duck/Shantou/171/2004	ADG43401
H5N1 A/chicken/Gansu/44/2004	ADG59478	H6N2 A/duck/Shantou/3667/2004	ADG43399
H5N1 A/chicken/Guangdong/174/04	AAT37560	H6N2 A/duck/Shantou/5104/2004	ADG43397
H5N1 A/chicken/Guangdong/178/04	AAW59395	H6N2 A/duck/Shantou/6847/2004	ADG43395
H5N1 A/chicken/Guangdong/191/04	AAW59387	H6N2 A/duck/Shantou/7880/2004	ADG43393
H5N1 A/chicken/Guangxi/12/2004	ABD14794	H6N2 A/duck/Shantou/887/2004	ADG43400
H5N1 A/chicken/Henan/01/2004	AAX53565	H6N2 A/mallard/Jiangxi/8264/2004	ADG43391
H5N1 A/chicken/Henan/12/2004	AAX53566	H6N2 A/wild duck/Shantou/ 4086/2004	ADG43398
H5N1 A/chicken/Henan/13/2004	AAX53567	H6N2 A/wild duck/Shantou/ 5769/2004	ADG43396
H5N1 A/chicken/Henan/16/2004	AAX53568	H6N2 A/wild duck/Shantou/ 7307/2004	ADG43394
H5N1 A/chicken/Henan/wu/2004	ABI96708	H6N2 A/wild duck/Shantou/ 7900/2004	ADG43392
2004 H5N1 A/chicken/Hubei/ 327/2004	AAT90829	H6N5 A/duck/Guangxi/1455/2004	ADG43489
H5N1 A/chicken/Hubei/489/2004	AAV48551	H6N5 A/duck/Taiwan/WB459/04	ABD35807
H5N1 A/chicken/Hunan/41/2004	ADG59500	H6N5 A/mallard/Jiangxi/8341/2004	ADG43488
H5N1 A/chicken/Jiangxi/25/2004	ADG59563	H6N5 A/mallard/Jiangxi/8346/2004	ADG43487
H5N1 A/chicken/Jilin/9/2004	AAT76157	H6N6 A/duck/Shantou/6233/2004	ADG43500
H5N1 A/chicken/Jilin/hk/2004	ABJ52560	H6N6 A/mallard/Jiangxi/413/2004	ADG43501
H5N1 A/chicken/Kalasin/ NIAH316/2004	BAG80738	H6N6 A/wild duck/Shantou/ 192/2004	ADG43502
H5N1 A/chicken/Kohn Kaen/ NIAH330/2004	BAG80739	H6N8 A/duck/Hunan/3748/2004	ADG43506
H5N1 A/chicken/Kulon Progo/BBVet-XII-2/2004	ABF01675	H6N8 A/mallard/Jiangxi/6285/2004	ADG43505

H5N1 A/chicken/Kyoto/3/2004	BAD89322	H7N3 A/chicken/Chakwal/NARC-148/2004	ACL12024
H5N1 A/chicken/NaraThiwat/NIAH1703/2004	BAG80741	H7N3 A/chicken/Chakwal/NARC-148/2004	ADI34007
H5N1 A/chicken/Oita/8/2004	BAD89312	H7N3 A/chicken/Karachi/NARC-100/2004	ACL12013
H5N1 A/chicken/Purwakarta/BBVet-IV/2004	ABF01678	H7N3 A/chicken/Karachi/NARC-100/2004	ADI34006
H5N1 A/chicken/Suphanburi/NIAH7540/2004	BAG80742	H9N2 A/chicken/Jiangsu/L1/2004	ACF76875
H5N1 A/chicken/Thailand/vsmu-3-BKK/2004	ABQ41360	H9N2 A/chicken/Korea/04116/2004	ADW26571
H5N1 A/chicken/Viet Nam/33/2004	AAT73553	H9N2 A/chicken/Korea/S21/2004	ACD37770
H5N1 A/chicken/Viet Nam/CT-018/2004	AAZ72946	H9N2 A/chicken/Korea/S21/2004	ACD37780
H5N1 A/chicken/Viet Nam/DT-015/2004	AAZ72945	H9N2 A/chicken/Tianjin/B1/2004	ACF76876
H5N1 A/chicken/Viet Nam/LD-080/2004	AAZ72952	H9N2 A/chicken/Uttar Pradesh/2543/2004	ABI53725
H5N1 A/chicken/Viet Nam/TN-025/2004	AAZ72940	H9N2 A/duck/Hubei/W1/2004	ABE28410
H5N1 A/chicken/Vietnam/10/2004	ABY51590	H9N8 A/chicken/Korea/04164/2004	ADW26572
H5N1 A/chicken/Vietnam/15/2004	ACA04639		

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

BSL-3	Labor der Biosicherheitsstufe 3
CPE	Zytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Copy DNA
HA	Hämagglutinin
HPAIV	Hochpathogenes aviäres Influenza-A-Virus
HAU	Hämagglutinierende Einheit
LPAIV	Niedrigpathogenes aviäres Influenza-A-Virus
MTZ	Mittlere Todeszeit
NA	Neuraminidase
NLS	Kernlokalisierungssignal
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
PA	Saures Polymerase-Protein
PB1	Basisches Polymerase-Protein 1
PB2	Basisches Polymerase-Protein 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
cRNA	Copy/komplementäre RNA
mRNA	Messenger RNA
vRNA	Virale RNA
vRNP	Viraler Ribonukleoprotein-Komplex
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
WT	Wildtyp

Vorträge und Poster

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurden zu folgenden Gelegenheiten als Vortrag oder Poster präsentiert.

Vorträge

***Czudai, V.;** Gabriel, G. and Klenk, H.-D.

Role of PB2 of Influenza A Virus (H5N1) polymerase in host specificity
2007 FluPol Consortium-Meeting, Marburg, Germany

***Czudai, V.;** Gabriel, G. and Klenk, H.-D.

Role of PB2 of Influenza A Virus (H5N1) polymerase in host specificity
2008 FluPol Consortium-Meeting, Madrid, Spain

***Czudai-Matwich, V.** and Klenk, H.-D.

Role of PB2 of Influenza A Virus (H5N1) polymerase in host specificity
2009 FluPol Consortium-Meeting, Barcelona, Spain

***Czudai-Matwich, V.** and Klenk, H.-D.

Role of two PB2 mutations on polymerase activity, host range and pathogenicity of influenza A virus (H5N1)
2009 FluPol Consortium-Meeting, London, United Kingdom

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Otte, A. and Klenk, H.-D.

Role of two PB2 mutations on polymerase activity, host range and pathogenicity of influenza A virus (H5N1)
2011 FluPharm Consortium-Meeting, Grenoble, France

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Otte, A. and Klenk, H.-D.

Pathogenicity of influenza A virus of subtype H5N1 to mice is increased by mutation PB2 S714R of the polymerase
2011 Annual Meeting of the German Society of Virology, Freiburg, Germany

Poster

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Ma, W.; Pleschka, S. and Klenk, H.-D.
Host range mutations in the polymerase of influenza A virus of subtype H5N1
2009 Annual Meeting of the German Society of Virology, Leipzig, Germany

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Ma, W.; Pleschka, S. and Klenk, H.-D.
Mutations in the polymerase of influenza A virus of subtype H5N1 mediate an
increased host range
2009 5th Orthomyxovirus-Meeting, Freiburg, Germany

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Ma, W.; Pleschka, S. and Klenk, H.-D.
Mutationen in der Polymerase von Influenza A Viren des Subtyps H5N1 vermitteln
einen erweiterten Wirtstropismus
2009 Meeting der Zoonose-Plattform des FluResearchNet

***Czudai-Matwich, V.;** Gabriel, G.; Ma, W.; Pleschka, S. and Klenk, H.-D.
Mutations in the polymerase of influenza A virus of subtype H5N1 mediate an
increased host range
2010 Meeting of the FluResearchNet-Consortium, Münster, Germany

* ___ *presenting author*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Betreuung anfertigen zu dürfen und seine fortwährende wissenschaftliche Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich mich für die Ermöglichung der Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen bedanken, die immer Quelle für Austausch und Anregung waren.

Dr. Gülsah Gabriel möchte ich für die Einarbeitung in die Welt der Influenza-Viren danken, für ihre technische und wissenschaftliche Unterstützung und ihre Diskussionsbereitschaft. Außerdem gilt ihr, zusammen mit Anna Otte, mein Dank für die Durchführung der Tierversuche am HPI und die Möglichkeit an diesen teilzunehmen.

Den Drs. Mikhail und Tatyana Matrosovich danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, Tipps und die Zurverfügungstellung der HTBE-Zellen.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine derzeitigen und früheren Laborkollegen der AGs Klenk, Maisner, Matrosovich und Garten, sowie meine unzähligen Praktikantinnen, die mir Zeit und Nerven geraubt haben – das Labor war und ist dank euch der beste Arbeitsplatz den ich mir vorstellen kann. Besonders bei Folker Schwalm möchte ich mich darüber hinaus für die Freundschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken (Kaffee? Kaffee!).

Dr. Markus Eickmann möchte ich an dieser Stelle für die Betreuung des BSL-3 Labors und die Unterstützung bei sicherheitsrelevanten Fragen danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung während und nach dem Studium, meiner Frau Ria für ihre Liebe und Aufmerksamkeit und natürlich meinen beiden Söhnen Hadrian und Gideon, die mir mit ihrer Neugier immer wieder aufs Neue zeigen, wie wichtig es ist, Fragen zu stellen und Antworten zu suchen.

Allen, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit nach Fehlern und obskuren Redewendungen zu durchforsten, auch an dieser Stelle nochmal ein herzliches Dankeschön.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Frankfurt waren die Damen und Herren:

Aßmus	Nover
Brändle	Osiewacz
Bereiter-Hahn	Plaßmann
Brüggemann	Pons
Egert	Prinzinger
Engels	Protsch von Zieten
Entian	Rheinlaender
Fasold	Rüterjans
Feierabend	Sandmann
Ferebee	Soppa
Gerhardt	Starzinski-Powitz
Gnatzy	Steiger
Göbel	Volkmandt
Griesinger	Wiltschko
Kahl	Wiltschko
Köninger	Winter
Kolbesen	Wittig
Kröger	Zimmermann
Löwer	Zizka
Ludwig-Müller	