

Genetische Charakterisierung deutscher Schweineinfluenzaviren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biologin Anja Philipps

geboren am 13.10.1981 in Gera

Jena, 31.08.2011

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Peter Wutzler (Jena)
2. Prof. Dr. rer. nat. Roland Zell (Jena)
3. Prof. Dr. Susanne Modrow (Regensburg)

Disputation am 23.04.2012

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungsverzeichnis	i
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1. Taxonomie und Nomenklatur	6
2.2. Morphologie und Aufbau der Influenza-A-Viren	9
2.3. Genomorganisation und kodierende Proteine	11
2.4. Infektionszyklus der Influenza-A-Viren	14
2.5. Genetische Variabilität der Influenza-A-Viren	17
2.6. Wirtsspektrum und zoonotisches Potential	18
I. Aviäre Influenza-A-Viren	18
II. Humane Influenza-A-Viren	19
III. Porzine Influenza-A-Viren	19
2.7. Virulenzfaktoren und pathogenitätsverändernde Mutationen	20
2.8. Matrixprotein 2 und der Einfluss von Amantadin	25
2.9. Genetische Analyse von Influenzaviren mittels der Illumina-Sequenzier-technologie	27
2.10. Reverse Genetik bei Influenza-A-Viren	30
2.11. Zielstellung	31
3. Material und Methoden	32
3.1. Materialien	32
3.1.1. Zellkulturen	32
3.1.2. Viren	33
3.1.3. Vektoren und Plasmide	35
3.1.4. Primer	36
3.1.5. Restriktionsendonukleasen	41
3.1.6. Chemikalien und Grundstoffe	42
3.1.7. Arbeitslösungen	43
3.1.7.1. Medien für Zellkulturen	43
3.1.7.2. Lösungen für Zellkulturen	43
3.1.7.3. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	43
3.1.8. Technische Ausstattung	44
3.2. Methoden	44
3.2.1. Sequenzierung mit CEQ8000 Genetic Analysis System	44
I. Virusvermehrung in MDCK-Zellen	44
II. Präparation der Gesamt-RNA aus virusinfizierten MDCK-Zellen	44
III. Reverse Transkription	45
IV. Amplifikation der Virussegmente mittels Polymerase-Kettenreaktion	45
V. Agarose-Gelelektrophorese	46
VI. DNA-Gelextraktion	46

VII.	Sequenzierreaktion und Fällung	47
3.2.2.	Sequenzierung mit der Illumina/Solexa-Technologie	48
I.	Virusaufreinigung mittels Plaque-Test	48
II.	Virusvermehrung, Ultrazentrifugation, RNA-Isolierung sowie Ethanolfällung	48
III.	Herstellung der cDNA-Bank	49
IV.	Sequenzierreaktion	53
V.	Auswertung der Reads/Contigs	53
3.2.3.	Auswertung der Sequenzdaten und Berechnung der Stammbäume	53
3.2.4.	Reverse Genetik	54
I.	Klonierung von Amplifikaten in pJET1.2	54
II.	Restriktion von DNA mit Typ II-Restriktionsenzymen	55
III.	Ligation und Transformation	55
IV.	Kolonie-PCR und Mini-Präparation zur Selektion der Transformanten	55
V.	Midipräparation von Plasmiden	56
VI.	Zielgerichtete Mutagenese <i>in vitro</i>	56
VII.	Transfektion von eukaryotischen Zellen	57
3.2.5.	Untersuchung ausgewählter rekombinanter Viren	58
I.	Passagierung in MDCK-Zellen	58
II.	Virustiterbestimmung und Wachstumskinetik mittels TCID ₅₀	58
III.	Plaque-Reduktionstest (Dosis-Wirkungs-Untersuchungen)	59
4.	Ergebnisse	60
4.1.	Statistische Auswertung der Illumina/Solexa-Sequenzierung	60
4.2.	Phylogenetische Analysen eurasisch porziner Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2	66
I.	Segment 1 – PB2	68
II.	Segment 2 – PB1	70
III.	Segment 3 – PA	73
IV.	Segment 4 – HA	75
V.	Segment 5 – NP	80
VI.	Segment 6 – NA	82
VII.	Segment 7 – M	87
VIII.	Segment 8 – NS	89
4.3.	Reverse Genetik-Studien bei porzinen Influenza-A-Viren	92
4.3.1.	Herstellung und Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter Schweine-Influenzaviren	92
I.	Segment 1 – PB2	92
II.	Segment 2 – PB1	95
III.	Segment 3 – PA	95
IV.	Segment 4, 6, 7 und 8 – HA, NA, M und NS	98
V.	Segment 5 – NP	98

VI. Polymeraseaktivitätstest	101
4.3.2. Synthese rekombinanter Viren bestehend aus dem genetischen Material von A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) und A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	102
4.3.3. Analyse ausgewählter Basensubstitutionen im M-Segment der H1N1-Viren A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01	103
I. Generierung und Analyse der AS31-Serin-Mutanten	103
II. Analyse weiterer Mutationen im M-Segment von A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01	109
5. Diskussion	112
5.1. Illumina-Sequenzierung – eine schnellere Alternative zur Genomcharakterisierung von Influenzaviren	112
5.2. Evolution der europäischen Schweineinfluenzaviren	118
5.2.1. Entstehung des porzinen <i>avian-like</i> H1N1-Subtypes	119
5.2.2. Entstehung der porzinen <i>human-like</i> H3N2-Linie	119
5.2.3. Entstehung der porzinen <i>human-like</i> H1N2-Linie	120
5.2.4. Hinweise auf Transspeziesinfektionen	121
5.2.5. Nachweis von Reassortierungen	122
5.2.6. Segmentspezifische Auswertung	124
I. PB2	124
II. PB1-F2	124
III. PA	126
IV. HA	126
V. NP	130
VI. NA	130
VII. M	132
VIII. NS	133
5.3. Anwendung der reversen Genetik zur Identifizierung Resistenzverursachender Mutationen	134
5.3.1. Herstellung und Etablierung eines porzinen revers-genetischen Systems	135
5.3.2. Alternative Serin-Codons der Aminosäure 31 im M2	136
5.3.3. Einfluss der Aminosäure Isoleucin an Position 26 und 27 im M2 bei Amantadin-Behandlung	140
5.3.4. Bedeutung der Aminosäure 77 des M2 bei der Amantadin-Resistenzentstehung	140
6. Literaturverzeichnis	142
7. Anhang	161
Selbstständigkeitserklärung	196
Lebenslauf	197
Veröffentlichungen	198
Danksagung	199

0. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bs	<i>bootstraps</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
DTT	Dithiothreitol
EMEM	<i>Eagle Minimum Essential Medium</i>
et al.	und andere (lateinisch: et alteri)
G+I	Gamma-Verteilung mit invarianten Stellen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMK	<i>Green Monkey Kidney</i>
GTR	<i>General Time Reversible</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>Human Embryonal Kidney</i>
IC ₅₀	50 %-ige Hemmkonzentration
kD	Kilodalton
M	molar
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
min	Minute
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NA	Neuraminidase
NCR	<i>Non Coding Region</i> (nicht-kodierende Region)
NEP	<i>Nuclear Export Protein</i>
NNI	<i>Nearest Neighbor Interchange</i>

NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
NTR	<i>Non Translated Region</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (offener Leserahmen)
p.i.	<i>post infection</i> (nach Infektion)
PA	<i>Polymerase Acid Protein</i>
PB1	<i>Polymerase Basic Protein 1</i>
PB2	<i>Polymerase Basic Protein 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pfu	<i>plaque forming units</i> (Plaques-bildende Einheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Rt	Raumtemperatur
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀	<i>50 % Tissue Culture Infectious Dose</i> (Virusdosis, bei der 50 % der Testeinheiten infiziert sind)
U	<i>Units</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel
zpE	zytopathischer Effekt

DNA-Basen:

A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1. Zusammenfassung

Die Influenza-A-Viren gehören der Familie der *Orthomyxoviridae* an und verursachen beim Menschen die echte Grippe – eine Erkrankung der Atemwege mit potentieller Beteiligung der Blutgefäße, des zentralen Nervensystems und des Herzens. Neben den Menschen sind hauptsächlich Vögel und Schweine die natürlichen Wirte der Viren. Dem Schwein fällt dabei eine gesonderte Rolle zu. Auf dem respiratorischen Epithel der Paarhufer werden neben den Rezeptoren für porcine Influenzaviren auch Rezeptoren für humane und aviäre Viren exprimiert. Damit sind die Voraussetzungen für simultane Infektionen mit Influenzaviren verschiedener Wirtsspezifität gegeben. Folglich können Vogel- und humane Viren auf das Schwein übertragen werden und Reassortanten mit pandemischem Potential entstehen. Die Surveillance und genetische Charakterisierung porciner Viren ist somit auch aus humanmedizinischer Sicht von großer Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden für phylogenetische Analysen 59 europäisch porcine Influenza-A-Viren aus den Jahren 2004-2007 genetisch charakterisiert. Die Sequenzierung der Viren erfolgte zum einen über die bereits etablierte *cycle sequencing*-Methode, zum anderen über die *next generation sequencing*-Technologie von Illumina. Letzteres Verfahren zeichnet sich durch die Bildung von Clustern aus, welche über die sogenannte *bridge amplification* generiert werden. Die Sequenzierreaktion erfolgt über die *sequencing by synthesis*-Technologie bei der reversible Terminatoren mit entfernbaren Farbstoffen eingesetzt werden. Pro Sequenzierlauf wurden bis zu 30 Millionen Reads mit einer Länge von 76 bp detektiert. Etwa 87 % davon konnten anhand der Indexierung einem Virusisolat zugeordnet werden. Diese *assigned reads* (13-26 mio) enthielten sowohl virusspezifische als auch nicht-virusspezifische Sequenzen. In den drei separat durchgeführten Läufen, in denen 7-10 Viren gleichzeitig sequenziert wurden, stieg die Anzahl an virusspezifischen Reads von 5,8 % auf 26,9 % an. Mittels der *de-novo*-Assemblierung mit ABySS (*Assembly By Short Sequences*) und der Eland-basierenden Referenz-Assemblierung konnten mehr als 99 % des viralen Genoms identifiziert und damit eine 22,7- bis 14.650fache Abdeckung des 13,6 kb großen Virusgenoms erreicht werden. Die als nicht virusspezifisch identifizierten Reads (73,1 bis 94,2 %) zeigten Sequenzähnlichkeiten zu *Canis familiaris*, *Odocoileus virginianus*, *Mus musculus* und *Schistosoma japonicum*. Der Großteil der nicht virusspezifischen RNA (77 %) war ribosomalen Ursprungs. Zusammenfassend bietet die NGS-Technologie von Illumina folgende Vorteile gegenüber der *cycle sequencing*-Methode: einen dreifach höheren Durchsatz an zu entschlüsselnden Viren durch die gleichzeitige Sequenzierung von 7 bis 10 Virusisolaten (Multiplex-Sequenzierung) sowie eine deutlich höhere statistische Absicherung der Sequenzabfolge.

Nachdem die Sequenzdaten der 59 porcinen Influenzaviren vorlagen, wurden die Daten weiterer 73 in der AG Zell sequenzierten Schweineviren sowie die in der GenBank frei verfügbaren Sequenzen humaner, aviärer, porciner und equiner Virusisolate den segmentspezifischen Alignments beigefügt. Die berechneten Phylogramme ermöglichen einen weiteren Einblick in die Evolution der europäischen Schweineviren. Die Daten

zeigen, dass in Europa, unabhängig zu den nordamerikanischen Schweineviren, drei genetische Linien entstanden sind. Die *avian-like* H1N1-Viren stammen von einem eurasischen H1N1-Vogelvirus ab, welches sich in europäischen Schweinen etablierte und die bis dato zirkulierenden *classical swine*-Viren verdrängte. Durch eine Reassortierung der inzwischen weitverbreiteten porzinen *avian-like* H1N1-Viren mit einem humanen H3N2-Virus (A/Port Chalmers/1/73-like) entstand die porzine *human-like* H3N2-Linie. Ein weiterer in europäischen Schweinen zirkulierender Subtyp entstand Anfang der 1990er Jahre durch Reassortierung von porzinen H3N2-Viren mit humanen H1N1-Stämmen. Viren dieser Linie werden als *human-like* H1N2 bezeichnet. Neben der Darstellung der genetischen Linien weisen die Phylogramme auch auf eine kontinuierliche Entwicklung innerhalb der europäischen Schweineviren hin, welche durch die Akkumulation von Mutationen verursacht wird. Reassortierungsereignisse konnten in allen acht Genomsegmenten beobachtet werden. Desweiteren sind den Daten folgende wirtsübergreifende Infektionen zu entnehmen: Schwein↔Mensch, Vogel→Mensch und Schwein→Vogel. Diese Beobachtungen lassen zusammen mit Gen-Drift und Gen-Shift auf ein dynamisches Geschehen innerhalb der Influenza-A-Viren schließen. Zu den phylogenetischen Analysen wurden die Aminosäuresequenzen der Segmente auf auffällige Substitutionen, virulenzbeeinflussende und resistenzvermittelnde Mutationen hin untersucht und deren Clusterung im Stammbaum überprüft. So treten z.B. die Substitutionen L48Q (NP) und S31N (M2) monophyletisch auf. Letztere Mutation bewirkt zudem die Ausprägung einer Resistenz gegenüber dem Ionenkanalblocker Amantadin. Die PB1-F2-Sequenzen wurden auf Trunkierungen geprüft. Neben den bereits postulierten PB1-F2-Varianten (8-90 AS lang) konnte erstmalig ein Stopcodon nach 101 AS detektiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden zwei Plasmidsätze für die Generierung rekombinanter porziner H1N1-Viren mittels reverser Genetik hergestellt. Basierend auf dem von Hoffmann eingeführten 8-Plasmid-System konnten Virusrekombinanten aus dem genetischen Material der H1N1-Viren A/sw/Potsdam/15/81, A/sw/Belzig/2/01 und A/WSN/33 generiert werden. Zunächst erfolgte die Herstellung zweier Virusmutanten, die an Position 31 im Matrixprotein 2 für die alternativen Serin-Codons TCT und TCA kodieren. Nach einer 20-fachen Passagierung war keine Veränderung in den Serin-Codons festzustellen. Anschließend wurde deren Stabilität während einer Amantadin-Behandlung untersucht. Dabei konnte *in vitro* die Entstehung resistenzvermittelnder Mutationen im M2 nachgestellt werden. Neben den bereits publizierten Resistenzmutationen V27A, A30T, S31N und G34E wurden folgende bisher unbekannte resistenzvermittelnde AS-Substitutionen identifiziert: A30E und S31F. Unabhängig zu den Serin-Mutanten erfolgte die Herstellung Amantadin-sensitiver Viren, welche anstelle von Leucin bzw. Valin für die AS Isoleucin an Position 26 bzw. 27 kodieren. Die ermittelten IC₅₀-Werte dieser Virusmutanten (0,08 und 0,34 µg/ml) beweisen, dass die L26I- und V27I-Substitutionen keinen Einfluss auf die Suszeptibilität der Viren gegenüber Amantadin ausüben. Gleiches gilt für die Mutation R77Q, welche in Schweineviren stets mit der resistenzvermittelnden Substitution S31N auftritt.

Summary

Influenza A viruses are members of the family *Orthomyxoviridae* and cause a severe infectious disease of the respiratory tract with potential involvement of the blood vessels, the central nervous system and the heart. The viruses are able to induce stable infection chains in humans, birds and in pigs. The latter take a special role among the hosts, because they express receptors for both human and avian viruses on their respiratory epithelia. After an infection with more than one virus subtype, the conditions for reassortment and emergence of new genetic lines are given. Therefore, the surveillance and genetic characterization of porcine viruses are of great importance.

To understand the evolution of the European swine influenza viruses, 59 strains isolated in Germany and Austria were completely sequenced and phylogenetically analyzed. The sequencing of the viruses was done by established cycle-sequencing protocols and the next-generation sequencing technology by Illumina. The latter method is characterized by the formation of millions of clusters generated by bridge amplification. The templates are sequenced by using a four-color DNA sequencing-by-synthesis technology that employs reversible terminators with removable fluorescent dyes. Up to 30 million reads with a length of 76 bp were obtained per run. Approximately 87 % of these reads could be assigned to an indexed virus isolate. These assigned reads (13-26 million) contained both virus specific and non-virus specific reads. In three separate runs in which 7-10 virus strains were sequenced simultaneously, the number of virus specific reads increased from 5.8 % to 26.9 %. By using the *de-novo* assembler software ABySS (*Assembly By Short Sequences*) and the Eland-based reference assembly more than 99 % of the viral genome could be identified corresponding to a 22.7-14,650fold coverage of the genome. The non-virus specific reads showed sequence similarities to *Canis familiaris*, *Odocoileus virginianus*, *Mus musculus* and *Schistosoma japonicum*. The majority of contaminating RNA (77%) was of ribosomal origin. Compared to the cycle-sequencing method, the NGS technology by Illumina offers the following advantages: a higher throughput of high-quality sequences and a significant time saving based on the multiplex sequencing of 7-10 virus strains.

For the phylogenetic analysis of the 59 sequenced virus isolates additional 73 European swine viruses (sequenced by the study group Zell) as well as sequence data of human, avian and other porcine viruses like *classical swine* and triple reassortants retrieved from the GenBank were attached to the segment specific alignments. The phylogenetic trees provide new insights into the evolution of the European swine viruses. The data show that, independently of the North American swine viruses, three genetic lines evolved in Europe. The *avian-like* H1N1 viruses derived from an Eurasian avian H1N1 virus, which established itself in European pigs and displaced the hitherto circulating *classical swine*

viruses. By reassortment of the widespread porcine *avian-like* H1N1 viruses with a human H3N2 virus (A/Port Chalmers/1/73-like) the porcine *human-like* H3N2 lineage was generated. A further subtype circulating in European pigs emerged in the early 1990s through reassortment of porcine H3N2 viruses with human H1N1 strains. Viruses of this novel H1N2 lineage are called *human-like*. The phylogenetic trees show not only the genetic lines but also indicate a continuous development within the European swine viruses caused by an accumulation of mutations. In addition, reassortment events could be observed in all eight genome segments. Furthermore, the following transspecies infections were proved: pig↔human, bird→human and pig→bird. These observations together with genetic drift and genetic shift suggest a dynamic process within the influenza A viruses. To the phylogenetic analysis, the amino acid sequences were screened to salient substitutions, published virulence factors and resistance mutations. For example, the conspicuous substitution S31N (M2) but also L48Q (NP) were monophyletic. The former mutation results in a resistance to the ion channel blocker amantadine. By examination the PB1-F2 sequences a 101 aa long protein could be detected for the first time.

In the third part of this study, two plasmid-sets for generating recombinant porcine H1N1 viruses were constructed by reverse genetics. Based on the 8-plasmid-system by Hoffmann virus recombinants composed of the genetic material of A/WSN/33 (H1N1) and A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) or A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) could be synthesized and analyzed. Firstly, two virus mutants with two alternative serine codons (TCT and TCA) at position 31 of the matrix protein 2 were generated. After examination of growth kinetics and codon stability, a 20fold passaging of the mutants under amantadine pressure was performed. Meanwhile, the emergence of resistance mutations within M2 could be re-enacted *in vitro*. In addition to the published substitutions V27A, A30T, S31N and G34E two previously unknown resistance mutations were identified: A30E and S31F. Regardless of the serine mutants, amantadine sensitive viruses, which encode instead of leucine or valine for isoleucine at position 26 and 27, were generated. The IC₅₀ values of these mutants (0.08 and 0.34 µg/ml) prove that the L26I and V27I substitutions have no influence on the susceptibility of the viruses against amantadine. The same applies for the R77Q mutation, which always occurs in porcine viruses carrying the resistance-mediating S31N substitution.

2. Einleitung

Die durch die Influenzaviren verursachte *echte Grippe* zählt zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten des Menschen verbunden mit hoher Morbidität, Mortalität und hohen volkswirtschaftlichen Kosten. Die akute, hochfieberhafte Erkrankung der Atemwege wird oft mit dem banalen grippalen Infekt verwechselt. Daher werden von der Öffentlichkeit die Folgen dieser Virusinfektion stark unterschätzt, Schutzimpfungen nicht angenommen und die Eindämmung erschwert. Es ist kaum bekannt, dass die Grippe Infektionskrankheiten wie AIDS oder die Virushepatitiden in Morbidität und Mortalität übertrifft (Lange und Vogel, 2004). Ein weiterer Beleg für die Gefährlichkeit der Influenza zeigt folgender Vergleich: während im Jahr 2002/2003 weltweit 800 Menschen der Lungenkrankheit SARS zum Opfer fielen, wurden allein in Deutschland mehrere tausend Todesfälle durch die saisonale Grippeepidemie registriert (Lange und Vogel, 2004). Aufgrund ihrer hohen genetischen Variabilität besitzen diese Viren die Fähigkeit, jederzeit Massenerkrankungen mit hoher Letalität zu verursachen und erschweren es den Menschen, Vorhersagen über mögliche Epidemien und Pandemien sowie deren Auswirkungen zu treffen.

Die bisher älteste Überlieferung Grippe-ähnlicher Symptome ist in den Schriften des Hippokrates von Kos (5. Jhd. v. Chr.) zu finden. In seinen Werken „επιδημία - Epidemien“ verglich er Krankheitsfälle miteinander, gruppierte diese nach Ähnlichkeiten und prägte gleichzeitig den Begriff der „Epidemie“ (επι-*epi*: „über“; δῆμος-*demos*: „Volk“). Im Buch VI wird der Husten von Perinthos, einer kleinen Hafenstadt in Thrakien (Türkei) beschrieben (Martin und Martin-Granel, 2006). Dieser begann zur Wintersonnenwende und wurde von mehreren Symptomen wie Halsentzündung, Muskelschmerzen, belegte Stimme, erschwertes Atmen, Schluckbeschwerden und Beinlähmung begleitet. Medizinhistoriker vermuten hinter der Symptomatik des Hustens von Perinthos Infektionskrankheiten wie die Influenza oder die Diphtherie (Martin und Martin-Granel, 2006). Andere Erkrankungen wie etwa das Dengue-Fieber oder die Poliomyelitis wurden zwar auch mit dem Husten von Perinthos in Verbindung gebracht (Martin und Martin-Granel, 2006), sind aber aufgrund des zeitlichen Auftretens der Symptome als Ursache eher unwahrscheinlich. Aus dem Jahre 1493 wird berichtet, dass die Ureinwohner der Insel Hispaniola vor der amerikanischen Küste von einer Epidemie heimgesucht wurden, welche möglicherweise durch die Schweine von Kolumbus' Schiffen verursacht wurde (Dobson, 2009). Die erste aufgezeichnete Influenza-Pandemie mit Ursprung in Russland und einer schnellen Ausbreitung nach Afrika, Asien und Europa trat 1580 auf (Potter, 2001). Allein in Rom wurden 8000 Tote registriert (Beveridge, 1991). Nach einem weiteren Ausbruch der Grippe Mitte des 18. Jahrhunderts übernahmen die Engländer den von den Italienern

eingeführten Begriff Influenza (www.historyofinfluenza.com). Dieser leitet sich von der spät-lateinischen Bezeichnung *influentia coeli* („himmlischer Einfluss“) ab. Die wohl bekannteste Influenza-Pandemie der Geschichte ist die „Spanische Grippe“ von 1918-1919. Der Ursprung dieser Pandemie konnte bis heute noch nicht identifiziert werden. Die ersten Ausbrüche wurden fast gleichzeitig in mehreren Regionen der USA dokumentiert (Detroit, South Carolina, Kansas) (Potter CW, 2001). Aufgrund der Geschehnisse des 1. Weltkrieges gelangte das Virus durch amerikanische Truppen nach Europa und breitete sich innerhalb weniger Wochen über das gesamte europäische Festland bis nach Russland und Afrika aus. Aus diesem zirkulierenden Virusstamm entstand Ende August 1918 eine hochvirulente Form, welche bereits 48 Stunden nach Ausbruch der Krankheit zum Tod führte. Ein typisches Symptom war die sogenannte „heliotrope Zyanose“, bei der die Patienten aufgrund des Sauerstoffmangels eine blaue bis schwarze Färbung annahmen („violetter Tod“) (Dobson, 2009). Letztendlich wurden ~ 50 % der Weltbevölkerung infiziert und insgesamt 40-50 Millionen Todesopfer waren zu beklagen (Potter, 2001). Mit dem Ausbruch der „Asiatischen Grippe“ 1957-1958 konnte erstmalig ein neuer Virussubtyp (H2N2) entdeckt werden (Chu et al., 1957). Den pandemischen Viren der „Hongkong-Grippe“ (H3N2) von 1968-1969, ebenfalls durch Reassortierung humaner und aviärer Viren entstanden, fielen weltweit ca. 1 Million Menschen zum Opfer (Dobson, 2009). Aus Angst vor einer neuen Form der Schweinegrippe ließen sich 1976 circa 50.000 Menschen in den USA impfen. Der gefürchtete Ausbruch blieb aus, jedoch verursachte der Impfstoff bei 500 Impfungen schmerzhaftes Lähmungerscheinen, 25 Personen verstarben an den Folgeerscheinungen der Vakzinierung (Dobson, 2009). Im Jahre 1997 wurden die ersten Fälle von H5N1-Infektionen beim Menschen dokumentiert. Bis heute ist die Zahl auf 522 Infizierte und 309 Tote angestiegen (Stand 25.02.2011; WHO). 2009 sorgte der Ausbruch der „Schweinegrippe“ mit mehreren Millionen Infizierten und ca. 16.000 Todesopfern weltweit für großes Aufsehen (WHO). Diese neue Virusvariante vom Subtyp H1N1 wies sowohl Segmente der *classical swine*-Viren als auch die der eurasisch porzinen und nordamerikanisch aviären Viren auf. Inzwischen (Saison 2010/2011) ist das pandemische A/H1N1v-Virus neben den saisonalen Influenza-A- und -B-Viren noch immer in der Weltbevölkerung nachweisbar.

2.1. Taxonomie und Nomenklatur

Die Influenza-A-Viren werden der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet. Laut ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) gehören vier weitere Genera dieser Virusfamilie an. Dazu zählen die Influenza-B- und -C-Viren, das Isavirus sowie das Thogotovirus. Letzteres Genus enthält die Spezies Dhorivirus und Thogotovirus. In Tabelle 1 sind die Charakteristiken der zu den *Orthomyxoviridae* gehörenden Vertreter zusammengefasst. Allen gemeinsam ist ein segmentiertes negativpolarisiertes RNA-

Genom in der Größenordnung von 10.000 bis 14.600 Nukleotiden (nt) (Modrow et al., 2010; ICTVdB - The Universal Virus Database Version4). Desweiteren weisen die Viren genusspezifische terminale Sequenzen von 11-14 nt auf, welche als Signalsequenzen für die Initiation der Transkription und Replikation dienen. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist die durch das interferoninduzierte Mx-Protein inhibierte Virusvermehrung (Modrow et al., 2010). Basierend auf der Virionenstruktur, dem Vorhandensein einzigartiger terminaler Sequenzen sowie phylogenetischer Analysen postulieren Presti et al. (2009) das Quaranfil-, Johnston-Atoll- sowie das Lake-Chad-Virus als neues Genus in die Familie der *Orthomyxoviridae* aufzunehmen.

Eine Differenzierung der Influenzaviren (A, B und C) ist anhand der antigenischen Unterschiede im Nukleo- und Matrixprotein möglich (Palese und Shaw, 2006). Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, unterscheiden sich die Influenza-A- und -B-Viren durch das Vorhandensein von 8 Genomsegmenten von den Typ-C-Viren. Letztere haben die HA- und NA-Eigenschaften in einem trimeren Oberflächenglykoprotein – dem Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein (HEF) vereint. Innerhalb der Typ-A-Viren weisen die Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase eine so hohe Variabilität auf, dass die Viren in Subtypen unterteilt werden. Derzeit sind 16 verschiedene HA- (1-16) und 9 NA- (1-9) Varianten bekannt (Kawaoka et al., 1990; Webster et al., 1992; Fouchier et al., 2005, Hinshaw et al., 1981, 1982, 1985). Während all diese Virussubtypen bei Vögeln vorzufinden sind, konnten bisher folgende beim Menschen isoliert werden: die saisonal nachgewiesenen Subtypen H1N1, H1N2, H2N2 und H3N2 sowie die durch Zoonothronose entstandenen Subtypen H5N1, H7N7 und H9N2 (Lange und Vogel, 2004; Fouchier et al., 2004; Peiris et al., 1999; Horimoto und Kawaoka, 2001).

Die Namensgebung der Influenzaviren erfolgt nach einer von der WHO festgelegten Nomenklatur (1980) (Lange und Vogel, 2004). In Abbildung 1 ist diese am Beispiel von B/Beijing/184/93 und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) dargestellt. Anhand der Virusbezeichnung können die Virusgattung (A, B oder C), die Wirtsspezies, der Ort und das Jahr der Isolation abgelesen werden. Handelt es sich um Influenza-A-Viren wird der Subtyp in Klammern hinzugefügt.

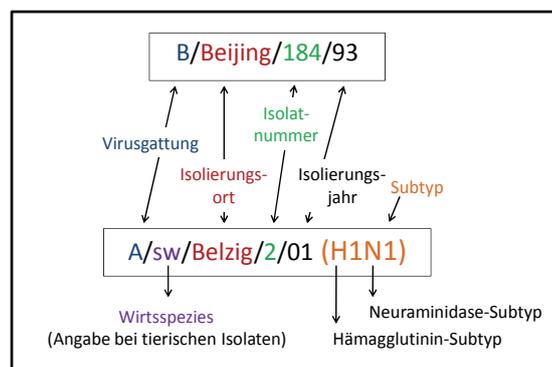


Abb. 1: Nomenklatur der Influenzaviren (verändert nach Lange und Vogel, 2004)

Tab. 1: Charakteristiken der zu den *Orthomyxoviridae* gehörenden Genera

Genus	Spezies	Vorkommen	Wirt	Erkrankung	Genom	Merkmale
Influenzavirus A	Influenza-A-Virus (FLUAV)	weltweit	Mensch Säuger (Pferd, Schwein) Vögel	Akute respiratorische Erkrankung mit Fieber Infektion des Respirationstraktes (↑ Morbidität, ↓ Mortalität) Subklinisch (Wildvögel), systemische Infektion bis zu 100 % Mortalität bei hochvirulenten Varianten	~13.600 nt	- 8 Genomsegmente - Oberflächenglykoproteine: Hämagglutinin (HA) Neuraminidase (NA) - Subtypen: 16 HA, 9 NA - Genuspezifische 5'- und 3'-Sequenzen
Influenzavirus B	Influenza-B-Virus (FLUBV)	weltweit	Mensch (Robbe)	Respiratorische Erkrankung Respiratorische Symptomatik	~14.600 nt	- 8 Genomsegmente - Oberflächenglykoproteine: Hämagglutinin (HA) Neuraminidase (NA) - Genuspezifische 5'- und 3'-Sequenzen
Influenzavirus C	Influenza-C-Virus (FLUCV)	weltweit	Mensch (Schwein)	Milde/subklinische Erkrankung	~12.900 nt	- 7 Genomsegmente - Oberflächenglykoprotein: HEF = Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein - Genuspezifische 5'- und 3'-Sequenzen
Isavirus	Infectious Salmon Anemia Virus	Nordeuropa + Nordamerika (Fischzucht) Chile	Lachsarten Übertragung über Fischläuse möglich	Blutarmut (Leukopenie, Aszites, hämorrhagische Lebernekrose)	14.500 nt	- 8 Genomsegmente - Oberflächenglykoprotein: Hämagglutininesterase - Genuspezifische 5'- und 3'-Sequenzen
Thogotovirus	Thogotovirus	Afrika, Asien, Südeuropa	über Zecken auf Wirbeltiere	Fiebrige Erkrankungen bei Rindern, Schafen, Ziegen: Aborte Mensch: neurologische Symptome	10.000 nt	- 6 bzw. 7 Genomsegmente - Oberflächenglykoprotein - Genuspezifische 5'- und 3'-Sequenzen
	Dhorivius				10.000 nt	

Modrow et al., 2010

Kulshreshtha et al., 2010

Clouthier et al., 2002

Cipriano, 2002

ICTVdB-The Universal Virus Database Version4

2.2. Morphologie und Aufbau der Influenza-A-Viren

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen war die Darstellung und Charakterisierung der membranumhüllten Viruspartikel möglich. Wie die Abbildung 2 zeigt, sind die Viren in Form und Größe sehr unterschiedlich (pleomorph). Während morphologische Untersuchungen an Laborstämmen ergaben, dass diese ausschließlich sphärische Viruspartikel mit einem Durchmesser von ~ 100 nm produzieren, konnten hauptsächlich filamentöse Virionen im unteren Respirationstrakt infizierter Menschen nachgewiesen werden (Chu et al., 1949; Kilbourne und Murphy, 1960). Ein weiterer Beleg für die filamentöse Form *in vivo* lieferten Analysen des pandemischen A/H1N1v von 2009. Aus dem Lungengewebe eines an der „Schweingrippe“ Verstorbenen konnten filamentöse Viruspartikel nachgewiesen werden (Nakajima et al., 2010). Auch nach mehrfacher Passagierung in Zellkultur behielten die Viren ihre Fähigkeit zur Bildung länglicher Formen bei (Itoh et al., 2009; Neumann et al., 2009). Eine Vermehrung filamentöser Viren im Hühnerei führte jedoch zum Verlust jener Morphologie (Choppin et al., 1960). Dies würde die sphärische Form der meisten Laborstämme (A/WSN/33 (H1N1) und A/PR/8/34 (H1N1)), welche über viele Passagen im Ei vermehrt wurden, erklären. Es ist anzunehmen, dass eine Infektion mit filamentösen Viren sowohl längliche als auch sphärische Virionen hervorbringt (Rossmann und Lamb, 2011). Der Aufbau der Influenza-A-Viren ist anhand eines sphärischen Viruspartikels in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

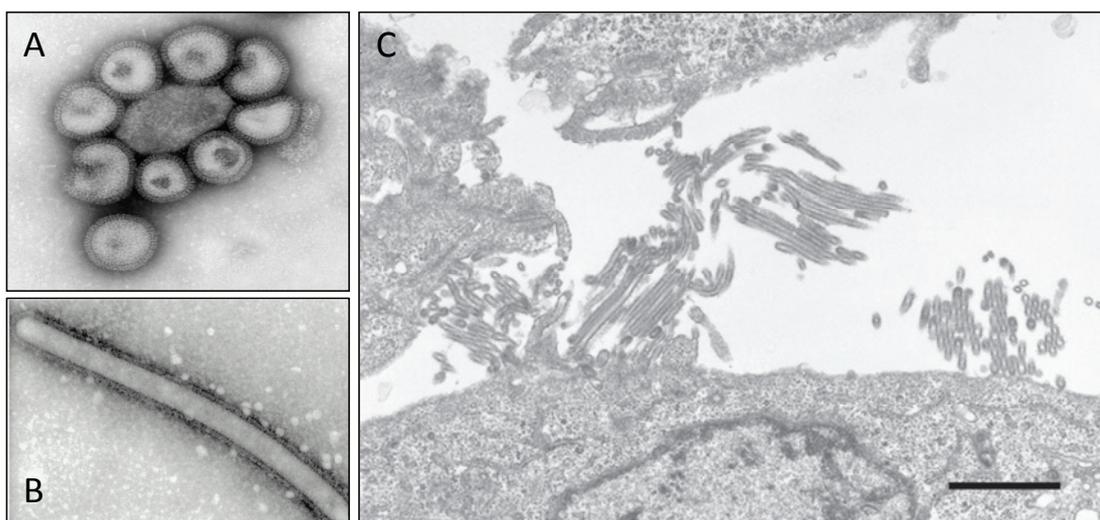


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Influenza-A-Viren; **A:** sphärische Virionen (<http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp>); **B:** filamentöses Viruspartikel (Roberts und Compans, 1998); **C:** filamentöse Virionen im Längs- und Querschnitt des pandemischen A/H1N1v/2009-Virus (Neumann et al., 2009)

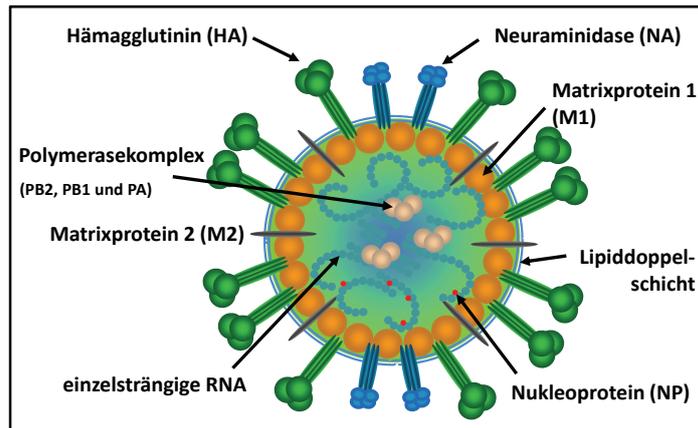


Abb. 3: Aufbau eines Influenza-A-Virus (modifiziert nach www.historyofinfluenza.com)

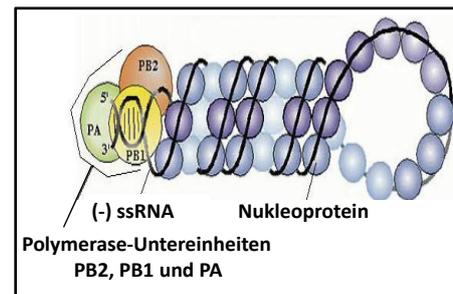


Abb. 4: Detaillierte Darstellung des Influenza-A-Virus-Ribonukleoproteinkomplexes (RNP) (Körner, 2010)

Die Virushülle stammt von der infizierten Wirtszelle und besteht somit aus einer Lipiddoppelschicht und den über hydrophobe Aminosäurereste verankerten viralen Glykoproteinen HA und NA. Das Hämagglutinin, ein Homotrimer, ist für die Adsorption des Viruspartikels an die Wirtszelle und für die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran unentbehrlich. Die in einer geringeren Menge vorliegende Neuraminidase ist ein homotetrameres Glykoprotein und bewirkt durch die hydrolytische Spaltung von Sialinsäureresten und der damit verbundenen Rezeptorzerstörung die Ablösung neu gebildeter Viruspartikel von der Wirtszelle. Die Virushülle ist zusätzlich von 20-60 M2-Proteinen durchsetzt. Diese Homotetramere fungieren als Ionenkanäle und ermöglichen die Ansäuerung des Viruspartikels während der Infektionsphase. Das Matrixprotein M1, welches die Virushülle von innen auskleidet, interagiert sowohl mit den Glykoproteinen HA, NA und M2 als auch mit den viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs). Ein RNP setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: eins der acht RNA-Segmente, die über das gesamte Segment assoziierten Nukleoproteine (NP) sowie den Proteinen des Polymerasekomplexes (PB2, PB1 und PA) (Abbildung 4). Aktuelle Studien zeigten, dass sowohl sphärische als auch filamentöse Viruspartikel nur eine Kopie des viralen Genoms folglich acht vRNP-Komplexe enthielten (Calder et al., 2010; Rossmann et al., 2010). Das NP ist dabei sequenzunabhängig mit dem Phosphat-Zucker-Rückgrat der vRNAs assoziiert. Jedes NP-Monomer deckt einen Abschnitt von ca. 20 nt ab (Modrow et al., 2010). In nur sehr geringen Mengen ist das Nichtstrukturprotein NS2 vorhanden, welches für den Transport der vRNP-Komplexe aus dem Kern in das Zytoplasma verantwortlich ist (NEP = *nuclear export protein*).

2.3. Genomorganisation und kodierende Proteine

Das Genom der Influenza-A-Viren ist auf acht einzelsträngigen negativpolarisierten RNA-Segmenten verschlüsselt. Die vRNAs setzen sich aus kodierenden und nichtkodierenden Bereichen (*non coding regions* - NCR) zusammen (Abb. 5). Zusätzlich werden die NCR in Influenza-A-hochkonservierte (13 [5'-Ende] bzw. 12 [3'-Ende] Nukleotide) und segment-spezifische (8-45 nt) Bereiche unterschieden (Desselberger et al., 1980).

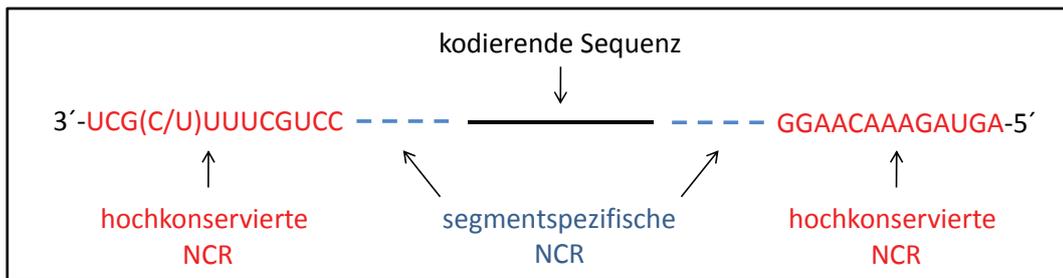


Abb. 5: Promotorregion der vRNAs der Influenza-A-Viren bestehend aus hochkonservierten und segmentspezifischen nichtkodierenden Regionen (NCR)

Die 5'- und 3'-Enden der Segmente weisen zum Teil komplementäre Sequenzen auf, wodurch Doppelstränge ausgebildet und die RNA-Moleküle in einer quasizirkulären, pfannenstielähnlichen Form gehalten werden (Modrow et al., 2010). Diese Struktur stabilisiert die Interaktion zwischen dem Promotor (NCR) und der viralen RNA-Polymerase, wodurch die Transkription und Replikation initiiert werden.

Im Folgenden werden die acht Genomsegmente der Influenza-A-Viren kurz vorgestellt.

Segment 1 umfasst 2341 nt, ist monocistronisch und kodiert für die basische Polymerase 2 (PB2). Über ein Kernlokalisierungssignal (Mukaigawa und Nayak, 1991; Perales et al., 1996) wird das PB2 für die virale Transkription und Replikation in den Zellkern transportiert. Dort ermöglicht dessen Endonukleaseaktivität das sogenannte *cap-snatching* (siehe 2.4; Seite 15) und somit die Synthese der viralen mRNA (Shi et al., 1995). Zudem weist das Protein Bindestellen für das PB1 und NP auf (Poole et al., 2004). Mittels reverser Genetik konnte gezeigt werden, dass das PB2 eine Hauptdeterminante in der Kontrolle der Pathogenität ist (Hatta et al., 2001).

Das Segment 2 (2341 nt) kodiert für die eigentliche katalytische Untereinheit des Polymerasekomplexes - die basische Polymerase 1 (PB1). AS-Sequenzvergleiche mit anderen RNA-Polymerasen zeigten, dass das PB1 über vier konservierte Motive der RNA-abhängigen RNA-Polymerase verfügt. Diese Motive sind entscheidend für die Aktivität des Enzyms (Poch et al., 1989; Biswas und Nayak, 1994). Das PB1 weist zudem unabhängige Bindestellen für PB2 und PA auf (Digard et al., 1989) und spielt eine Schlüsselrolle in der Ausbildung des Polymerasekomplexes (Toyoda et al., 1996) sowie

der RNA-Polymerisation (Nakagawa et al., 1996). Einige Influenza-A-Viren kodieren auf einem alternativen Leserahmen für das PB1-F2-Protein, welches als Nichtstrukturprotein in infektiösen Viruspartikeln zu finden ist. Dieses ~ 10 kD große Protein ist sowohl an der Initiierung der Apoptose immunologisch aktiver Zellen (Modrow et al., 2010, Zell et al., 2007) als auch an der Regulation der Polymeraseaktivität von PB1 beteiligt (Mazur et al., 2008). Ebenfalls in Wechselwirkung mit dem PB1 steht das dritte Segment-2-Protein PB1-N40, welches N-terminal um 40 Aminosäuren verkürzt ist und keine eigene Polymeraseaktivität aufweist (Modrow et al., 2010).

Die genetische Information für das saure Polymeraseprotein (PA) liegt auf Segment 3 (2233 nt). Analog zu dem PB2 und PB1 verfügt auch die dritte Polymeraseuntereinheit über ein Kernlokalisierungssignal (Nieto et al., 1994). Das saure Protein ist für die virale Transkription und Replikation (Huang et al., 1990) sowie für eine effiziente Kernakkumulation der PB1-Untereinheiten (Fodor und Smith, 2004) von essentieller Bedeutung. Desweiteren verfügt das PA-Protein über eine Helikase-Aktivität und ATP-bindende Eigenschaften (de la Luna et al., 1989). In Abwesenheit von PB2 und PB1 vermag das PA die Proteolyse viraler und zellulärer (co-exprimierter) Proteine zu induzieren (Sanz-Ezquerro et al., 1995).

Segment 4 umfasst 1778 nt und kodiert für das Hämagglutinin, dessen Bezeichnung auf die Erythrozyten-verklumpende (hämagglutinierende) Eigenschaft der Viren zurückzuführen ist. Die 16 bisher identifizierten HA-Varianten unterscheiden sich in ihrer AS-Sequenz, ihrer Rezeptorspezifität sowie ihrer Antigenität (Modrow et al., 2010). Die posttranslationale Spaltung des synthetisierten und durch Glykosylierung und Palmitoylierung modifizierten Vorläuferproteins HA₀ in zwei Untereinheiten (HA₁ und HA₂) ist für die Infektiosität der Viren von essentieller Bedeutung (Modrow et al., 2010; Shaw et al., 1992). Abhängig von der AS-Sequenz der Spaltstelle konnten folgende an der Spaltung beteiligte Proteasen identifiziert werden: die Furin- und subtilisinähnliche Proteasen der Golgi-Vesikel (Horimoto und Kawaoka, 1994) sowie Transmembran-Serinproteasen vom Typ 2 (HAT – *human airway trypsin-like protease*, TMPRSS2 – *transmembrane protease serine 2*) (Böttcher et al., 2006). Desweiteren hängt die Pathogenität der Viren von der Sequenz der Erkennungsstelle ab. Viren, die über eine polybasische Schnittstelle verfügen, weisen in ihrer Hüllmembran bereits prozessierte HA-Moleküle (HA₁ und HA₂) auf und gelten als hochpathogen (Horimoto und Kawaoka, 1994). Viren mit einer monobasischen AS vor der Proteasespaltstelle werden als niedrigpathogen eingestuft. Das HA₁-Spaltprodukt (aminoterminaler Anteil von HA₀) ist für die Hämagglutination und die Adsorption an die Neuraminsäure verantwortlich, der carboxyterminale Anteil des Vorläuferproteins (HA₂) für die Membranfusionen.

Auf Segment 5 (1565 nt) liegt das Gen für das Nukleoprotein (NP), welches die Hauptkomponente der Nukleokapside bildet. Dieses 55 kD große basische Protein wird

mit dem Übergang von Transkription zu Replikation in Verbindung gebracht (Cheung und Poon, 2007). Desweiteren verfügt das NP über Kernlokalisations-signale (Neumann et al., 1997) und dient als Shuttle-Protein für den Transport der vRNA in den Zellkern (Cros et al., 2005; Whittaker et al., 1996). Durch den Besitz wichtiger T-Zell-Epitope bewirkt das NP die Auslösung zellulärer Immunantworten sowie die Eliminierung virusinfizierter Zellen aus dem Organismus (Modrow et al., 2010). Anhand der NP-Sequenzen, welche hochkonserviert vorliegen, kann die Virusgattung bestimmt werden (Modrow et al., 2010).

Segment 6 enthält auf einer Länge von 1413 nt die genetische Information der Neuraminidase, ein Membranprotein vom Typ II (Colman 1994). Die Hauptfunktion des NAs liegt in der Rezeptorzerstörung durch die Abspaltung endständiger Sialinsäuren von den Glykoproteinen und Glykolipiden der Wirtszelle. Bei inhibierter NA-Aktivität bleiben die Viruspartikel sowohl aneinander als auch an der Zellmembran haften und bilden lange Aggregate (Nayak et al., 2009; Palese et al., 1974). Die Rolle der Neuraminidase während des Lebenszyklus des Virus konnte noch nicht geklärt werden. Liu et al. (1995) zeigten, dass NA-defiziente Viren sowohl die Zellen der Zellkultur als auch die im Mausmodell zu infizieren vermögen. Man schließt daraus, dass das Enzym keine essentielle Rolle bei Viruseintritt, der Virusreplikation sowie dem Assembly spielt. Während einer Infektion mit Influenza-A-Viren werden gegen das NA neutralisierende Antikörper gebildet, welche zwar nicht die Bindung der Viren an die Zellrezeptoren verhindern können, jedoch die Ausbreitung der Infektion im Organismus einzuschränken vermögen (Modrow et al., 2010).

Das Segment 7 (1027 nt) kodiert für zwei Proteine: M1 und M2. Während das Matrixprotein M1 ein co-lineares Transkriptionsprodukt der genomischen RNA ist, entsteht der Protonenkanal M2 durch alternatives Spleißen der M1-spezifischen mRNA (Modrow et al., 2010). Durch die Ausbildung einer M1-Matrix-Schicht wird die Virusmembran von den Komponenten der vRNPs getrennt. Gleichzeitig ermöglicht die Position des M1 die Interaktionen mit den in der Membran enthaltenen Proteinen HA, NA und M2 (Enami und Enami, 1996; Chen et al., 2008) sowie mit den Proteinkomponenten der RNPs im Inneren des Virions (Bui et al., 1996, Liu et al., 2002). Anhand von Strukturanalysen wurde in der aminoterminalen Domäne des Proteins die Kernlokalisationssequenz detektiert, welche mit der Regulation des vRNP-Transports in den Zellkern assoziiert wird (Martin und Helenius, 1991). Weiterhin bindet M1 an die Zellmembran (Gregoriades und Frangione, 1981) und beeinflusst die Virusassemblierung, die Membranausstülpung (*budding*) sowie die Virionen-Morphologie. Calder et al. (2010) zeigten, dass der Grad der helikalen Drehung des M1-Proteins die Morphologie (sphärisch oder helikal) der gebildeten Virionen determiniert. Das M2, ein integrales Membranprotein, bewirkt nach rezeptorvermittelter Endozytose durch die Ansäuerung des Virusinneren die Strukturumlagerung des M1-Proteins (Modrow et al., 2010). Die dadurch entstandene

gelockerte Bindung zwischen den M1-Molekülen und den Nukleokapsiden schafft die Voraussetzung für den Transport der RNPs in den Zellkern. Zudem verhindert M2 durch seine Protonenkanalfunktion die vorzeitige Strukturänderung der HA₁/HA₂-Proteine (Modrow et al., 2010). Anhand von Mutanten konnten verschiedene Domänen des M2-Ionenkanals und deren Rolle im Infektionszyklus identifiziert werden. Der aminoterminaler Bereich des M2 sorgt für dessen Einlagerung in die Virionen (Park et al., 1998). Der carboxyterminale Anteil ist für die virale Replikation verantwortlich (Castrucci et al., 1995). Darüber hinaus ist das M2 in der Verbindung mit Cholesterin an der Modifikation der Membrankrümmung beteiligt (Rossmann et al., 2010). Die Vermittlung der Membranteilung, eine hoch konservierte Funktion des M2, ist essentiell für die Endphase der Membranausstülpung und der Virusfreisetzung (Rossmann et al., 2010b).

Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 werden vom kleinsten RNA-Segment (890 nt) kodiert. Analog dem M-Segment entsteht das NS2 durch alternatives Spleißen der NS1-mRNA (Modrow et al., 2010). NS1 liegt als Oligomer vor und akkumuliert hauptsächlich im Zellkern (Nemeroff et al., 1995; Greenspan et al., 1988). Es scheint an der Regulation zellulärer und viraler Proteinexpressionen durch die Bindung verschiedener RNA-Moleküle z.B. vRNA, vRNPs, dsRNA sowie snRNA beteiligt zu sein (Qiu et al., 1994; Hatada et al., 1992; Marion et al., 1997; Hatada und Fukuda, 1992). Desweiteren wirkt NS1 inhibierend auf Spleiß-Vorgänge und der Aktivierung der dsRNA-Protein-Kinase (PKR) (Fortes et al., 1994; Lu et al., 1994; Lu et al., 1995). Durch das Nichtstrukturprotein 1 wird auch die NFκB-Aktivierung inhibiert sowie die Expression von Interferon α und β (Modrow et al., 2010). In Kooperation mit M1 ist das NS2 für den Transport neu gebildeter vRNPs aus dem Zellkern in das Zytoplasma verantwortlich (Modrow et al., 2010). In diesem Zusammenhang wird das NS2 auch als NEP (*nuclear transport protein*) bezeichnet.

2.4. Infektionszyklus der Influenza-A-Viren

Die Transkription und Replikation des Influenza-A-Virusgenoms findet im Gegensatz zu den meisten RNA-Viren im Zellkern und nicht im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle statt. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Phasen des Infektionszyklus erläutert.

1. Adsorption, Internalisierung und Uncoating

Der Infektionszyklus der Influenza-A-Viren beginnt mit der Adsorption der Viren an die Wirtszelle. Das virale Hämagglutinin erkennt die Sialinsäurereste zellulärer membranassoziierter Glykoproteine und Glykolipide. Dabei hängt die Affinität des HAs zu α(2,6)- bzw. α(2,3)-glykosidisch verknüpfter Sialinsäurereste von den Aminosäuren

D190E, L226Q und S228G ab (Glaser et al., 2005; Stevens et al., 2006; Modrow et al., 2010). Der Mechanismus, durch den die Influenzaviren die Endozytose einleiten, ist noch weitestgehend unbekannt. Neueste Daten deuten darauf hin, dass die Bindung sphärischer Partikel an die Wirtszelle die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen triggert (Eierhoff et al., 2010) und somit die Clathrin-vermittelte Endozytose einleitet (Rust et al., 2004). Die Aufnahme filamentöser Virionen scheint über andere Mechanismen zu laufen, da die Viruspartikel für die Clathrin ummantelten Vesikel zu groß sind (Rossmann und Lamb, 2011). Studien am filamentösen Ebola zeigten, dass das Virus über Makropinozytose in die Zelle gelangt (Nanbo et al., 2010; Saeed et al., 2010). Diese Art der Aufnahme könnte frühere Daten, welche auf einen Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Viruseintritt hindeuteten, erklären (Rust et al., 2004; Sieczkarski und Whittaker, 2002). Unabhängig von der Virusmorphologie ist eine endosomale Ansäuerung Voraussetzung für den Viruseintritt in die Wirtszelle (Sieczkarski und Whittaker, 2005). Das saure Milieu im Endosom wird durch zelluläre Protonenpumpen gewährleistet. Bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 erfolgt die für die Membranverschmelzung essentielle Konformationsveränderung des HAs. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der fusionsvermittelnden Aminosäuren wird das Einlagern der N-terminalen HA₂-Domäne in die Endosomenmembran ermöglicht und die Verschmelzung der Lipiddoppelschicht induziert (Modrow et al., 2010). Der niedrige pH-Wert im Endosom führt gleichzeitig zu der Aktivierung der M2-Ionenkanäle, wodurch das Virusinnere durch den Einstrom von Protonen angesäuert wird. In Folge dessen werden die Interaktionen zwischen NP und M1 gelöst. Die vRNP-Komplexe gelangen durch die im Zuge der Membranverschmelzung entstandenen Fusionsporen ins Zytoplasma (*uncoating*). Von dort werden sie über zelluläre Importine, welche die Kernlokalisierungssequenzen der vRNPs erkennen, aktiv in den Zellkern transportiert.

II. Transkription und Replikation

Zu Beginn der Transkription ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase auf die 5'-Cap-Strukturen zellulärer mRNA-Moleküle angewiesen (*cap-snatching*). Dazu binden die an das 3'-Ende der viralen Genomsegmente assoziierten PB2-Proteine an die 5'-Kappen der zellulären prä-mRNA. Anschließend hybridisiert an das terminale Nukleotid Uridin ein Adeninrest der ersten 10-13 Basen der zellulären mRNA. Durch die Nukleaseaktivität des PB2-Proteins wird die zelluläre mRNA nach dem Adenin abgespalten und ein freies 3'-OH-Ende erzeugt. Dieses dient als Initiationssignal für die Transkription der vRNA durch die virale Polymerase (Modrow et al., 2010). Das *cap-snatching* bewirkt zusätzlich ein Umschalten des Wirtsstoffwechsels auf die Bedürfnisse der Virusinfektion, d.h. die zellspezifischen Transkriptions- und Translationsprozesse werden zu Gunsten der viralen RNA- und Proteinsynthese eingestellt (Palese und Shaw, 2006). Die Elongation der

mRNA erfolgt über die Polymeraseaktivität des PB1-Segmentes. Etwa 15-20 Nukleotide vor dem 5'-Ende der RNA-Segmente wird die Transkription gestoppt. Die pfannenstielähnlichen Strukturen wirken eventuell als physikalische Barriere und verlangsamen die Polymerisation (Modrow et al., 2010). Über die an dieser Stelle vorhandene uridinreiche Sequenz wird die Polyadenylierung induziert und die Transkription abgeschlossen. Die Transkripte des M- und NS-Segmentes werden gespleißt und die entsprechenden Produkte synthetisiert. Neben der Hemmung antiviraler Abwehrmechanismen scheint das NS1 auch als Spleißosomen-Cofaktor zu dienen (Modrow et al., 2010). Die mRNAs werden über zelluläre und virale (NEP) Komponenten durch die Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Nach erfolgter Translation der HA-, NA- und M2-Proteine am rauen endoplasmatischen Retikulum werden diese im Golgi-Apparat durch Glykosylierung (HA, NA), Acetylierung (HA), Palmitoylierung (HA, M2) und Phosphorylierung (M2) modifiziert. In dieser Phase beginnt auch die proteolytische Spaltung des HAs in seine über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten HA₁ und HA₂. Über die Golgi-Vesikel gelangen die modifizierten Proteine an die Wirtszelloberfläche. Parallel dazu erfolgt gegebenenfalls die Synthese des PB1-F2-Proteins. Das zu den Pathogenitätsfaktoren gehörende Protein reichert sich aufgrund einer C-terminal gelegenen Translokationssequenz in den Mitochondrien an (Chen et al., 2001; Yamada et al., 2004) und induziert über den Cytochrom C-Austritt die Apoptose von CD8⁺-T-Zellen und alveolaren Makrophagen (Zamarin et al., 2005). Nach der Translation der restlichen Proteine (PB2, PB1, PA, NP, M1, NS1 und NS2) an den freien Ribosomen werden diese aufgrund ihrer karyophilen Signale in den Zellkern transportiert. Während der sich im Zytoplasma gebildete PB1-PA-Komplex über das β -Importin RanBP5 (*Ran binding protein 5*) in den Zellkern gelangt (Deng et al., 2006), werden die PB2-Moleküle über Importin α eingeschleust (Tarendeau et al., 2007). Im Nukleolus assoziiert der Subkomplex mit PB2 zum trimeren Polymerasekomplex (Huet et al., 2010). Der Mechanismus zur Initiierung der Replikation ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Man vermutet, dass eine hohe Konzentration an freien neusynthetisierten NP-Proteinen den Wechsel zwischen Transkription und Replikation bewirkt (Modrow et al., 2010). Olson et al. (2010) postulieren, dass der Wechsel durch eine hohe Konzentration an viraler Polymerase (Oligomerisierung) sowie durch die 5'-Enden der vRNA-Templates hervorgerufen wird. Zu Beginn der Replikationsphase dient die virale RNA als Matrize für die Synthese der *complementary* (c)RNA, welche weder über eine cap-Struktur noch einen Poly-A-Schwanz verfügt. Diese positiv orientierten cRNAs dienen wiederum als Matrize zur Synthese genomischer vRNA, welche schließlich mit den NP-Proteinen und der viralen Polymerase zu vRNPs assoziieren. Das neusynthetisierte M1 bindet an die vRNPs und vermittelt zusammen mit NS2 den Export der Komplexe aus dem Zellkern ins

Zytoplasma (Modrow et al., 2010). Anschließend werden die Regionen mit einer hohen Konzentration an eingelagerten HA-, NA- und M2-Proteine angesteuert.

III. Assemblierung und Sprossung (budding) neuer Viruspartikel

Die HA- und NA-Proteine sind mit sogenannten Lipid-Raft-Domänen, cholesterol- und sphingolipidreichen Regionen (Brown und Rose, 1992), assoziiert (Chen et al., 2007). Über das M1 werden die vRNPs mit den integralen Membranproteinen HA und NA verbunden, welche die nun folgende Ausstülpung der Zellmembran induzieren (*budding*) (Rossmann und Lamb, 2011). Die Verlängerung des sich bildenden Virions wird durch die Polymerisation von M1 verursacht. Parallel dazu findet eine Anhäufung von M2-Proteinen an der Peripherie des knospenden Virions durch Interaktion mit M1 statt. Durch den Einbau der amphipatischen Helices der M2-Proteine in die Membran wird die Spannung zwischen den beiden Lipidschichten modifiziert und so die Membranabschnürung ermöglicht (Rossmann und Lamb, 2011). Die Freisetzung der neugebildeten Virionen erfolgt über die NA-vermittelte Spaltung endständiger Sialinsäuren von den zellulären und viralen Oberflächenproteinen. Anhand von Kryo-Elektron-Tomographie-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das NA im Bereich der Abschnürung konzentriert vorliegt. Dies verdeutlicht die Rolle der Neuraminidase bei der Vermittlung der Virusfreisetzung von der Wirtsmembran (Calder et al., 2010). Desweiteren wird der Einfluss von Rab11 bei der Virusfreisetzung diskutiert. Bei einer reduzierten Expression des GTP-bindenden Proteins Rab11 wurde sowohl eine geringere Virusfreisetzung (Bruce et al., 2010) als auch eine geringere Konzentration an M2-Proteinen an der apikalen Membranseite detektiert (Rossmann et al., 2010b).

2.5. Genetische Variabilität der Influenza-A-Viren

Die hohe genetische Variabilität der Influenzaviren macht es den Menschen unmöglich, eine Eradikation des Virus einzuleiten. Zum einen vermögen die Influenzaviren aufgrund der fehlenden *proof-reading*-Aktivität der Polymerase Punktmutationen anzusammeln, welche in einer hohen Veränderlichkeit der Oberflächenproteine resultieren (*antigenic drift*) und für die Entstehung saisonaler Grippeepidemien verantwortlich sind. Zum anderen können bei einer Infektion mit mindestens zwei verschiedenen Viren Reassortierungsereignisse d.h. der Austausch von Genomsegmenten stattfinden (Gen-Shift; Modrow et al., 2010). Beispiele für solch ein Ereignis liefern die pandemischen Viren der „Hongkong“- und der „Asiatischen Grippe“, welche das aviäre H2 bzw. H3 in die humanen Influenzaviren eingebracht haben. Man schätzt, dass alle 10-50 Jahre Pandemiestämme entstehen (Kamps et al., 2006). Die Folgen können, wie die Vergangenheit zeigte, von verheerend über moderat bis hin zu mild sein. Aktuell (Saison

2010/2011) zirkulieren neben den saisonalen Epidemieviren die pandemischen A/H1N1v-Viren von 2009. In Abbildung 6 ist die jetzige Situation weltweit dargestellt. Das pandemische A/H1N1v-Virus trat erstmalig im April 2009 in Nordamerika auf. Genetische Analysen zeigten, dass es sich um eine Reassortante aus humanen, aviären und porzinen Influenza-A-Viren handelt. Aufgrund der effizienten Mensch-zu-Mensch-Übertragung waren nach kürzester Zeit die Viren weltweit nachzuweisen. Bereits im Juni 2009 wurde durch die Weltgesundheitsorganisation Phase 6 der Influenza-Pandemie ausgerufen. Ende des Jahres 2009 waren laut der WHO mindestens 12.220 Menschen an den Folgen der „Schweinegrippe“ verstorben. Jedoch war die registrierte Mortalität weitaus geringer als bei vorangegangenen Pandemien.

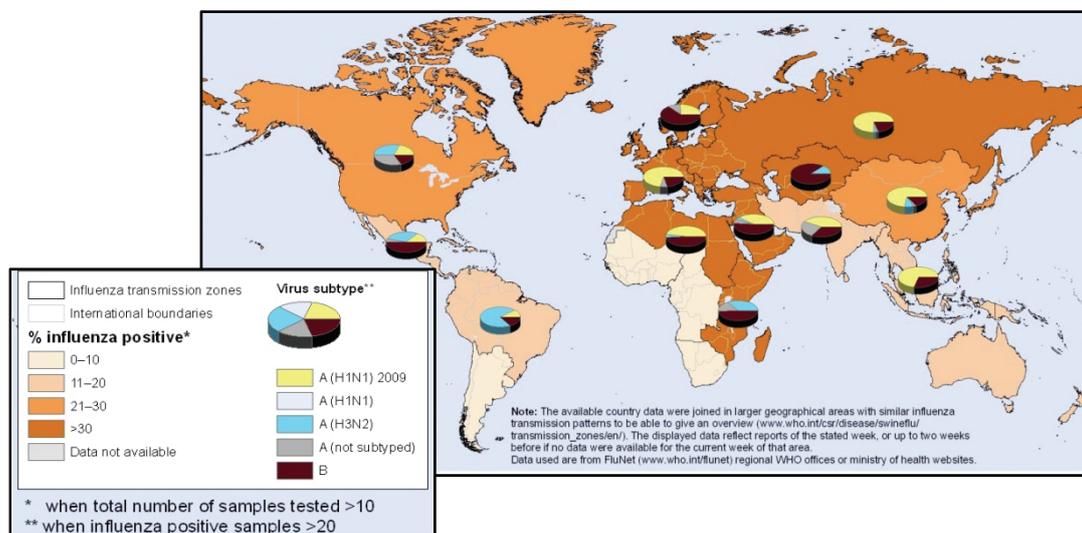


Abb. 6: Nachweis des pandemischen A/H1N1v neben den saisonal zirkulierenden Influenza-A- und -B-Viren der aktuellen Saison 2010/2011 weltweit (WHO; Stand 12.2.2011)

2.6. Wirtsspektrum und zoonotisches Potential

1. Aviäre Influenza-A-Viren

Die Wasservögel gelten als natürliches Reservoir für alle Influenza-A-Viren (Webster et al., 1992). In den meisten Fällen rufen die Viren in ihren natürlichen Wirten nur symptomlose oder milde Erkrankungen hervor. Die Vermehrung der Virionen verläuft in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes. Dieses geht mit der Expression der von aviären Viren bevorzugten $\alpha(2,3)$ -verknüpften Sialinsäure-Rezeptoren einher (Fouchier et al., 2003; Connor et al., 1994; Kamps et al., 2006). Durch kontaminiertes Wasser ist die Übertragung der Wildwasservogelviren auf Hausgeflügel möglich, wodurch die Entstehung hochpathogener Influenza-A-Viren ermöglicht wird. Diese Viren sind hochkontagiös und rufen schwere systemische Infektionen mit Nekrosen, Haut- und Hirnhautentzündungen hervor sowie eine Mortalitätsrate bis zu 100 %. Auch die

Übertragung aviärer Viren auf Säugetiere (z.B. Menschen, Pferde, Seehunde, Schweine) ist möglich und bereits nachgewiesen. Beispielhaft seien die Übertragungen der aviären H5N1-, H9N2- und H7N7-Viren auf den Menschen genannt (Bender et al., 1999; Guan et al., 1999; Fouchier et al., 2004). Das hochpathogene H5N1-Virus verursacht in Menschen eine Mortalitätsrate von mehr als 60 % (de Jong et al., 2006). Zu den Symptomen zählen schwerste Pneumonien und Multiorganversagen. Bisher konnte sich das Virus noch nicht an die humane Population adaptieren und Transmissionen von Mensch zu Mensch wurden bisher nicht beobachtet (Peiris et al., 2007). Wird jedoch diese Barriere überschritten, könnte das für eine gegenüber dem H5 naive Bevölkerung verheerende Folgen haben.

II. Humane Influenza-A-Viren

Die in der menschlichen Population zirkulierenden Viren waren zunächst vom Subtyp H1N1. Durch Reassortierungsereignisse zwischen humanen und aviären Viren wurde das HAH2 bzw. HAH3 in die menschliche Bevölkerung eingebracht. Der Subtyp H1N2, entstanden durch Reassortierung zwischen humanen H1N1- und H3N2-Viren (Gregory et al., 2002), trat in den Jahren 2001 bis 2003 auf. Zurzeit sind neben den pandemischen A/H1N1v-Viren die Subtypen H1N1 und H3N2 nachzuweisen (WHO). Die Replikation der humanen Influenzaviren erfolgt in den Zellen des Respirationstraktes, welche überwiegend $\alpha(2,6)$ -glykosidisch verknüpfte Sialinsäure-Rezeptoren exprimieren (Shinya et al., 2006).

III. Porzine Influenza-A-Viren

1930 gelang R. Shope die Isolierung des Schweinegrippe-Erregers (Shope, 1931) welches folgende Symptome bei Schweinen verursachte: plötzlicher Beginn, Fieber, Appetitlosigkeit, Husten, nasale Sekretion, Apathie sowie Abgeschlagenheit (Olson et al., 2006; Madec et al., 1989). Während in einer Herde die Mortalitätsraten niedrig sind, kann die Morbidität auf 100 % ansteigen (Modrow et al., 2010). Den Schweinen an sich fällt eine besondere Rolle in der Evolution der Influenza-A-Viren zu. Die trachealen Epithelzellen, in denen die Replikation der Viren stattfindet, tragen sowohl $\alpha(2,3)$ - als auch $\alpha(2,6)$ -verknüpfte Sialinsäure-Rezeptoren (Suzuki et al., 2000; Nicholls et al., 2008). Mehrfachinfektion mit humanen und aviären Influenzaviren werden dadurch begünstigt und die Bildung von Reassortanten ermöglicht. Aufgrund dieser Eigenschaften wird das Schwein als *mixing vessel* bezeichnet (Scholtissek et al., 1998).

Classical swine H1N1-Viren

In Nordamerika zirkulierten bis 1998 die *classical swine*-Viren des Subtyps H1N1. Diese Viren enthalten ausschließlich porzine Genomsegmente und bilden eine eigene genetische Linie. Durch mehrere Reassortierungsereignisse mit humanen und/oder

aviären Influenzaviren entstanden die Subtypen H3N2, H1N2, H3N1 sowie H2N3 (Olsen et al., 2002, Karasin et al., 2000 und 2002; Ma et al., 2006; Webby et al., 2000; Zhou et al., 1999). *Classical swine*-Viren in Europa wurden in den 1950er Jahre nachgewiesen. Nachdem dieser Virustyp als verschwunden galt, wurde er 1976 in Italien wieder eingebracht (Nardelli et al., 1978). Nach einer europaweiten Ausbreitung erfolgte jedoch die Verdrängung der *classical swine*-Viren durch ein neues *avian-like* H1N1-Virus.

Porzine *avian-like* H1N1-Viren

Die europäischen H1N1-Schweineviren von 1979 unterschieden sich serologisch von denen der *classical swine*-Linie und zeigten engere Verwandtschaft zu den eurasisch aviären Influenzaviren. Molekulare Analysen ergaben, dass das europäische H1N1-Virus komplett von einem Vogelvirus abstammte (Scholtissek et al., 1983). Weitere Untersuchungen bestätigten den aviären Ursprung der Segmente (Schultz et al., 1991). Das *avian-like* H1N1-Virus breitete sich schnell innerhalb europäischer Schweinepopulationen aus und verdrängte die Viren der *classical swine*-Linie.

Porzine *human-like* H3N2-Viren

Mitte der 80er Jahre wurden in Europa Schweineinfluenzaviren von Subtyp H3N2 isoliert. Sowohl das kodierende Segment für das Hämagglutinin als auch das für die Neuraminidase stammten von einem humanen H3N2-Virus ab (Campitelli et al., 1997; Marozin et al., 2002). Die restlichen Segmente wurden als *avian-like* identifiziert. Das *human-like* H3N2-Virus war in der Lage, eine stabile Infektionskette auszubilden und sich so über den europäischen Kontinent auszubreiten.

Porzine *human-like* H1N2-Viren

1994 konnte in Großbritannien ein weiterer Subtyp der Schweineinfluenzaviren identifiziert werden (Brown et al., 1995, 1998). Das neue *human-like* H1N2-Virus entstand durch Reassortierungen zwischen humanen H1N1- (HA-Übertragung), saisonal zirkulierenden H3N2- (NA-Übertragung) und *avian-like* H1N1-Viren.

2.7. Virulenzfaktoren und pathogenitätsverändernde Mutationen

In den folgenden Tabellen 2a bis 2c sind Aminosäuresubstitutionen segmentspezifisch aufgeführt, welche im Zusammenhang mit der Pathogenität und Virulenz der Influenza-A-Viren stehen. Oft reichen Einzelmutationen aus, um z.B. eine Steigerung oder Senkung der Polymeraseaktivität zu verursachen. Aber auch Kombinationen von Substitutionen sowie die Segmentzusammensetzung und deren Kompatibilität tragen zur Virulenz des Virusstammes bei (Palese 2004). Naffakh et al. (2000) zeigten, dass die Herkunft der Polymeraseuntereinheiten für deren Interaktion in humanen Zellen entscheidend sein

kann. Ein aviäres PB1 kooperiert besser mit humanen PB2-, PA- und NP-Segmenten. Im Gegensatz dazu verschlechtert sich die Interaktion, wenn das PB2, PA und NP aviären Ursprungs und das PB1 humaner Herkunft ist. Das Zusammenwirken von PB2- und NP-Segmenten in rekombinanten Viren ist bei gleicher Herkunft optimal. Desweiteren werden die aviären PB1-Proteine als Virulenzfaktoren angesehen, da diese mit der hohen Pathogenität der pandemischen Viren von 1918/19, 1957 und 1968 in Zusammenhang gebracht werden (Kawaoka et al., 1989; Pappas et al., 2008). Minireplikonsysteme haben gezeigt, dass die Replikation in Säugetierzellen mit einem aviären PB1 effizienter verlief als mit einem humanen PB1 (Naffakh et al., 2000). Desweiteren ist für eine effektive Infektion eine Balance der rezeptorbindenden Aktivität von HA und der rezeptorzerstörenden Funktion von NA nötig (Matrosovich et al., 1999; Mitnaul et al., 2000).

Die in den Tabellen 2a bis 2c aufgeführten Mutationen sind Experiment-spezifisch zu betrachten und nicht als generell anzusehen. Die Aminosäurepositionen wurden den Veröffentlichungen entnommen und entsprechen besonders im Falle des HAs nicht einer universellen Nummerierung. Bei den wissenschaftlichen Arbeiten wurden vorwiegend aviäre Viren (das hochpathogene H5N1) und deren Adaptionmöglichkeiten an andere Vogelarten und Säugetierzellen untersucht. Zu den Virulenzfaktoren der porzinen Influenza-A-Viren existieren bisher kaum Studien, was eventuell durch das Fehlen hochpathogener Schweineviren zu erklären ist.

Tab. 2a: Virulenzmarker der Polymeraseuntereinheiten von Influenza-A-Viren; ↑: Steigerung; ↓: Senkung

Segment	Position	Effekt	Literatur
PB2	N265S	Temperatursensitive Variante	Subbarao et al., 1993
	T333I	Verringerte Polymerase-Aktivität	Gabriel et al., 2005
	E627K	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen, Adaption nicht-humaner Viren an Säugerzellen	Labadie et al., 2007 Naffakh et al., 2000
	D701N	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen, verbesserte Interaktion von PB2 mit Importin α	Gabriel et al., 2005, 2008
	S714R	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen	Gabriel et al., 2005
	E158G	↑Morbidity und Mortalität; ↑ Replikation im Mausmodell mit A/H1N1v	Zhou et al., 2011
PB1	L13P	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen	Gabriel et al., 2005
	Y436H	↓ Pathogenität in Enten	Hulse-Post et al., 2007
	S678N	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen	Gabriel et al., 2005
PB1-F2	N66S	↑ Morbidity und Mortalität im Mausmodell, Inhibition der frühen Interferon-Antwort <i>in vivo</i>	Conenello et al., 2007, 2011
	T51M	Geringere Pathogenität (welche AS ausschlaggebend ist, ist noch unklar)	Marjuki et al., 2010
	V56A		
	E87G		
	Protein	Apoptose induzierend	Chen et al., 2001
PA	T97I	↑Virulenz in Mäusen, Adaption nicht-humaner Viren an Säugerzellen	Song et al., 2009
	K102A	↓ Cap-Bindung; ↓ vRNA Promotor-bindenden Aktivität, ↓ Transkription und Replikation	Hara et al., 2006
	D108A K134A	Hemmt Endonuklease-Aktivität und Transkription	
	H510A	↓Endonuklease-Aktivität, hemmt Transkription	Fodor et al., 2002
	T515A	niedrig pathogen in Enten	Hulse-Post et al., 2007
	K615N	↑Polymerase-Aktivität, ↑Virulenz in Mäusen	Gabriel et al., 2005
	S224P	↑Virulenz, ↑ Replikation in Entenzellen	Song et al.; 2011
	N383D	↑Virulenz, ↑Polymerase-Aktivität (Entenzellen)	
NP	A184K	Einfluss auf RNA-Bindeaffinität und Replikationsfähigkeit; in Hühnern frühere Mortalität, ↑ Virustiter; ↑ NO-Konzentration	Wasilenko et al., 2009
	N319K	Adaption aviärer Viren an Maus; verbesserte Bindung an Importin α	Gabriel et al., 2008
	105V	↑ Pathogenität von H5N1 in Hühnern	Tada et al., 2011

Tab. 2b: Virulenzmarker des Oberflächenproteins Hämagglutinin der Influenza-A-Viren; ↑: Steigerung; ↓: Senkung

Segment	Position*	Effekt	Literatur
HA	Monobasische Spaltstelle	↓ pathogen (aviäre Viren)	Horimoto u. Kawaoka, 1994
	Polybasische Spaltstelle	↑ pathogen (aviäre Viren) keine Erhöhung der Virulenz in humanen H3N2	Modrow et al., 2010 Schrauwen et al., 2011
	Verlust Kohlenhydratseitenkette bei Spaltstelle	↑ Spaltbarkeit und Virulenz niedrigpathogener Viren	Kawaoka et al., 1984
	Veränderung Glykosylierungsmuster Bsp.: Verlust Glykosylierung AS163 Bsp.: Entfernung N165 + N246	Beeinflussung der Rezeptorbindung ↓ Wirkung von Neuraminidaseinhibitoren ↑ Virulenz und Replikation, ↑ pulmonare Inflammation	Mishin et al., 2005 Tate et al., 2011
	HA ₂ : G23C	↓ Fusions-pH-Wert, ↓ Replikation	Ilyushina et al., 2007
	HA ₁ : P162S, Q201R, G218W HA ₂ : T156N	↑ Infektion und Replikation, Veränderung der Rezeptorbindung?	Keleta et al., 2008
	HA ₂ : N114K	↑ pH, ↓ Umweltstabilität, ↓ Replikation	Reed et al., 2010
	HA ₂ : K58I	↓ pH, ↑ Umweltstabilität, ↓ Mortalität, ↓ Gewichtsverlust	
	HA ₁ : H24Q	↓ pH, ↑ Umweltstabilität	
	D222G bei A/H1N1v (nach Passagierung im Ei)	↑ Replikation in MDCK; ↑ Pathogenität in Mäusen	Xu et al., 2010
	L226Q und S228G E190D und G225D/E	↑ Affinität von α(2,6)- zu α(2,3)-glykosidische Bindung ↑ Affinität von α(2,3)- zu α(2,6)-glykosidische Bindung	Vines et al., 1998 Matrosovich et al., 2000 Suzuki et al., 2000
	S227N	Adaption aviärer Viren an humane Rezeptoren	Gambaryan et al., 2006
	L129V und A134V		Auewarakul et al., 2007
	N182K und Q192R		Yamada et al., 2006
	V226I	↓ Affinität des HAs zur Rezeptorbindung, Resistenz gegen Neuraminidasehemmer	Modrow et al., 2010

* Keine einheitliche Nummerierung

HA₁: erstes Spaltprodukt von HA₀-VorläuferproteinHA₂: zweites Spaltprodukt von HA₀-Vorläuferprotein, Fusionsprotein

Tab. 2c: Virulenzmarker der Neuraminidase, des Matrixproteins sowie des Nichtstrukturproteins der Influenza-A-Viren; ↑: Steigerung; ↓: Senkung

Segment	Position	Effekt	Literatur
NA	Deletion in Stieldomäne	Adaption von Wildgeflügel an Hausgeflügel	Matrosovich et al., 1999
		↑ Virulenz in Hühnern	Munier et al., 2010
	Säureresistenz der NA-Aktivität	Gastrointestinale Symptome bei human. H5N1-Infektion	Takahashi et al., 2001 de Jong et al., 2005
	Deletion T435 oder G455	↑ Stabilität der Sialidase-Aktivität in niedrigen pH, ↑ Replikation	Takahashi et al., 2010
	Verlust der Glykosylierung AS146	↑ Virulenz	Goto und Kawaoka, 1998
	Y40H und E199K	Beeinflussung Virus-Wirt-Interaktion	Ghedini et al., 2005
	D294S	Oseltamivir-Resistenz; ↑ Pathogenität in Frettchen	Kiso et al., 2011
	AS-Austausch im aktiven Zentrum: E199V/D, H274Y; R292K	Resistenz gegenüber NA-Inhibitoren	Modrow et al., 2010; Oxford et al., 2003; Tai et al., 1998
	E119G	Destabilisierung des NA-Tetramers	Colacino et al., 1997
M2	D344N	↑ NA-Aktivität	Collins et al., 2009
	L26I, V27A, A30T, S31N, G34E	Vermittlung der Amantadin-Resistenz	Hay et al., 1985; Abed et al., 2005
	CRAC-Motiv (<i>cholesterol recognition/interaction amino acid consensus</i>): AS 46-56: L/V-X₍₁₋₅₎-Y-X₍₁₋₅₎-R/K	Virulenzdeterminante, bei Verlust ↓Morbidity und Mortalität	Stewart et al., 2010
	Verlust der Palmitoylierung durch C50S	↓ Virulenz <i>in vivo</i>	Grantham et al., 2009
NS1	M2-Protein	Akkumulation von Autophagosomen durch Hemmung der Fusion zwischen Lysosom und Autophagosom → Hemmung der Autophagosomdegradation	Gannage et al., 2009
	NS1-Protein	Inhibierung der Immunantwort, Apoptoseinduktion	Modrow et al., 2010
	D92E	„Zytokinresistenz“-fraglich, hochvirulente Viren	Seo et al., 2004
	V149A	Pathogen im Huhn → Antagonist zu IFN-α/β-Antwort	Li et al., 2006
	P42S	↑ Virulenz in Mäusen → Antagonist zu IFN-α/β-Antwort	Jiao et al., 2008
NS2	C-terminale Deletion im NS1	Attenuierung, ↓ Virusvermehrung, ↑ Interferon-Antwort	Garcia-Sastre et al., 1998; Kochs et al., 2007
		E67S+E74S+E75S	↓ virale Polymerase-Aktivität, Änderung der Morphologie, ↓ vRNPs im Partikel

2.8. Matrixprotein 2 und der Einfluss von Amantadin

Das Matrixprotein 2 der Influenza-A-Viren ist ein 97 Aminosäure langes Protein (15 kD), welches sowohl für die pH-Regulierung als auch für den *Budding*-Prozess von essentieller Bedeutung ist. Das M2-Protein wird in drei Segmente gegliedert: *erstens* der extrazelluläre N-terminale Bereich (AS 1-23), *zweitens* die transmembrane Domäne (AS 24-46) sowie *drittens* das intrazelluläre C-terminale Segment (AS 47-97) (Pielak und Chon, 2010). In der Virusmembran bilden vier M2-Monomere über Interaktionen ihrer Transmembranregionen den Ionenkanal aus (Modrow et al., 2010). Für dessen Funktion sind die Aminosäuren H37 und W41 von essentieller Bedeutung. Das Histidin an Position 37 ermöglicht die Kanalfunktion sowie die Protonenselektivität (Wang et al., 1995), die AS Tryptophan die unidirektionale Leitfähigkeit des Protonenkanals (Tang et al., 2002).

Im Zuge der Entwicklung einer antiviralen Therapie gegen die Influenza wurde 1964 der Ionenkanalblocker Amantadin (1-Aminoadamantan-HCl) hergestellt. Es handelt sich dabei um polyzyklische aliphatische Ringsysteme (Modrow et al., 2010). Experimentell konnten bisher zwei konzentrationsabhängige Wirkungsmechanismen des Amantadins beschrieben werden. Bei der Verabreichung von mehr als 100 µM Substanz war ein unspezifischer, genereller Effekt der Substanzklasse zu verzeichnen. Dieser zeichnete sich durch die Akkumulation der Amine im Endosom und den damit einhergehenden pH-Wertanstieg aus, wodurch sowohl die Membranverschmelzung als auch die Virusgenomfreisetzung verhindert wurde (Hay, 1992). Eine Konzentration bis 50 µM bewirkte einen spezifischen Hemmeffekt, der durch die Blockade des M2-Ionenkanals hervorgerufen wurde (Kendal und Klenk, 1991). Aufgrund der fehlenden Ansäuerung des Virusinneren über den M2-Kanal kann die Dissoziation der NP- von den M1-Proteinen nicht erfolgen, welches wiederum eine Voraussetzung für die Replikation und Transkription darstellt. Der Einsatz von Amantadin verursachte jedoch starke Nebenwirkungen, welche vorwiegend das ZNS betrafen (Wutzler et al., 2004) sowie auch die Entstehung resistenter Virusstämme innerhalb kürzester Zeit bewirkte (Hayden und Hay, 1992; Bright et al., 2006; Englund, 2002). Sequenzanalysen ergaben mehrere Mutationen (AS 26, 27, 30, 31, 34 und 38) im M2, welche mit der Amantadin-Resistenz in Verbindung gebracht wurden, ohne dabei die Funktionalität des Protonenkanals zu beeinträchtigen (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005). Inwieweit das Amantadin mit den Aminosäuren des Protonenkanals interagiert, ist auch heute noch nicht eindeutig geklärt. Anhand von verschiedenen molekularen Modell-Studien versuchen Wissenschaftler Bindestellen des Amantadins bzw. seine Wechselwirkungen innerhalb des M2-Kanals zu identifizieren. So wird postuliert, dass der hydrophobe Adamantyl-Käfig mit den Seitenketten des an Position 27 befindlichen Valins interagiert (Sansom und Kerr, 1993). Desweiteren vermögen die Aminogruppen der Substanz mit der Hydroxy-Gruppe des Serins an Position 31 (S31) günstige elektrostatische Interaktionen einzugehen (Sansom

und Kerr, 1993). Yi et al. (2008) beschreiben wechselnde Wasserstoffverbindungen zwischen der Hydroxy-Gruppe von S31 und den Carboxy-Gruppen der AS Alanin an Position 30 mit den Aminogruppen des Amantadins. Die Rolle des Serins an Position 31 bei der Bindung des Amantadins ist noch stark umstritten. Eine S31A-Mutante, welche nicht über die polaren Kontakte mit Amantadin verfügte, wies dennoch Wildtyp-ähnliche Sensitivitäten auf (Pielak et al., 2009). Die Arbeitsgruppe vermutet daher eine unspezifische Bindung der Substanz innerhalb des Kanals. Abbildung 7 beinhaltet sowohl den Aufbau des M2-Ionenkanals sowie die Positionierung wichtiger Aminosäuren innerhalb der transmembranen Domäne.

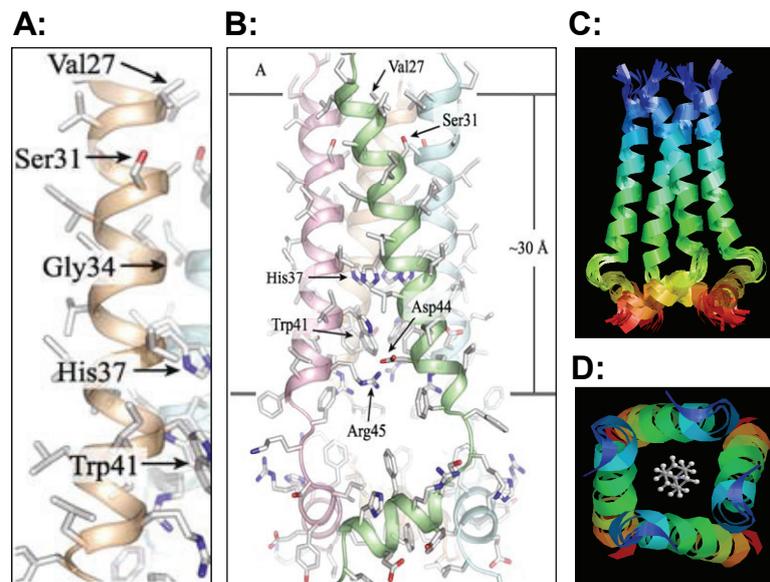


Abb. 7: M2-Ionenkanal der Influenza-A-Viren (Kernspinresonanzspektroskopie); **A:** Darstellung der Positionen der Aminosäuren 27, 31, 34, 37 und 41 des M2-Proteins (aus Pielak und Chou, 2010a; PDB-Code: 2RLF); **B:** Struktur des M2-Tetramers (aus Pielak und Chou, 2010a; PDB-Code: 2RLF); **C:** RasMol-Darstellung des M2-Tetramers einer V27A-Mutante (PDB-Code: 2KWV; Pielak und Chou, 2010b); **D:** RasMol-Darstellung des M2-Tetramers mit Amantadin im Inneren der Pore (PDB-Code: 2KQT; Cady et al., 2010)

Für die Entwicklung resistenter Virusstämme werden zum einen Mutationen, welche zur Veränderung der Bindungsaffinität zwischen Substanz und den Aminosäuren des Kanals führen sowie auch allosterische Mechanismen als Ursache diskutiert (Pielak und Chou, 2010a). So schwächt z.B. die Substitution V27A die Bindung von Amantadin durch verminderte hydrophobe Kontakte. Der Austausch von Glycin zu Glutaminsäure an Position 34 stört die Substanzbindung in dieser Region (Pielak und Chou, 2010a). Ein ähnlicher Effekt wird durch die Mutation S31N ausgelöst. Durch die fehlende polare Verbindung zwischen der Aminogruppe von Amantadin und der Carboxylgruppe von Serin wird die Wirkung der antiviralen Substanz gesenkt. Durch einen AS-Austausch können sich auch allosterische Veränderungen ergeben, welche in der Modifikation der Helix-

Strukturen resultieren. Die Substitution S31N bewirkt eine erheblich schwächere Helix-Helix-Komprimierung, wodurch die Substanzbindung in der C-terminalen transmembranen Region dramatisch geschwächt wird (Pielak et al., 2009). Durch das Adenin an Position 27 wird die Stabilität der Helix-Helix-Strukturen vermindert und die Substanzbindung erschwert. So verursachen Mutationen allosterische Veränderung zwischen den Helices der Protonenpumpe, wodurch die Bindung der antiviralen Substanz geschwächt bzw. verhindert wird (Pielak und Chou, 2010a).

2.9. Genetische Analyse von Influenzaviren mittels der Illumina-Sequenzieretechnologie

Mit der Einführung praktikabler Sequenzierverfahren, entwickelt von Sanger, Nicklen und Coulson sowie unabhängig dazu von Gilbert und Maxam (Sanger et al., 1977a; Maxam und Gilbert, 1977), begann die genetische Charakterisierung zahlreicher Organismen. Das erste vollständig sequenzierte Genom (~ 5375 nt) entstammte dem Bakteriophagen ϕ X174 (Sanger et al., 1977b). Neben der Genotypisierung von Tier-, Pflanzen- und Bakteriengenomen steht auch die Entschlüsselung des Erbgutes der Influenzaviren im Vordergrund vieler wissenschaftlicher Projekte. Weltweit werden humane, aviäre und porcine Influenza-A-Viren sequenziert, um einen Einblick in deren Biologie und Evolution zu erhalten. Seit 2002 nimmt die Anzahl an veröffentlichten Sequenzdaten in der GenBank des NCBI kontinuierlich zu (Abb. 8; www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/growth.html).

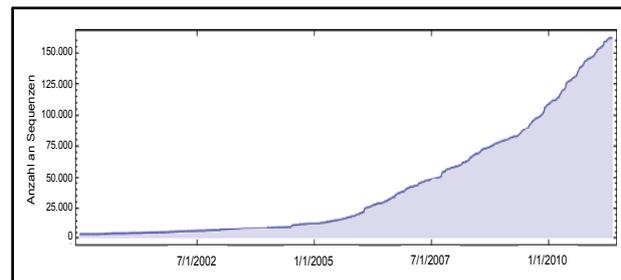


Abb. 8: Anzahl der in der GenBank des NCBI veröffentlichten Influenzasequenzen der Jahre 2002 bis 2010 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/growth.html)

Die Nachteile der auf Sanger basierenden Technik (aufwändige Probenvorbereitung, Auftrennung der Nukleinsäurefragmente im elektrischen Feld, geringe Parallelisierbarkeit) sowie die Nachfrage nach schnelleren und kostengünstigeren Verfahren, erforderten die Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien. 2006 gelangten die sogenannten *next generation sequencing* (NGS) -Technologien, zu denen die SOLiD- (Sequenzierung durch Ligation), die Pyro- sowie die Illumina/Solexa-Sequenzierung gehören, zur Anwenderreife. Seitdem ist in der GenBank ein exponentieller Zuwachs an Sequenzdaten zu verzeichnen. Dieser enorme Anstieg an Informationen ermöglicht es Influenzaviren genetische Linien zuzuordnen sowie stabile Infektketten zu identifizieren und einen detaillierten Einblick in die Evolution der Viren zu erhalten.

Mit der Illumina-Technologie können bis zu 120 Millionen Sequenzierungen pro Lauf erreicht werden, was ungefähr einer Datenmenge von 20 GB entspricht (Hankeln et al., 2009). Da die erzeugten *short reads* (75 bis 100 bp lange Fragmente) bei der Assemblierung langer Genome immer ein wenig problematisch sind, wird diese Technologie vorwiegend dann verwendet, wenn bereits eine Referenzsequenz zur Verfügung steht (Hankeln et al., 2009). Diese dient dann als Vorlage bei der Zuordnung der Reads. Anwendung findet die Illumina-Sequenzierung bei Genexpressions- und Transkriptomanalysen, der Identifizierung von small RNAs sowie von Protein-DNA/RNA-Interaktionen und der Re-Sequenzierung. Nachdem die DNA-Fragmente generiert und deren 3'-Enden durch Anhängen einer einzelnen A-Base modifiziert wurden, werden Adapter an das Fragment ligiert (Abb. 9 [A-C]). Die Adapter vermitteln anschließend eine sequenzspezifische Verbindung zwischen der DNA und den *capture oligos* der *flow cell* (Abb. 9 [D]). Das freie distale Adapter-ligierte Ende der ssDNA-Fragmente bindet wiederum aufgrund komplementärer Sequenzen an die freien *capture oligos*, wodurch eine Art Brücke entsteht (Abb. 9 [E]). Für die anschließende PCR, bei der der komplementäre Strang synthetisiert wird, fungieren die *capture oligos* als Primer. Die erste Kopie wird nach der Denaturierung des neuen dsDNA-Moleküls als Matrize für den nächsten Amplifikationsschritt herangezogen. Nach diesem Prinzip der *bridge amplification* werden bis zu 1000 Kopien hergestellt (Clusterbildung, Abb. 9 [F]). Nach Entfernung des komplementären Stranges und der freien Enden bindet der Sequenzierprimer an das distale Adapter-ligierte Fragmentende. Damit beginnt die eigentliche Sequenzierreaktion. Pro Zyklus wird ein farbstoffmarkiertes Nukleotid eingebaut, welches anschließend über Fluoreszenzmessung detektiert wird. Nach der Entfernung des Farbstoffes ist die Bindung des nächsten Nukleotides möglich. So wird Zyklus für Zyklus der Gegenstrang synthetisiert und gleichzeitig die Basenreihenfolge identifiziert (Abb. 9). Die Reads werden auf überlappende Bereiche hin untersucht und aligned. So entstehen Contigs, die zu Supercontigs zusammengesetzt werden bis schlussendlich die Konsensussequenz entsteht.

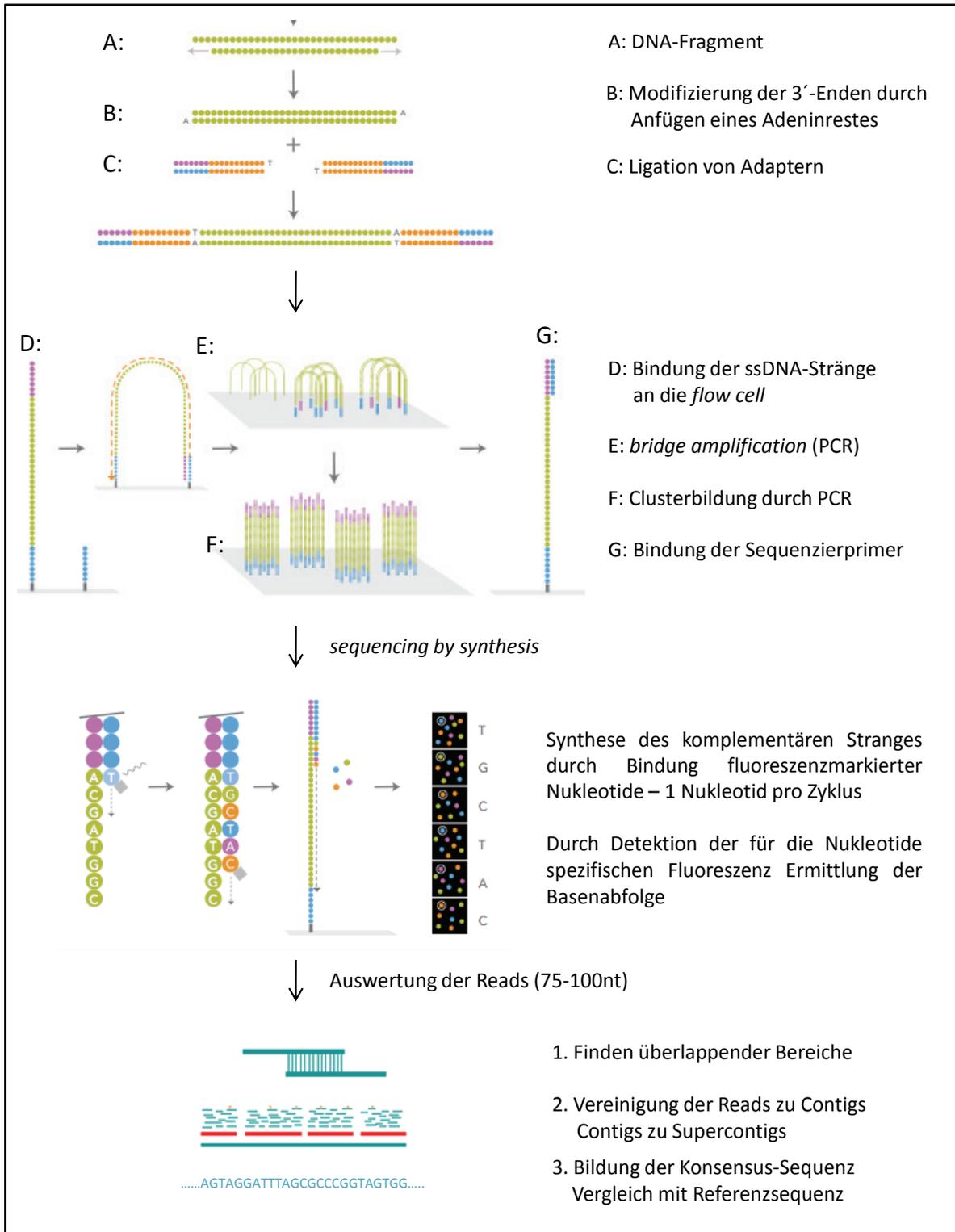


Abb. 9: Prinzip der Illumina-Sequenzierung (modifiziert nach www.illumina.com und Hankeln et al., 2009)

2.10. Reverse Genetik bei Influenza-A-Viren

Über Sequenzanalysen detektierte Aminosäuresubstitutionen, welche z.B. in Verdacht stehen, zur Virulenz der Viren beizutragen, können mittels reverser Genetik genauer untersucht werden. Nach Klonierung der Genomsegmente in einen Vektor erfolgt die zielgerichtete Mutagenese mit anschließender Synthese der rekombinanten Viren. Die Auswirkungen der Mutationen können dann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf Ebene der Transkription, Replikation, der Virulenz sowie der phänotypischen Ausprägung analysiert werden. Die Generierung rekombinanter Viren erfolgt nach dem von Hoffmann et al. (2000) eingeführten 8-Plasmid-System. Dabei wird jedes Segment in einen bidirektionalen Vektor kloniert. Das Insert befindet sich zwischen den Promotoren der RNA-Polymerase I und II, sowie einem Polymerase I-Terminator und einem Polyadenylierungssignal für die RNA-Polymerase II. Nach der Transfektion der Plasmide synthetisiert die zelluläre RNA Polymerase I negativ orientierte vRNA-Stränge, die Polymerase II virale mRNA. Die virale Polymerase (PB2, PB1, PA und NP), welche über die Translation der mRNA entstanden ist, transkribiert und repliziert die (-) vRNAs. Schließlich assemblieren die translatierten Proteine an die vRNP-Komplexe und neue infektiöse Viren werden freigesetzt. In Abbildung 10 ist das Prinzip der reversen Genetik bei Influenzaviren graphisch dargestellt.

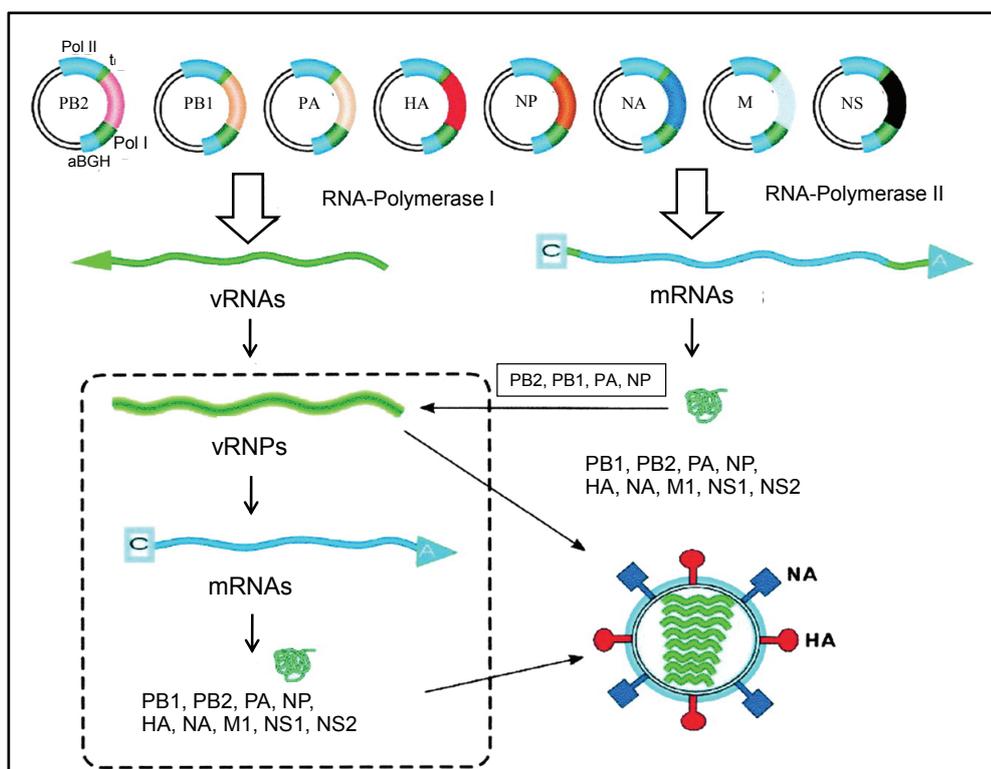


Abb. 10: Funktionsweise des 8-Plasmidensystems zur Generierung rekombinanter Influenza-A-Viren, modifiziert nach Hoffmann et al., 2002 (PNAS); Pol II: RNA-Polymerase II-Promotor, t_i : Terminator Polymerase I, Pol I: RNA-Polymerase-Promotor, aBGH (*bovine growth hormone*): Polyadenylierungssignal

2.11. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl phylogenetische Analysen als auch Untersuchungen mittels der reverser Genetik durchgeführt werden.

Im ersten Teil stand die genetische Charakterisierung von 59 europäisch porzinen Influenza-A-Viren im Vordergrund. Dabei sollte neben der bereits etablierten *cycle sequencing*-Methode eine weitere Technologie (Illumina/Solexa) auf ihre Anwendbarkeit, negativsträngige RNA-Viren zu entschlüsseln, getestet werden. Die Sequenzierung von Influenza-A-Viren mit anschließender Stammbaumberechnung sollte einen weiteren Einblick in die Evolution der Schweineinflenzaviren ermöglichen. Um die Stellung der eigenen Isolate besser beurteilen zu können, wurden für die Untersuchungen Vertreter der bisher bekannten Genotypen aus der GenBank herangezogen. Anhand der Alignments und der Stammbäume sollten die Viren untereinander verglichen und auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten untersucht werden. Dazu zählten auffällige Mutationen, Trunkierungen, Veränderungen im Glykosylierungsmuster sowie Aminosäuresubstitutionen, welche mit Resistenzentstehungen in Verbindung gebracht werden. Auch die Bildung von Clustern könnte Ursache einer oder mehrerer gemeinsamer Mutationen sein. Ebenfalls zu ermitteln waren Hinweise auf Reassortierungen und Transspeziesinfektionen.

Im zweiten Teil der Dissertation sollten nach der Herstellung und Etablierung eines revers-genetischen Systems Mutationen im Matrixprotein 2 untersucht werden. Durch die Generierung rekombinanter Viren ist eine nähere Charakterisierung von AS-Substitutionen, welche im Zusammenhang mit Resistenz oder Virulenz gebracht werden, möglich. In dieser Studie sollte sich auf die mit der Amantadin-Resistenz assoziierten AS 26, 27, 31 und 77 des M2-Proteins beschränkt werden. Anhand der eigenen Sequenzdaten konnten an Position 31 bisher nur zwei von 6 möglichen Serin-Codons identifiziert werden. Aufgrund dieser Beobachtung sollten zwei alternative Serin-Codons über die Generierung rekombinanter Viren bezüglich der Lebensfähigkeit und Amantadinempfindlichkeit der Viren getestet werden. Desweiteren sollte die Wirkung des Amantadins während einer 20fachen Passagierung der Serin-Rekombinanten untersucht werden. Inwieweit die AS-Substitutionen L26I, V27I und R77Q, welche in den eigenen Analysen nachweisbar waren, zur Resistenz gegenüber Amantadin beitragen, war ebenfalls Gegenstand der Studie.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Zellkulturen

I. Eukaryotische Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden von Herrn Dr. M. Schacke am Institut für Virologie und Antivirale Therapie Jena, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen (Temperatur: 37 ° C, CO₂-Gehalt: 5 %, Luftfeuchte: ~ 95 %).

MDCK-Zellen

Für die Bearbeitung virologischer Fragestellungen in Zellkultur wurden Madin Darby Canine Kidney- (MDCK) Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine adhärenente Zelllinie, welche erstmals 1958 aus der Niere eines adulten weiblichen Cocker Spaniels gewonnen werden konnte. Durch die Fähigkeit einen geschlossenen Zellrasen zu bilden, eignen sie sich sehr gut zur Beobachtung eines zytopathischen Effekts infolge einer Virusinfektion.

HEK-293-Zellen

Für die Synthese rekombinanter Viren wurden zusätzlich HEK-293-Zellen eingesetzt. Diese humanen embryonalen Nierenzellen sind unter anderem für ihre gute Transfizierbarkeit bekannt.

GMK-Zellen

Zur Überprüfung der Aktivität des viralen Polymerasekomplexes konnten die Green Monkey Kidney- (GMK) Zellen genutzt werden.

II. Bakterielle Kulturen

Für die Herstellung und Vermehrung der Plasmide sowie für die Mutagenesereaktionen wurde die *Escherichia coli*-Stämme DH5 α und JM107 verwendet. Diese kompetenten Zellen zeichnen sich durch eine hohe Anzahl von Genen aus, die für die Stabilität der Klonierung entscheidend sind. Als selektiver Marker für eine erfolgreiche Transformation konnte die Sensitivität gegenüber Ampicillin ausgenutzt werden. In Tabelle 3 ist die genotypische Charakterisierung beider Stämme aufgeführt.

Tab. 3: Genotyp der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	F' [ϕ 80d Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196
JM107	F' <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15 e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-pro) endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi-1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>glnV44 relA1</i>

3.1.2. Viren

Die für die Sequenzierung verwendeten porzinen Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 sind in der Tabelle 4 aufgelistet. Insgesamt konnten 33 Virusstämme mit der *cycle sequencing*-Methode und 26 Viren mittels der *next generation sequencing*-Technologie (NGS) von Illumina genetisch charakterisiert werden. Die Virusisolate wurden von der IDT Biologika GmbH Dessau-Roßlau zur Verfügung gestellt.

Tab. 4: Liste der sequenzierten Influenza-A-Viren

Sequenzierungsmethode	Virus	Subtyp
<i>cycle sequencing</i> und NGS	A/sw/Greven/IDT2889/04	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Tiefenbach/IDT2940/04-Plaque	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Wedel/IDT2965/04	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Seesen/IDT3055/04	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Visbek/IDT3311/2004	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Lohne/IDT3357/04	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Laer/IDT3893/05	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Osterhofen/IDT4004/05	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Wohlerst/IDT4093/05	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Voglarn/IDT4096/05	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Harkenblek/IDT4097/05	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Merzen/IDT4114/05	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Laer/IDT4126/05	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Kroge/IDT4192/05	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Nordkirchen/IDT5062/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Holzheim/IDT5102/06	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Spenge/IDT5117/06	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Hiltten/IDT5143/06	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Ortenburg/IDT5144/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Melle/IDT5190/06	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Gescher/IDT5194/06	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Nienburg/IDT5208/06	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Egglham/IDT5250/05	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Salzkotten/IDT5275/06	H3N2

Fortsetzung Tab. 4: Liste der sequenzierten Influenza-A-Viren

Sequenzierungsmethode	Virus	Subtyp
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Raffelsdorf/IDT5418/06	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Büren/IDT5439/06	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Rotthalmünster/IDT5536/06	H1N2
NGS-Illumina	A/sw/Friesoythe/IDT5548/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Friesoythe/IDT5549/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Kassel/IDT5550/06	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Herbrunn/IDT5564/06-Plaque	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06-Plaque	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Balve/IDT5603/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Gütersloh/IDT5610/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Geseke/IDT5638/06-Plaque	H1N2
NGS-Illumina	A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Nordhorn/IDT5657/06-Plaque	H1N1
NGS-Illumina	A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06-Plaque	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Damme/IDT5673/2006	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Melle/IDT5706/2006	H3N2
NGS-Illumina	A/sw/Velen/IDT5730/06-Plaque	H1N2
NGS-Illumina	A/sw/Reken/IDT5731/06-Plaque	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006	H1N1
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Bondelum/IDT5959/2007	H3N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Riege/IDT6014/2007	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Dinklage/IDT6017/2007	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Kitzen/IDT6142/2007	H1N2
<i>cycle sequencing</i>	A/sw/Gent/V230/92	H1N1

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen mittels reverser Genetik dienten folgende Virusstämme vom Subtyp H1N1: A/WSN/33; A/sw/Potsdam/15/81 (p8) sowie A/sw/Belzig/2/01 (p11).

3.1.3. Vektoren und Plasmide

Vektoren

Die für die Plasmidkonstruktion verwendeten Vektoren sind in der Abbildung 11 dargestellt. Jeder der drei Vektoren verfügt über einen Replikationsursprung (*ori* - *origin of replication*), eine *multiple cloning site* (*mcs*) sowie einem β -Lactamase-Gen (*bla*, Amp^R). Letzteres bewirkt eine Resistenz gegenüber Ampicillin und kann als Selektionsmarker herangezogen werden. Die *mcs* des pUC19-Vektors liegt innerhalb eines modifizierten *lac*-Operons, welches die CAP-Proteinbindestelle, den P_{lac}-Promotor, die *lac*-Repressorbindestelle sowie den 5'-terminalen Abschnitt des *lacZ*-Gens enthält. Letzteres kodiert für den N-terminalen Anteil der β -Galaktosidase, dessen Synthese durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert wird. Das so entstandene α -Peptid ermöglicht die Komplementation der Δ M15-Mutation im *lacZ*-Gen des F-Plasmides, und phänotypisch blaue Kolonien werden in Anwesenheit von X-Gal gebildet. Durch den Einbau von DNA innerhalb der *mcs* wird der Leserahmen des veränderten *lacZ*-Gens zerstört und die α -Komplementation aufgehoben. Die daraus resultierenden Kolonien weisen eine Weißfärbung auf. Im pJET1.2 ist anstelle des modifizierten *lacZ*-Gens das letale Gen *eco417IR* eingebaut, welches durch DNA-Insertion inaktiviert wird.

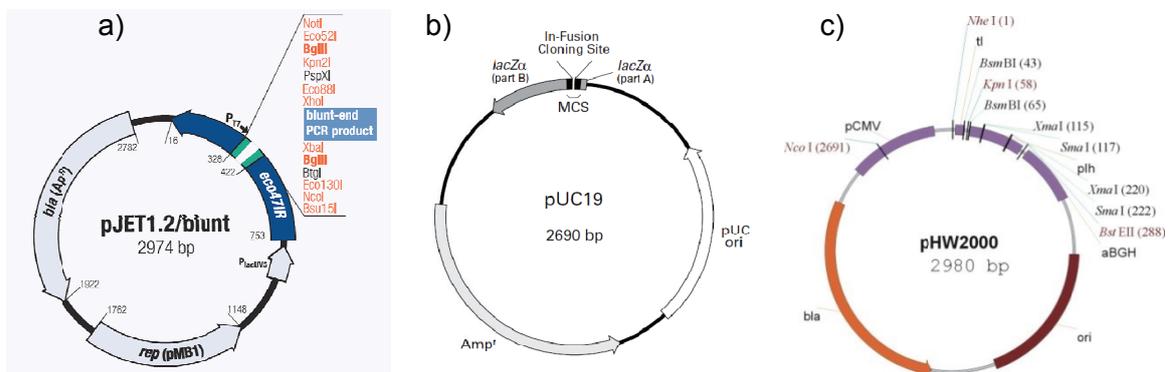


Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren; **a)** pJET1.2 (Fermentas): *bla* (Amp^R): β -Laktamase-Gen; *rep* (pMB1): Replikationsursprung; *eco417IR*: letales Gen; **b)** pUC19 (M. Görlach): Amp^R: β -Laktamase-Gen; *pUC ori*: Replikationsursprung; *lacZ α* : 5'-terminaler Teil des β -Galaktosidase-Gens; **c)** pHW2000: *bla*: β -Laktamase-Gen; *ori*: Replikationsursprung; *pCMV*: Polymerase II-Promoter (Cytomegalie-Virus); *plh*: humaner Polymerase I-Promotor; *tl*: Terminator für Pol I; *aBGH* (*bovine growth hormone*): Polyadenylierungsstelle

Plasmide

Die von Dr. J. Stech zur Verfügung gestellten Plasmide bestehen aus der pHW16-Vektorkomponente und eines der acht Genomsegmente des humanen Influenza-A-Virus A/WSN/33 (H1N1).

Die Funktionalität des viralen Polymerasekomplexes wurde mit Hilfe eines weiteren Plasmides überprüft. Hierfür wurde in einem pHW2000-Vektor mit fehlendem pCMV das Gen für das Grün fluoreszierende Protein (GFP) eingebaut.

3.1.4. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden vorwiegend am Institut für Virologie und Antivirale Therapie von Dr. E. Birch-Hirschfeld synthetisiert. In Tabelle 5 sind die Primer für die reverse Transkription und für die Herstellung der Segmente aufgelistet. Die Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung der internen Fragmente sind dem Anhang (Tabelle A2) beigefügt. Die für die Illumina/Solexa-Sequenzierung benötigten Primer sind in der Tabelle 6 erfasst. Eine Übersicht der für die reverse Genetik verwendeten Oligonukleotide bietet Tabelle 7. Rot markierte Buchstaben kennzeichnen Restriktionsenzymkennungssequenzen und Mutationsstellen.

Tab. 5: Primer für die reverse Transkription und Segmentamplifikation

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
Influenza-5'	12 b	5'-RGCRAAAGCAGG-3'	Reverse Transkription
BaPB2-1	27 b	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGT-3'	PCR Segment 1 (PB2)
BaPB2-2341R	34 b	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT-3'	
BmPB1-1	28 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA-3'	PCR Segment 2 (PB1)
BmPB1-2341R	33 b	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT-3'	
BmPA-1	29 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC-3'	PCR Segment 3 (PA)
BmPA-2233R	33 b	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT-3'	
BmHA-1	28 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG-3'	PCR Segment 4 (HA)
BmHArev	35 b	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'	
BmNP-1	29 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA-3'	PCR Segment 5 (NP)
BmNP-1565R	36 b	5'-ATATCTTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT-3'	
BaNA-1	29 b	5'-TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT-3'	PCR Segment 6 (NA)
BaNA-1413R	36 b	5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT-3'	
BmM-1	29 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG-3'	PCR Segment 7 (M)
BmM-1027R	36 b	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT-3'	
BmNS-1	29 b	5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG-3'	PCR Segment 8 (NS)
BmHArev	35 b	5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'	

Tab. 6: Primer für die Illumina/Solexa-Sequenzierung

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
Influenza-5'	12 b	5'-RGCRAAAGCAGG-3'	Reverse Transkription
PA-Dekamer	10 b	5'-TGCATGAAGA-3'	Reverse Transkription
Nonamer	9 b	d(N) ₉ [N=A, C, G, T]	Reverse Transkription
Random-Primer	6 b	d(N) ₆ [N=A, C, G, T]	Reverse Transkription
Index PE-Adapter Oligo-Mix	20 b	5'-P-GATCGGAAGAGCACACGTCT-3'	Ligation
	33 b	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'	
InPE 1.0	58 b	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'	Amplifikation
InPE 2.0	34 b	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'	Amplifikation
PCR-Pr. Index 1	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTC-3'	Index 1
PCR-Pr. Index 2	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTC-3'	Index 2
PCR-Pr. Index 3	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTC-3'	Index 3
PCR-Pr. Index 4	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTC-3'	Index 4
PCR-Pr. Index 5	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTC-3'	Index 5
PCR-Pr. Index 6	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTGGAGTTC-3'	Index 6
PCR-Pr. Index 7	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTC-3'	Index 7
PCR-Pr. Index 8	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAGTGACTGGAGTTC-3'	Index 8
PCR-Pr. Index 9	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTC-3'	Index 9
PCR-Pr. Index 10	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCTAGTGACTGGAGTTC-3'	Index 10
PCR-Pr. Index 11	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTC-3'	Index 11
PCR-Pr. Index 12	43 b	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTC-3'	Index 12

Tab. 7: Reverse Genetik-Primer (p8 = A/sw/Potsdam/15/81; p11 = A/sw/Belzig/2/01)

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
pJET1.2 fw	24 b	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGCC-3'	Kolonie-PCR
pJET1.2 rev	25 b	5'-GAAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	
pUC-seq	21 b	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC-3'	Kolonie-PCR
pUC rev	24 b	5'-GAGCGGATAACAATTTACCACAGG-3'	
pHW-50eF	18 b	5'-CTCACTATAGGGAGACCC-3'	Kolonie-PCR
pHW-50eR	19 b	5'-GAGGTATATCTTTCGCTCC-3'	

Fortsetzung Tab. 7: Reverse Genetik-Primer (p8 = A/sw/Potsdam/15/81; p11 = A/sw/Belzig/2/01)

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
08-PB2-Kpn-A	54 b	5'-CTAGCTGGTACCAGCGTCTCGGGGAGCGAAAGC AGGTCAAATATATTCAATATG-3'	PCR Fragment A PB2 p8
08-PB2-Xba-A	36 b	5'-TGCTAGTCTAGAGACATTATCAATAGGTTCAATT CC-3'	
08-PB2-Kpn-B	36 b	5'-GTACGCGGTACCATTGCATGATTAAGGCTGTCCG AG-3'	PCR Fragment B PB2 p8
08-PB2-Xba-B	71 b	5'-GATCGATCTAGACGTCTCTTATTAGTAGAAACAA GGTCGTTTCTAATTGATGGCCATCCGAATTCTTTT GG-3'	
PB2 p8 mut1	32 b	5'-CAGCTGATAGTAAGTGAAGGGACGAACAGTC-3'	Mutation <i>BsmBI</i> Fragm. A p8
PB2 p8 mut2	30 b	5'-CTTCCACTTACTATCAGCTGAATCAGCCTT-3'	
PB2 p8 mut3	32 b	5'-AACGTGTTGATAGGGCAAGGCCGACGTGGTGT-3'	Mutation <i>BsmBI</i> Fragm. B p8
PB2 p8 mut4	30 b	5'-CCTTGCCCTATCAACACGTTAGCTTTTTCC-3'	
pHW-PB2-Msc	62 b	5'-CATTACTGGCCATCAATTAGTGTCGAATAGTTTAA AAACGACCTTGTCTACTAATAACCC-3'	Reparatur 3'- NTR PB2 p8
pHW-PB2-Apa	24 b	5'-ACCAGAGGGCCCGGGCGCTCCGT-3'	
forw-PB2	88 b	5'-CCGGAGTACTGGTCGACCTCCGAAGTTGGGGGG GAGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATGGAA AGAATAAAGAATTAAGAGAT-3'	Inverse PCR PB2 p11
rev-PB2	85 b	5'-CGCTCCGAGTCGGCATTGTTGGCCGCGGGTTAT TAGTAGAAACAAGGTCGTTTCTAATTGATGGCCAT CCGGATTCTTTGGTC-3'	
G914A-PB2-1	34 b	5'-TGGTGGGATAAGGATGATTGACATCCTTAGACAA-3'	Mutagenese nt G914A PB2 p11
G914A-PB2-2	30 b	5'-CAATCATCCTTATCCACCAATTTGTGTGC-3'	
A1284T-PB2-1	32 b	5'-GCTGTCCGAGGTGATCTGAAATTTGTAAACAG-3'	Mutagenese A1284T PB2 p11
A1284T-PB2-2	31 b	5'-TTCAGATCACCTCGGACAGCCTTATCATGC-3'	
G1502A-PB2-1	34 b	5'-GGATGAATATTCCAGCACTGAAGAGTGGCTGTG-3'	Mutagenese G1502A p11
G1502A-PB2-2	31 b	5'-CAGTGCTGGAATATTCATCCACTCCCGTTTT-3'	
A1786G-PB2-1	33 b	5'-TTCAGTCTCTAGTACCTAAGGCAAACAGAGGTC-3'	Mutagenese A1786G p11
A1786G-PB2-2	33 b	5'-CTTAGGTAAGACTGAAATGGCTCAAATTC-3'	
2195-A-PB2-1	33 b	5'-TGCAAAAGGGGAGAAAGCCAACGTGCTGATAG G-3'	Mutagenese 2195A PB2 p11
2195-A-PB2-2	33 b	5'-TGGCTTCTCCCCTTTGCAAGATTACTCAGTT-3'	
08-PB1-Kpn-A	51 b	5'-CTAGCTGGTACCAGCGTCTCGGGGAGCGAAAGC AGGCAAACCATTTGAATG-3'	PCR Fragment A PB1 p8/p11
08-PB1-Xba-A	36 b	5'-TGCTAGTCTAGATCCCACCAGTATGTGGTTTTGG TG-3'	
08-PB1-Kpn-B	36 b	5'-GTACGCGGTACCAATAGATGGCACGGCCTCATTG AG-3'	PCR Fragment B PB1 p8
08-PB1-Xba-B	94 b	5'-GATCGATCTAGACGTCTCTTATTAGTAGAAACAAG GCATTTTTTTCATGAAGGACAAGCTAAATTCCTAC TTCTGCCGCTGAGCTCTTCAATG	
11-PB1-Kpn-B	38 b	5'-GTACGCGGTACCTCACAAGATACAGAGCTCTCC TTTAC-3'	PCR Fragm. B p11 mit 08-PB1-Xba-B
PB1-p8-mut1	34 b	5'-TTTGAAACCTCGTGTCTTGAACAATGGAGGTT G-3'	Mutation <i>BsmBI</i> Fragm. A p8
PB1-p8-mut2	30 b	5'-TCAAGACACGAGGTTTCAAATATCCCTGGG-3'	

Fortsetzung Tab. 7: Reverse Genetik-Primer (p8 = A/sw/Potsdam/15/81; p11 = A/sw/Belzig/2/01)

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
PB1-p11-mut1	34 b	5'-TTTGAAAACCTCGTGTCTTGAACAAATGGGGGTT G-3'	Mutation <i>BsmBI</i> Fragm. A p11
PB1-p11-mut2	30 b	5'-TCAAGACACGAGTTTTTCAAATATCCCTGGG-3'	
forw-PA	85 b	5'-CCGGAGTACTGGTCGACCTCCGAAGTTGGGGGG GAGCGAAAGCAGGTACTGATTCAAATGGAAGAC TTTGTGCGGCAATACTTC-3'	Inverse PCR PA p11
rev-PA-2	119 b	5'-CGCTCCGAGTCGGCATTTTGGGCCGCCGGGTTA TTAGTAGAAACAAGGTACTTTTTTGGACAGTATGG ATAGCAAGTAGTAGCATTGCCACAACACTATTTTCAGT GCATGCACAAGGAAGG-3'	
PA-p11-mut1	33 b	5'-AGCAGGTAAGTATTCAAATGGAAGACTTTGTG-3'	Reparatur Start pHW-[PA-p11]
PA-p11-mut2a	30 b	5'-ATTTTGAATCAGTACCTGCTTTCGCTCCCC-3'	
08-PA-5'	45 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAGCAGGTACT GATTCAAATG-3'	PCR Fragment A PA p8
08-PA-Psp2	52 b	5'-AATCTGTTGTAAGCTTTGAAGAAGGCAACGCCTCA TTCCATACCCCACTTC-3'	
08-PA-Psp-1	38 b	5'-CTTCTTCAAAGCTTACAACAGATTGAGAGCATGA TCGA-3'	PCR Fragment B PA p8
08-PA-3'	66 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGTA CTTTTTTGGACAGTATGGATAGCAAATAGTAG-3'	
08-HA-5'	48 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAGCAGGGGA AAAATTAATCAACC-3'	PCR Segment HA p8
08-HA-3'	88 b	5'-GATCGATCCGTCTGTTATTAGTAGAAACAAGGGT GTTTTTCCTTATATTTCTGAAATCCTAATCTCAAAT GCATACTCTGCATTGCAA-3'	
11-HA-5'	47 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAGCAGGGGA TAATTAATCAACC-3'	PCR Segment HA p11
11-HA-3'	88 b	5'-GATCGATCCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGGT GTTTTTCCTTATATTTCTGAAATCCTAATCTCAAAT GCATACTCTGCATTGCAA-3'	
08-NP-5'	81 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAGCAGGGTA GATAATCACTCACTGAGTGACATTCACATCATGGC ATCTCAAGGCACC-3'	PCR-Fragment A NP p8
08-NP-2	54 b	5'-CAGAATGAATTCTCTCATCCATTTTCCATCCCTCTT TCTGTAGATTGGACCTCC-3'	
08-NP-1	33 b	5'-TGGATGAGACAATTGATTCTGTATGACAAAGAG-3'	PCR-Fragment B NP p8
08-NP-3'	70 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGGTA TTTTTCTTTAATTGTCATACTCCTCTGCATTGTA-3'	
11-NP-5'	81 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAGCAGGGTAA ATAATCACTCACTGAGTGACACTCACATCATGGCA TCTCAAGGCACC-3'	PCR-Fragment A NP p11
11-NP-2	54 b	5'-CAGAATGAATTCTCTCACCCATTTTCCATCCCTCTT TTTGTAGATTGGGCCTCC-3'	
11-NP-1	34 b	5'-TGGGTGAGACAATTGATTCTGTATGACAAAGAT G-3'	PCR-Fragment B NP p11
11-NP-3'	70 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGGTA TTTTTCTTTAATTGTCAAACTCCTCTGCATTGTC-3'	
08-NA-3'	72 b	5'-GATCGATCCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGAGT TTTTTGAACAAATTACTTGTCAATGGTGAATGGCA AC-3'	PCR Segm. NA p8 mit 11-NA-5'

Fortsetzung Tab. 7: Reverse Genetik-Primer (p8 = A/sw/Potsdam/15/81; p11 = A/sw/Belzig/2/01)

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Verwendung
11-NA-5'	65 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAAGCGAAAGCAGGAGT TTAAATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACC-3'	PCR Segment NA p11
11-NA-3'	72 b	5'-GATCGATCCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGAGT TTTTTGAACAAATTACTTGTCAATGGTAAATGGCAA C-3'	
08-M-5'	46 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAAGCAGGTAGA TATTTAAAGATG-3'	PCR Segment M p8 und p11
08-M-3'	66 b	5'-GATCGATCCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGTAG TTTTTACTCCAGCTCTATGTTGACAAAATG-3'	
08-NS-5'	47 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCGGGGAGCAAAAGCAGGGTG ACAAAAACATAATG-3'	PCR Segment NS p8 und p11
08-NS-3'	68 b	5'-CTAGCTAGCGTCTCTTATTAGTAGAAACAAGGGTG TTTTTTATCATTAAATAAGTCGAAACGAGAAAG-3'	
8MUT-I M-forw	33 b	5'-ATCCTCTCGTTATTGCAGCATCTATCATTGGGA-3'	Mutation S31S M2 p8
8MUT-I M-rev	30 b	5'-TGCTGCAATAACGAGAGGATCACTTGAATC-3'	
8MUT-II M-forw	34 b	5'-ATCCTCTCGTTATTGCAGCATCAATCATTGGGAT-3'	Mutation S31S M2 p8 mit 8MUT-I M-rev
8MUT-V M-forw	33 b	5'-ATCCTCTCGTTATTGCAGCAAATATCATTGGGA-3'	Mutation S31N M2 p8 mit 8MUT-I M-rev
8MUT VI M-forw	32 b	5'-GTCCATGAGGGAAGAATATCACAGGAACAGC-3'	Mutation R77Q M2 p8
8MUT VI M-rev	30 b	5'-GATATTCTTCCCTCATGGACTCAGGCACTC-3'	
8MUT-VII M-forw	32 b	5'-GCAGCGATTCAAGTGATCCTATCGTTATTGCA-3'	Mutation L26I M2 p8
8MUT-VII M-rev	30 b	5'-AGGATCACTTGAATCGCTGCATCTGCACCC-3'	
8MUT-VIII M-forw	32 b	5'-GCGATTCAAGTGATCCTCTCATTATTGCAGCA-3'	Mutation V27I M2 p8
8MUT-VIII M-rev	30 b	5'-GAGAGGATCACTTGAATCGCTGCATCTGCA-3'	
11MUT-I M-forw	32 b	5'-TCCTCTCGTCGTTGCGGCAAATATCATTGGGA-3'	Mutation N31S M2 p11
11MUT-I M-rev	30 b	5'-TTGCCGCAACGACGAGAGGATCACTTGAAC-3'	
11MUT II M-forw2	32 b	5'-GTCCATGAGGGAAGAATATCGACAGGAACAGC-3'	Mutation Q77R M2 p11 mit 8MUT VI-rev

3.1.5. Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Enzyme einschließlich der Erkennungssequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8: Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Apal</i>	5' G↓GGCC C 3' 3' C CCGG↑G 5'	Fermentas
<i>AvrII</i>	5' C↓CTAG G 3' 3' G GATC↑C 5'	Fermentas
<i>BamHI</i>	5' G↓GATC C 3' 3' C CTAG↑G 5'	Fermentas
<i>BglII</i>	5' A↓GATC T 3' 3' T CTAG↑A 5'	Fermentas
<i>BsmBI/EspIII</i>	5' CGTCTC (N) ₁ ↓ 3' 3' GCAGAG (N) ₅ ↑ 5'	Fermentas
<i>DraI</i>	5' TTT↓AAA 3' 3' AAA↑TTT 5'	Fermentas
<i>EcoRI</i>	5' G↓AATT C 3' 3' C TTAA↑G 5'	Fermentas
<i>KpnI</i>	5' G↓GTAC C 3' 3' C CATG↑G 5'	Fermentas
<i>Kpn2I</i>	5' T↓CCGG A 3' 3' A GGCC↑T 5'	Fermentas
<i>MscI</i>	5' TGG↓CCA 3' 3' ACC↑GGT 5'	Fermentas
<i>MunI</i>	5' G↓AATT G 3' 3' C TTAA↑C 5'	Fermentas
<i>NotI</i>	5' GC↓GGCC GC 3' 3' CG CCGG↑CG 5'	Roche
<i>NsiI</i>	5' A↓TGCA T 3' 3' T ACGT↑A 5'	Fermentas
<i>Psp1406I</i>	5' AA↓CG TT 3' 3' TT GC↑AA 5'	Roche
<i>SalI</i>	5' G↓TCGA C 3' 3' C AGCT↑G 5'	Fermentas
<i>SmaI</i>	5' CCC↓GGG 3' 3' GGG↑CCC 5'	Fermentas
<i>XbaI</i>	5' T↓CTAG A 3' 3' A GATC↑T 5'	Fermentas
<i>XhoI</i>	5' C↓TCGA G 3' 3' G AGCT↑C 5'	Fermentas

3.1.6. Chemikalien und Grundstoffe

Eine Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Grundstoffe bietet Tabelle 9.

Tab. 9: Substanzen, Chemikalien und Grundstoffe

Substanz/Bezeichnung	Hersteller
2xEMEM	SIGMA, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	SERVA, Heidelberg
Agar	BIODEAL, Markkleeburg
Agarose	BIOZYM, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	BOEHRINGER, Mannheim
Amantadin (187,7 g/mol)	SIGMA, Deisenhofen
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
Borsäure	ROTH, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	FLUKA, Buchs, Schweiz
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA, Deisenhofen
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	BOEHRINGER, Mannheim
EMEM	LONZA, Verviers, Belgien
Essigsäure	FLUKA, Buchs, Schweiz
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
FKS (fetales Kälberserum)	PAA, Cölbe
Formaldehyd	VEB LABORCHEMIE, Apolda
Glycerin 87 %	MERCK, Darmstadt
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Kristallviolett, pulv.	Dr. G. GRÜBLER & CO, Leipzig
LB-Medium	Qbiogene, Heidelberg
Na-Bicarbonat	LONZA, Verviers, Belgien
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
NEAA (nichtessentielle Aminosäuren)	LONZA, Verviers, Belgien
Penicillin	CAMBREX, Verviers, Belgien
Streptomycin	CAMBREX, Verviers, Belgien
Tris	MERCK, Darmstadt
Trypsin	BERLIN CHEMIE, Berlin

3.1.7. Arbeitslösungen

3.1.7.1. Medien für Bakterien- und Zellkulturen

Für die Arbeiten mit *Escherichia coli* wurden Medien (25 g LB-Medium auf 1 l Aqua bidest) sowohl mit als auch ohne Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) verwendet. Festmedien konnten durch die Zugabe von Agar (20 g auf 1 l Aqua bidest) hergestellt werden.

Für die Kultivierung von MDCK- und HEK-293-Zellen wurde das **Eagle Minimum Essential Medium** (EMEM) mit Zusatz von 10 % FKS, 1 % NEAA-X, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin verwendet. Das Infektionsmedium bestand aus dem Antibiotika-versetztem EMEM einschließlich 2 mM L-Glutamin, 1,3 % Na-Bikarbonat und 2 µg/ml Trypsin. Die GMK-Zellen wurden in **Dulbecco's Modified Eagle Medium** mit 10 % FKS kultiviert.

3.1.7.2. Lösungen für die Zellkultur

Trypsin (Infektionsmedium):	18 mg Trypsin auf 3 ml Aqua bidest sterilfiltriert (0,45 µm)
Trypsin/Versen:	0,4 % (w/v) Trypsin + 0,1 % (w/v) EDTA + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Kristallviolettlösung:	1 g Kristallviolett + 100 ml Ethanol + 47,3 ml Formaldehyd mit Aqua bidest auf 500 ml auf- füllen

3.1.7.3. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

DEPC-Wasser:	1000 ml Aqua bidest + 1 ml Diethylpyrocarbonat
3 M NaOH:	12 g NaOH + 100 ml Aqua bidest
3 M Na-Acetat	16,7 ml konzentrierte Essigsäure pH-Wert-Einstellung mit 3 M NaOH, auf 100 ml mit Aqua bidest auffüllen
100 mM EDTA pH 8	3,72 g EDTA + 100 ml Aqua bidest; Einstellung des pH-Wertes (NaOH bzw. Essigsäure)
5x TBE-Puffer	54 g Tris + 27,5 g Borsäure + 4,65 g EDTA mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen, pH 8

3.1.8. Technische Ausstattung

Tab. 10: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	HERAEUS, Hanau
Brutschrank ohne CO ₂ -Begasung	HERAEUS, Hanau
Durchlichtmikroskop Telaval 3	CARL ZEISS, Jena
Fluoreszenzmikroskop	CARL ZEISS, Jena
Gelelektrophoresekammern	PECLAB, Erlangen
PCR Thermo Cycler	EPPENDORF, Hamburg
Zentrifuge Biofuge pico	HERAEUS, Hanau
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Biofuge 22R	HERAEUS, Hanau
CEQ8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Krefeld
Illumina Genome Analyser	Illumina
Werkbank HERA safe	HERAEUS, Hanau

3.2. Methoden

3.2.1. Sequenzierung mit CEQ8000 Genetic Analysis System

I. Virusvermehrung in MDCK-Zellen

Die Virusanzucht und -vermehrung erfolgte in MDCK-Zellen. Diese wurden zwei Tage vor Infektion mit einer Zelldichte von $2,3 \cdot 10^5$ Zellen pro ml ausgesät und bei 37 ° C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die MDCK-Zellen mit Trypsin- und Na-Bicarbonat versetztem EMEM (Infektionsmedium) gewaschen, mit Virussuspension beimpft und bei Standardbedingungen inkubiert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurde das virushaltige Medium entfernt und durch frisches Infektionsmedium ersetzt. Bis zum Erreichen eines deutlich sichtbaren zytopathischen Effektes (zpE) erfolgte die Inkubation unter gleichen Bedingungen.

II. Präparation der Gesamt-RNA aus virusinfizierten MDCK-Zellen

Die Isolierung der RNA aus der Zellkultur erfolgte mit dem *RNeasy® Mini Kit* von QIAGEN. Zunächst wurden die vom Gefäßboden abgelösten Zellen mittels 5-minütiger Zentrifugation bei 2.000 rpm pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µl RLT-Puffer, 6 µl β-Mercaptoethanol und 600 µl 70 % Ethanol resuspendiert. Das Lysat konnte nun auf eine RNeasy-Säule überführt und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert werden. Die an die Säulenmembran gebundene RNA wurde zunächst mit

700 µl RW1-Puffer gewaschen und anschließend zweimal mit 500 µl RPE-Puffer versetzt (10.000 rpm, 15 sec). Durch die Zugabe von 30-50 µl RNase freien Wassers und einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Elution der RNA aus der Säule. Die Konzentration der Gesamt-RNA konnte unter Verwendung des Photometers Ultraspec2000 ermittelt werden.

III. Reverse Transkription

Zur Synthese der cDNA wurden 5 µg RNA oder maximal 10 µl RNA-Suspension mit 1 µl Influenza-5'-Primer versetzt und gegebenenfalls mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz inkubierte anschließend für 5 min bei 70 ° C. Nach Zugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 U; Fermentas) und 1,5 µl DEPC-Wasser erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 37 ° C. Damit die virale RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte, wurde dem Ansatz 1 µl retrovirale Reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus, 10000 U; Fermentas) beigefügt. Nach 1-stündiger Inkubation erfolgte ein Denaturierungsschritt von 10 min bei 70 ° C. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 ° C aufbewahrt.

IV. Amplifikation der Virussegmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung von Genomabschnitten mittels zyklischer Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritten. Für die Amplifikation der benötigten Genomsegmente wurden die *DreamTaq* DNA-Polymerase von Fermentas sowie die in Tabelle 5 aufgeführten Primer verwendet. Der PCR-Ansatz für die Synthese der Segmente (*full-length*) setzte sich wie folgt zusammen:

38,7 µl	DEPC-H ₂ O
5,0 µl	10x Dream Taq Buffer (Fermentas)
1,0 µl	10 mM dNTPs (Fermentas)
2,0 µl	Sense Primer (10 µM)
2,0 µl	Antisense Primer (10 µM)
0,3 µl	DreamTaq (5 u/µl)
1,0 µl	cDNA

Aus den so gewonnenen *full-length*-Amplifikaten wurden mittels spezifischer Primer (Tabelle A2) sich überlappende DNA-Fragmente nach gleichem Prinzip hergestellt. Der zeitliche Ablauf der PCR zur Synthese der *full-length*-Amplifikate (bis zu 2341 bp) sowie der internen DNA-Fragmente (bis zu 1200 bp) ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: PCR-Bedingungen zur Synthese der *full-length*-Amplifikate sowie der internen Fragmente

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	5 min	94 ° C	Denaturierung
40	30 sec 50 sec 1min/kb	94 ° C 55 ° C 72 ° C	Denaturierung Primer-Annealing DNA-Polymerisation
1	7 min	72 ° C	Final-Extension
1	hold	4 ° C	Abkühlung der Proben bis Entnahme

V. Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Amplifikate in einem mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzten Agarosegel analysiert. Abhängig von der Größe der PCR-Produkte wurde ein 1 bzw. 1,5 %-iges Gel verwendet. Der aufzutragende Ansatz bestand aus 4 µl Aqua bidest, 4 µl DNA-Ladepuffer und 2 µl Amplifikat. Zur Größeneinordnung der darzustellenden DNA-Fragmente dienten die Standardmarker ϕ X174/HaeIII und λ HindIII von Fermentas. Die angelegte Spannung betrug 130 Volt. Nach einer Laufzeit von 30-45 min waren die durch das Ethidiumbromid gefärbten Banden mittels UV-Licht sichtbar und konnten ausgewertet werden. Die zu erwartenden Größen der *full-length*-Amplifikate sind in Abbildung 12 dargestellt.

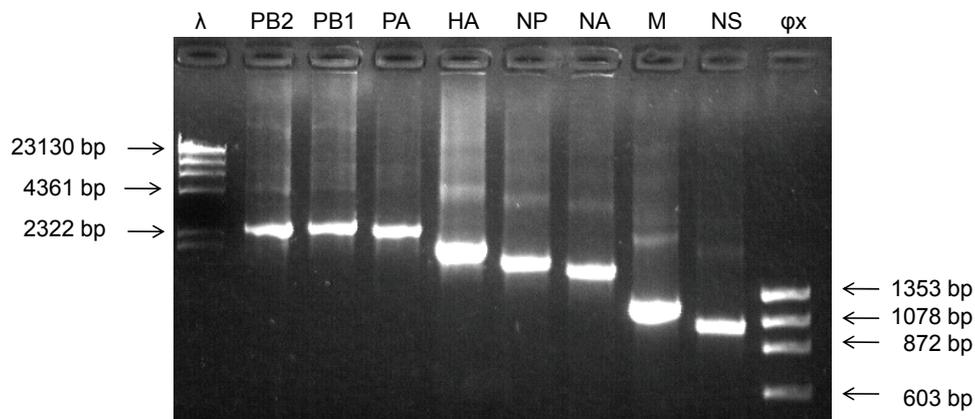


Abb. 12: Darstellung der *full-length*-Amplifikate der Genomsegmente PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M und NS sowie der Größenstandards λ HindIII und ϕ X174/HaeIII in einem 1 %-igen Agarosegel

VI. DNA-Gelextraktion

Die Gewinnung von reiner Fragment-DNA erfolgte durch das Entfernen von Pufferrückständen, Enzymen, Primern sowie unspezifischen Fragmenten mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von QIAGEN. Zunächst wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 14 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen eines 1,5 %-igen Geles pipettiert. Die

Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 120 V und einer Laufzeit von 1:30 h. Anschließend wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und in 2 ml-Tubes gewogen. Das Gewicht wurde in μg angegeben und mit 3 multipliziert. Das Ergebnis ergab die Menge [μl] an QG-Puffer, die den Gelstückchen beizufügen war. Die Proben wurden auf 50 ° C für 10 min erhitzt und zwischendurch mittels Vortexer gemischt. Durch diesen Prozess löste sich das Gel auf und die DNA wurde freigesetzt. Bei Fragmenten unter 400 bp erfolgte eine Zugabe von einer Volumeneinheit Isopropanol. Anschließend wurde die Lösung auf die QIAquick® Säule überführt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Damit keine Reste von Agarose in der Säule verbleiben, erfolgte die Zugabe von 500 μl QG-Puffer. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden 750 μl PE-Puffer auf die Säulen pipettiert und nochmals zentrifugiert. Um Rückstände des Ethanols zu entfernen, war ein weiterer Zentrifugationsschritt von 2 min bei 14.000 rpm nötig. Nach Überführung der Säule in ein 1,5 ml-Tube erfolgte, abhängig von der Stärke der ausgeschnittenen Bande, die Zugabe von 20-50 μl EB-Puffer. Die abschließende Zentrifugation von 2 min bei 13.000 rpm wurde nach 1 min Inkubationszeit durchgeführt. Die so eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 ° C aufbewahrt.

VII. Sequenzierreaktion und Fällung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte nach dem *cycle sequencing*-Verfahren, eine Modifizierung (Slatko, 1996) der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Mit Hilfe einer modifizierten Taq-Polymerase werden einzelsträngige Kopien des zu sequenzierenden Fragmentes hergestellt. Beim Einbau der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) wird die Strangsynthese abgebrochen. So entstehen DNA-Fragmente jeder Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden. Diese Amplifikate werden in einer Kapillare des CEQ8000 Sequenzierers (Beckman Coulter) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen. Die Rohdaten wurden anschließend über die entsprechende Software des CEQ Systems ausgewertet.

Der Sequenzieransatz bestand aus den folgenden Komponenten:

- 4 μl Quick Start Mix (Beckman Coulter)
- 1 μl DMSO
- 0,5 μl Primer (10 μM)
- μl DNA

Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf 10 μl aufgefüllt und unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen inkubiert.

Tab. 12: Zeitlicher Verlauf der Sequenzier-Polymerasekettenreaktion

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	1 min	95 ° C	Denaturierung
40	20 sec	95 ° C	Denaturierung
	20 sec	50 ° C	Primer-Annealing
	3 min	60 ° C	DNA-Polymerisation
1	Hold	4 ° C	Abkühlung der Proben bis Entnahme

Die in der Sequenzier-PCR gewonnenen Amplifikate wurden mit 5 µl Fällungslösung (2 µl 3 M NaAcetat, 2 µl 100 mM EDTA und 1 µl Glykogen) sowie 60 µl Ethanol_{absolut} versetzt und mittels 15 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm präzipitiert. Nach Abheben des Überstandes wurde mit 80 %-igem Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert und die gesamte Flüssigkeit entfernt. Anschließend erfolgte das Trocknen der Proben unter Vakuumbedingungen für 10 Minuten. Die Pellets wurden in 30 µl SLS (*Sample Loading Solution*) resuspendiert und anschließend im Sequenzierer analysiert.

3.2.2. Sequenzierung mit der Illumina/Solexa-Technologie

I. Virusaufreinigung mittels Plaque-Test

Von den in Tabelle 4 aufgeführten Viren wurden 15 Isolate zunächst einer Plaquereinigung unterzogen. Somit konnten Unstimmigkeiten im genetischen Profil der Viren durch Quasispezies vermieden werden. Die MDCK-Monolayer einer 12-Well-Platte wurden mit 500 µl Infektionsmedium gewaschen und anschließend mit je 500 µl Virusverdünnung (10^{-2} bis 10^{-7}) versetzt. Die Zugabe einer 0,4 %-igen Agar/Medium-Lösung (beides doppeltkonzentriert) erfolgte nach 1-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen. Nach 4 bis 5 Tagen im Brutschrank wurden die Platten auf gut sichtbare und vereinzelt Plaques hin untersucht. Ausgewählte Plaques wurden mit einer 10 µl-Pipettenspitze gepickt, in 100 µl Infektionsmedium aufgenommen und auf Petrischalen mit geschlossenem MDCK-Zellrasen angezogen.

II. Virusvermehrung, Ultrazentrifugation, RNA-Isolierung sowie Ethanol-fällung

Für die Virusvermehrung wurden je 2 bis 3 T75 Zellkulturflaschen mit MDCK-Zellen ($2,3 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) angelegt und nach zwei Tagen Inkubationszeit mit 7 ml Infektionsmedium gewaschen. Anschließend erfolgte die Überschichtung der Zellen mit 12 ml Infektionsmedium sowie 500 bis 1000 µl Virussuspension. Nach einer Adsorptionszeit von 60 min wurde das virushaltige Medium entfernt und durch 22 ml Infektionsmedium ersetzt. Bis zum Erreichen einer vollständigen Lyse inkubierten die Zellen im Brutschrank. Bevor die Virus-RNA mittels Ultrazentrifugation pelletiert werden

konnte, wurden die MDCK-Zellen und deren Bestandteile durch Zentrifugation (5.300 rpm, 20 min, 4 ° C) sedimentiert. Der so gewonnene Überstand wurde in UltraClear™-Tubes (Rotor SW28) gefüllt und für 2:30 h bei 19.000 rpm und 4 ° C ultrazentrifugiert. Die im Pellet enthaltene Virus-RNA konnte anschließend mit dem *RNeasy® Mini Kit* von QIAGEN isoliert werden (analog 3.2.1; Seite 44). Für die Sequenzierläufe 3 und 4 war zusätzlich eine Aufkonzentrierung der RNAs mittels Ethanol-fällung nötig. Dazu wurden der RNA-Suspension (100 µl) 3 M Natriumacetat vom pH 4,2 (10 µl) sowie absoluter Ethanol (250 µl) beigefügt. Nach einer Inkubationszeit von mind. 15 h bei -20 ° C erfolgte die Präzipitation mittels 25-minütiger Zentrifugation. Nach Abheben des Überstandes wurde mit 200 µl 80 %-igen Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und vorsichtig die restliche Flüssigkeit entfernt. Anschließend erfolgte das Trocknen der Proben unter Vakuumbedingungen für 10 min und die Resuspendierung des Peletts in 20-30 µl RNase freiem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 ° C aufbewahrt.

III. Herstellung der cDNA-Bank

Fragmentierung der RNA durch divalente Kationen

Der Reaktionsansatz (Σ 20 µl) bestehend aus 4 µl 5x Fragmentierungspuffer, 1-10 µg RNA (max. 16 µl) und Wasser (Ultra Pure) wurde für genau 5 min bei 94 ° C inkubiert. Der Abbruch der Fragmentierungsreaktion erfolgte durch die Zugabe von 2 µl Stop-Puffer und der anschließenden Präzipitation mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 2 µl Glykogen und 60 µl Ethanol_{absolut}. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei -80 ° C und anschließender 25-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 ° C konnte der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen werden. Ein weiterer 1-minütiger Zentrifugationsschritt ermöglichte das Entfernen des restlichen Ethanols. Das Pellet wurde 10 min luftgetrocknet und in 11,1 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

Synthese einzelsträngiger (ss) cDNA

Für die cDNA-Synthese wurden je nach Sequenzierlauf verschiedene Kombinationen an Primern verwendet (Tabelle 13).

Tab. 13: Verwendete Primerkombinationen bei der reversen Transkription

Sequenzierlauf	Primer	Menge
2	Random (Illumina; 3 µg/µl)	1 µl
3	Random (Illumina; 3 µg/µl) Nonamer (BioLabs; 0,4 µg/µl) Influenza-5'-Pr. (10 µM)	0,5 µl 0,6 µl 0,3 µl
4	Random (Illumina; 3 µg/µl) Nonamer (BioLabs; 0,4 µg/µl) Influenza-5'-Pr. (10 µM) PA-Dekamer (10 µM)	0,4 µl 0,6 µl 0,3 µl 0,3 µl

Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 ° C erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien auf Eis:

4 µl	5x First Strand Buffer
2 µl	100 mM DTT
0,4 µl	25 mM dNTP Mix
0,5 µl	RNaseOUT

Nachdem die Proben für 2 min auf 25 ° C erwärmt wurden, konnte 1 µl SuperScript II (Invitrogen) für die reverse Transkription hinzugefügt werden. Es erfolgte eine Inkubation unter folgenden Bedingungen:

25 ° C	10 min
42 ° C	50 min
70 ° C	15 min
4 ° C	bis zur Probenentnahme

Synthese doppelsträngiger (ds) cDNA

Um die Bildung ds cDNA zu gewährleisten, wurde die ss cDNA mit 62,8 µl Wasser, 10 µl GEX Second Strand Buffer und 1,2 µl 25 mM dNTP Mix versetzt, 5 min auf Eis gestellt und daraufhin mit 1 µl RNaseH sowie 5 µl DNA Polymerase I behandelt. Die Proben inkubierten 2:30 h bei 16 ° C und wurden hinterher mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt und die doppelsträngige cDNA in 50 µl EB eluiert.

End Repair

Bei diesem Schritt werden die Überhänge der ds DNA-Fragmente in *blunt ends* umgewandelt. Die 3'→5' Exonukleaseaktivität der T4- und Klenow-DNA Polymerase entfernt die 3'-Überhänge und die Polymeraseaktivität füllt die 5'-Überhänge auf. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz angefertigt, bei 20 ° C für 30 min inkubiert und anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 32 µl EB eluiert.

50 µl	ds cDNA
27,4 µl	Wasser
10 µl	10x End Repair Buffer
1,6 µl	25 mM dNTP Mix
5 µl	T4 DNA Polymerase
1 µl	Klenow DNA Polymerase
5 µl	T4 Polynukleotidkinase (PNK)

Hinzufügen von Adenin an das 3'-Ende

Um die Ligation der Adapter, welche ein einzelnes Thymin am 3'-Ende besitzen, zu ermöglichen, wird mittels der Klenow (3'→5' Exo minus) Polymerase ein Adeninrest an das 3'-Ende der phosphorylierten *blunt end* DNA-Fragmente gebunden. Dazu wurde folgender Ansatz hergestellt:

32 µl	cDNA
5 µl	A-Tailing Buffer
10 µl	1 mM dATP
3 µl	Klenow Exo Polymerase

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 ° C erfolgten die Aufreinigung und Elution (15 µl) der Proben mit dem *MinElute PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Angabe des Herstellers.

Ligation der Adapter an die cDNA-Fragmente

Mit der Ligation der Adapter wird die Voraussetzung geschaffen, die DNA-Fragmente an die sogenannte *flow cell* zu binden. Der Reaktionsansatz bestehend aus 15 µl DNA, 25 µl 2x Rapid T4 DNA Ligase Buffer, 10 µl Index PE Adapter und 1 µl T4 DNA Ligase wurde bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und anschließend über den *MinElute PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Elution erfolgte in 10 µl EB-Puffer.

Isolierung und Aufreinigung von 200 bp großen cDNA-Fragmenten

Die Proben wurden mit 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas) versetzt und in jede 2. Tasche eines 2 %-igen präparativen Agarosegels pipettiert. Als Größenstandards dienten der *GeneRuler™ 100 bp DNA Marker* von Fermentas bzw. der *DNA Molecular Weight Marker XIV* von Roche. Nach einer Laufzeit von 1:30 h bei 120 V konnte die Region um 200 bp (± 25 bp) ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von QIAGEN aufgereinigt werden. Die so extrahierte DNA wurde in 30 µl EB-Puffer eluiert.

Anreicherung und Indexierung der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die beiden PCR-Primer InPE 1.0 und InPE 2.0 binden an die Adapter, welche in vorausgegangen Schritten an die DNA-Fragmente ligiert wurden. Zusätzlich wird ein Index-Primer (1-12) verwendet, um die nach der Sequenzierung erhaltenen Reads einem Virusisolat zuordnen zu können. Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

6 µl	Wasser
10 µl	5x Phusion Buffer
0,5 µl	25 mM dNTP Mix
1 µl	InPE 1.0 (25 µM)
1 µl	InPE 2.0 (0,5 µM)
1 µl	Index-Primer (1-12; je 25 µM)
0,5 µl	Phusion DNA Polymerase
30 µl	cDNA

Nach der Amplifikation unter den in Tabelle 14 aufgeführten Bedingungen erfolgten die Aufreinigung und Elution (30 µl) mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von QIAGEN.

Tab. 14: PCR-Bedingungen zur Synthese der Index-Polymerasekettenreaktion

Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	30 sec	98 ° C	Denaturierung
18	10 sec	98 ° C	Denaturierung
	30 sec	65 ° C	Primer-Annealing
	30 sec	72 ° C	DNA-Polymerisation
1	5 min	72 ° C	Final-Extension
1	hold	4 ° C	Abkühlung der Proben bis Entnahme

Elektrophoretische Analyse der Amplifikate

Die Größe, Konzentration und Reinheit der Amplifikate (1 µl) wurde über ein Elektropherogramm (Agilent 2100 Bioanalyser) ermittelt (Abb. 13). Als Größenstandards dienen ein 15 und 1500 bp DNA Marker (*Agilent DNA 1000 Chip Kit*).

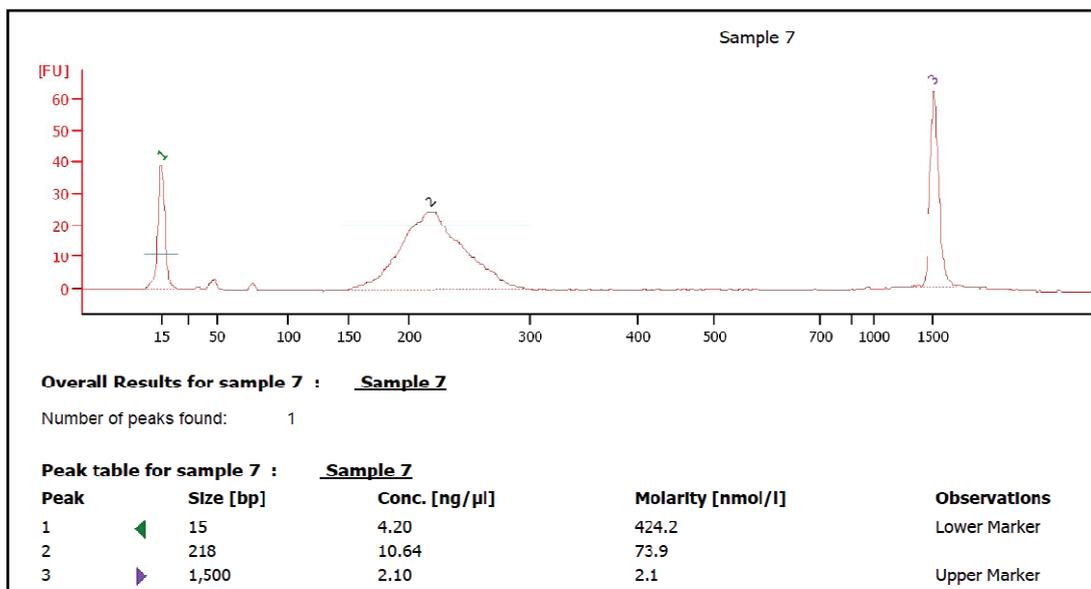


Abb. 13: Elektropherogramm von A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1) (218 bp) mit den Standardmarker 15 bp und 1500 bp, deren Konzentration und Molarität

Fertigstellung der cDNA-Bank

Anhand der Größen- [bp] und Konzentrationsangaben [ng/μl] aus dem Elektropherogramm konnten die mit einem Index (1-12) versehenen Proben auf eine Endkonzentration von 10 nM eingestellt werden. Von den Verdünnungen wurden je 2 μl entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

IV. Sequenzierreaktion

Die Illumina/Solexa-Technologie gewährleistet das parallele Sequenzieren von Millionen von Fragmenten durch die Nutzung von reversiblen Farbstoff-Terminatoren. Die Adapter-tragenden Fragmente (200 bp) werden an eine optisch transparente Oberfläche (*flow cell*) gebunden, welche mit einzelsträngigen Oligonukleotiden bedeckt ist, die in der Sequenz mit den Adaptoren übereinstimmen. Durch die Zugabe von nichtmarkierten Nukleotiden und Enzymen (Polymerasen) wird eine sogenannte *bridge amplification* eingeleitet. Dabei bindet das distale Adapter-ligierte Ende des Fragmentes an ein komplementäres Oligo der *flow cell* und es kommt zur Bildung doppelsträngiger Brücken. Durch Denaturierungs- und Extensionsschritte entstehen so Millionen einzigartiger Cluster doppelsträngiger DNA. Im ersten Schritt der Sequenzierung wird der Originalstrang entfernt, so dass der reverse Strang als Template für die Sequenzierungsreaktion dienen kann. Nach Bindung der Sequenzierprimer erfolgt pro Strang und Zyklus der Einbau eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids, welches durch Laseranregung detektiert und identifiziert werden kann. In jedem neuen Zyklus wird eine Base komplementär zum reversen Strang hinzugefügt und detektiert (*sequencing by synthesis*). Ein Zyklus dauert etwa 1,5 bis 2 Stunden. Entsprechend werden für einen Sequenzierlauf mit der Generierung von 76 bp langen Reads 5 Tage benötigt.

V. Auswertung der Reads/Contigs

Die Analyse der Reads und Contigs wurde gemeinsam mit Prof. Zell und Dr. Marco Groth vom Fritz Lipmann Institut Jena, mittels der Programme ABySS (*Assembly By Short Sequences*) (Birol et al., 2009) und MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) durchgeführt.

3.2.3. Auswertung der Sequenzdaten und Berechnung der Stammbäume

Die Sequenzanalysen sowie die Stammbaumberechnungen erfolgten mit der *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software* Version 4.0 und 5.0 (Beta) (Kumar et al., 2008). Die verwendeten Referenzen und Vergleichssequenzen stammen aus der Datenbank des NCBI.

Für die Erstellung der Phylogramme wurde das Verfahren der maximalen Wahrscheinlichkeit (*Maximum Likelihood*) gewählt. Anhand einer Erweiterung des Mega5-

Programmes konnten die Alignments zunächst auf das optimale Modell zur Berechnung der Stammbäume getestet werden. Bis auf das HAH1-Alignment wurde das *General Time Reversible*-Modell einschließlich der Gamma-Verteilung mit invarianten Stellen errechnet. Die Erstellung des HAH1-Phylogramms erfolgte über das Tamura-Nei-Modell. Die statistische Unterstützung wurde mit 500 Wiederholungen durchgeführt. Im Folgenden sind die Parameter der Stammbauberechnung aufgeführt.

<i>Analyse</i>	phylogenetische Rekonstruktion
<i>Statistische Methode</i>	Maximum Likelihood
<i>Test der Phylogenie</i>	Bootstrap Methode (500 Wiederholungen)
<i>Substitutionsmodell</i>	Nukleotidsubstitution General Time Reversible Modell (GTR) bzw. Tamura-Nei Modell (TN93)
<i>Verteilung</i>	Gamma-Verteilung mit invarianten Stellen (G+I)
<i>Anzahl der Gamma-Kategorien</i>	5
<i>Verfahren bei fehlenden Daten</i>	vollständige Deletion
<i>Inferenz-Optionen</i>	ML heuristische Methode Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)

3.2.4. Reverse Genetik

Virusvermehrung, RNA-Präparation, Reverse Transkription sowie die Polymerasekettenreaktion erfolgten analog dem Punkt 3.2.1. Abschnitt I.- IV. Während der Herstellung der benötigten Plasmide wurden verschiedene Strategien angewandt. Die einzelnen Methoden werden im Folgenden nur allgemein dargestellt.

I. Klonierung von Amplifikaten in pJet1.2

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der *CloneJET™ PCR Cloning Kit* von Fermentas verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl	2x Reaktionspuffer
2 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
1 µl	DNA blunting Enzym
4 µl	Aqua bidest.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 70 ° C wurde der Ansatz mit 1 µl pJET1.2/blunt cloning vector (50 ng/µl) sowie 1 µl T4 DNA-Ligase versetzt und für 20 min bei Rt inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in den kompetenten *E. coli*-Stamm JM107.

II. Restriktion von DNA mit Typ II-Restriktionsenzymen

Mittels der Endonukleasen konnte die DNA sequenzspezifisch gespalten und somit analysiert werden. Der DNA-Verdau diente sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken (Tabelle 15).

Tab. 15: Restriktionsansatz für einen analytischen und präparativen Verdau

Komponente	Analytischer Verdau	Präparativer Verdau
DNA (PCR, Plasmid)	0,5 µg	1-10 µg
Puffer	2 µl	5 µl
Enzym	0,5 µl (10 U/µl)	3 µl (10 U/µl)
Aqua bidest	auf 20 µl	auf 50 µl

Die Inkubationsbedingungen und verwendeten Puffer richteten sich nach den Angaben der Hersteller. Die verdaute DNA wurde entweder über eine Gelextraktion oder Ethanolfällung aufgereinigt.

III. Ligation und Transformation

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ermöglicht die Verknüpfung der kohäsiven Enden von Vektor und Insert. Für eine optimale Ligation sollte das Insertfragment in leichtem Überschuss dazugegeben werden. Der Ligationsansatz (Σ 20 µl) bestand aus folgenden Komponenten:

- ... µl Aqua bidest
- ... µl Insert (Menge richtet sich nach der Konzentration/Bandenstärke)
- ... µl Vektor (Menge richtet sich nach der Konzentration/Bandenstärke)
- 2 µl 10x Ligase Puffer (Fermentas)
- 1 µl T4 Ligase (Fermentas; 5 U/µl)

Nach mind. 15 Stunden Inkubation bei 16 ° C erfolgte die Transformation in kompetente Zellen (DH5α oder JM107). Diese wurden dafür auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem gesamten Ligationsansatz versetzt. Es folgten Inkubationsschritte auf Eis für 30 min, bei 42 ° C für 1 min und erneut auf Eis für 3 min. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1h bei 37 ° C inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Ausplattieren der Zellen (200 µl und 250 µl) auf LB-Ampicillin- (100 mg/ml) Platten und das Inkubieren der Platten bei 37 ° C über Nacht im Brutschrank.

IV. Kolonie-PCR und Mini-Präparation zur Selektion der Transformanten

Erfolgreich transformierte Bakterien erlangen durch die Aufnahme des Plasmides eine Ampicillinresistenz und damit die Fähigkeit, auf LB+Amp-Platten zu wachsen. Diese Transformanten konnten mittels Enzymverdau der Plasmid-DNA oder durch Kolonie-PCR

auf das richtige Insert überprüft werden. Dafür wurde ein Teil einer auf der Platte gewachsenen Bakterienkolonie dem PCR-Ansatz hinzugefügt und mit dem Rest eine Vorkultur hergestellt. Die PCR und die Gelelektrophorese erfolgten analog den Bedingungen und der Zusammensetzung von 3.2.1. Abschnitt IV. und V. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 nachzulesen. Die Vorkultur, bestehend aus 3 ml LB+Amp sowie der Bakterienkolonie, wurde über Nacht bei 37 ° C im Horizontalschüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte nach dem Standardprotokoll des *EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kits* von Biozym. Die Richtigkeit der Transformanten wurde zusätzlich mittels Sequenzierung belegt.

V. Midipräparation von Plasmiden

Mit dem *Invisorb Plasmid Midi Kit* von Invitex konnten größere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen werden. Dazu wurden 100 µl der Vorkultur zum Animpfen einer Hauptkultur von 100 ml LB+Amp-Medium verwendet. Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 h bei 37 ° C auf einem Horizontalschüttler erfolgten der Zellaufschluss und die alkalische Lyse. Durch die Bindung an eine Ionenaustausch-Säule konnte die Plasmid-DNA gewaschen und anschließend eluiert werden. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte ausschließlich durch Zentrifugation bei 4.000 rpm.

VI. Zielgerichtete Mutagenese in vitro

Mit Hilfe des *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* von Invitrogen kann die DNA an gezielten Positionen verändert werden. Dies wird durch Primer ermöglicht, die sowohl komplementäre als auch mutierte Abschnitte besitzen. Die für die Mutagenese-PCR konstruierten Primer waren gegenläufig und am 5'-Ende komplementär (Abb. 14). Nur der sense Primer trägt die gewünschte Mutationstelle, welche am 3'-Ende durch 11 nt Template-DNA verlängert ist.

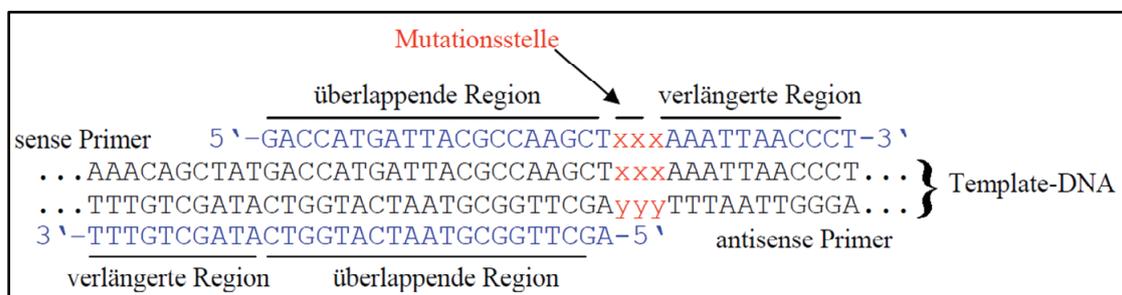


Abb. 14: Primerdesign für die Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Alle Schritte, einschließlich der Transformation in DH5α-T1 wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Überprüfung der Klone fand durch Sequenzierung statt.

VII. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Mittels Transfektion können Nukleinsäuren z.B. Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode bei der Überprüfung des viralen Polymerasekomplexes und der Herstellung rekombinanter Viren angewendet.

GFP-Polymeraseaktivitätstest

Die Durchführung des Polymeraseaktivitätstestes erfolgte mit dem Transfektionsreagenz *TurboFect*[™] von Fermentas. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches mit der DNA stabile, positiv geladene Komplexe bildet. Die gebildeten Vesikel werden schließlich von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. 24 h vor der Transfektion wurden GMK-Zellen mit einer Zelldichte von $1,8 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einer 6-Well-Platte ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Der Transfektionsansatz bestand aus den in pHW2000 klonierten Polymerasekomplexuntereinheiten PB2, PB1, PA und NP sowie dem GFP-Plasmid. Die Gesamt-DNA (4 µg) wurde in 400 µl serumfreiem DMEM aufgenommen und mit 6 µl *TurboFect*[™] versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Rt konnten die Zellen mit dem gesamten Ansatz versetzt und im Brutschrank inkubiert werden. Die Auswertung wurde nach 48 h am Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

Synthese rekombinanter Viren

Ein Tag vor Transfektion wurde ein Zellgemisch bestehend aus 50 % MDCK- ($3 \cdot 10^5$ Zellen/ml) und 50 % HEK-293-Zellen ($4 \cdot 10^5$ Zellen/ml) hergestellt und in 12-Well-Platten (pro Well: 1,5 ml) ausgesät. Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen besaß der Zellrasen eine Konfluenz von ungefähr 90 %. Für das Einbringen der Plasmid-DNA in die eukaryotischen Zellen wurde *Lipofectamine*[™] 2000 von Invitrogen verwendet. Dieses Reagenz ermöglicht die Bindung negativ geladener Plasmid-DNA an positiv geladene Lipidvesikel. Der Transfektionsansatz wurde wie folgt hergestellt:

1. Herstellung des Lipofectamine/Medium-Gemisches bestehend aus 4 µl Lipofectamine und 100 µl serumfreiem Minimalmedium mit anschließender 5-minütiger Inkubation bei Rt
2. Herstellung des DNA/Medium-Gemisches bestehend aus 100 µl serumfreiem Minimalmedium und folgenden Komponenten:

250 ng	pHW2000-[PB2-Virus]
250 ng	pHW2000-[PB1-Virus]
250 ng	pHW2000-[PA-Virus]
250 ng	pHW2000-[HA-Virus]
250 ng	pHW2000-[NP-Virus]
250 ng	pHW2000-[NA-Virus]
250 ng	pHW2000-[M-Virus]
250 ng	pHW2000-[NS-Virus]

3. Zusammenführen beider Gemische zu einem Transfektionsansatz und 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur

Bevor der Transfektionsansatz zu den Zellen pipettiert werden konnte, wurden diese mit 1 ml Serum- und Antibiotika-freiem EMEM versetzt. Nach 18 h Inkubationszeit unter Standardbedingungen erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, bei dem die Zellen mit Infektionsmedium überschichtet wurden. Drei bis vier Tage nach Transfektion wurden die MDCK-Zellen auf zpE hin untersucht, bei negativem Befund erfolgte das Splitten der Zellen mit anschließendem Mediumwechsel nach 20 h. Dieses Vorgehen wurde bis zu viermal wiederholt. Bei unklarem Befund wurde zusätzlich Überstand auf frische MDCK-Monolayer mit Infektionsmedium überführt und beobachtet. Bei einem deutlich sichtbaren zpE oder das Erreichen der Lyse erfolgte das Einfrieren des Zellüberstandes bei - 80 ° C.

3.2.5. Untersuchung ausgewählter rekombinanter Viren

I. Passagierung in MDCK-Zellen

Die Virusvermehrung über 20 Passagen erfolgte auf zwei Tage alten MDCK-Monolayer versehen mit Infektionsmedium. Bei Erreichen eines deutlich sichtbaren zpE's oder der Lyse wurde ein Teil des Überstandes bei -80 ° C eingefroren und der Rest zur Infektion neuer MDCK-Zellen genutzt. Bei der Passagierung unter Substanzdruck erfolgte die Zugabe von Amantadin in einer Konzentration von 1 (1.-13. Passage) bis 2 µg/ml (ab 14. Passage).

II. Virustiterbestimmung und Wachstumskinetik mittels TCID₅₀

Bei der TCID₅₀-Methode (50 % *tissue culture infections dose*) wird mittels Endpunkttitration der Titer von Virussuspensionen bestimmt. Der TCID₅₀-Wert gibt die Virusverdünnung an, bei der noch 50 % der Testeinheiten infiziert sind.

Zwei Tage vor Testbeginn wurden 100 µl einer MDCK-Zellsuspension ($2,3 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert und bei Standardbedingungen inkubiert. Am Versuchstag erfolgte zunächst ein dreimaliges Waschen der Zellen mit Infektionsmedium sowie anschließender Zugabe von 100 µl (Zellkontrolle 150 µl) trypsinhaltigen Mediums in jede Kavität der Zellkulturplatte. Zu den 100 µl Infektionsmedium wurden in je 4 Vertiefungen 50 µl einer hergestellten logarithmischen Virusverdünnungsreihe (Faktor 10) gegeben. Nach viertägiger Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte die Auswertung unter dem Lichtmikroskop. Durch anschließende Färbung mit Kristallviolett war das Vorhandensein eines zpE's auch makroskopisch

sichtbar. Basierend auf dem Verfahren nach Reed und Muench konnte die Viruskonzentration (TCID₅₀) mathematisch ermittelt werden.

Der proportionale Abstand der beiden Verdünnungen, zwischen denen der 50 %-ige Titrationsendpunkt liegt, wird wie folgt berechnet:

$$\text{Proportionaler Abstand} = \frac{(\% \text{ infizierter Testeinheiten über } 50 \%) - 50 \%}{(\% \text{ infizierter Testeinheiten über } 50 \%) - (\% \text{ infizierter Testeinheiten über } 50 \%)}$$

Bestimmung 50 %-igen Titrationsendpunktes:

$$\text{TCID}_{50} = (\log \text{ Verdünnung über } 50 \%) + (\text{proportionaler Abstand} * \text{Logarithmus des Verdünnungsfaktors})$$

Die Höhe des Virustiters ergibt sich aus dem Reziproken dieser Verdünnung und ist auf die infektiöse Einheit pro Testvolumen bezogen.

Für die Erstellung von Wachstumskurven ausgewählter Viren wurden MDCK-Monolayer in 96-Well-Zellkulturplatten mit einer MOI von 0,1 beimpft. Nach 1 h Adsorptionszeit erfolgte ein 3-maliges Waschen der Zellen mit Infektionsmedium mit anschließender Zugabe von 100 µl EMEM+Trypsin+Na-Bicarbonat pro Well. Zu definierten Zeitpunkten (0h, 3h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 36h und 48h) wurde der Überstand abgenommen und bei -80 ° C eingefroren. Die Bestimmung der Virustiter zu den einzelnen Zeitpunkten erfolgte durch Titration nach der TCID₅₀-Methode.

III. Plaque-Reduktionstest (Dosis-Wirkungs-Untersuchungen)

Für den Plaque-Reduktionstest wurden MDCK-Zellen ($2,3 * 10^5$ Zellen/ml) in einer 12-Well-Platte ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Tagen erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen die Zugabe von 500 µl Virusverdünnung pro Well. Diese wurde vorher im Plaquetest bestimmt und resultiert in einer gut auszählbaren Plaqueanzahl. Während der 60-minütigen Inkubationszeit konnten die Verdünnungen der Testsubstanz Amantadin (0,001-22,5 µg/ml) in 2x EMEM + 2x Trypsin + 2x Na-Bicarbonat hergestellt und anschließend mit 0,8 % Agar versetzt werden. Nach Ablauf der Adsorptionsphase erfolgten die Abnahme des virushaltigen Überstandes und das Überschichten der Zellen mit je 1 ml Substanz/Agar-Gemischs sowie eine 4-tägige Inkubation bei Standardbedingungen. Durch das Fixieren und Färben der Zellen mit Kristallviolett-Lösung war ein Auszählen der Plaques makroskopisch möglich. Anschließend konnte die prozentuale Plaquereduktion anhand des Mittelwertes der ausgezählten Plaques von infizierten unbehandelten Kontrollaktivitäten, welche gleich 100 % gesetzt wurden, ermittelt werden. Anhand dieser Daten wurde die 50 %-ige Hemmkonzentration (IC₅₀) der Substanz errechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Statistische Auswertung der Illumina/Solexa-Sequenzierung

Mittels der Illumina/Solexa-Technologie konnten die Genome von 26 europäisch porzinen Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 in drei separaten Läufen entschlüsselt werden. Der genetischen Charakterisierung gingen folgende Schritte voraus: 1) Virusvermehrung, 2) Anreicherung der Virus-RNA über Ultrazentrifugation, 3) Modifikation der 3'-Enden, 4) Adapterligation und 5) Amplifikation indexierter DNA. Durch die letztgenannte Reaktion wurde gewährleistet, dass jedes DNA-Fragment eines Virusisolates über einen spezifischen Index-Primer verfügte. Nach der Sequenzierung wurden bis zu 30 Millionen Reads (je 76 bp groß) pro Lauf detektiert. Etwa 87 % davon konnten anhand der Indexierung einem Virusisolat zugeordnet werden. Diese *assigned reads* (13-26 Mio.) enthielten sowohl virusspezifische (*mappable reads*) als auch nicht-virusspezifische Sequenzen (*nonmappable reads*). Abbildung 15 zeigt anhand von Tortendiagrammen die Verteilung der ermittelten *assigned reads*. Während in den Läufen 2 und 3 die Reads annähernd gleichverteilt waren ($\bar{\varnothing}$ 14,3 % und 10 %), wurden im Lauf 4 starke Schwankungen zwischen den neun Virusisolaten detektiert. Mit 1 % wies das Virus A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2) den geringsten Anteil an *assigned reads* auf. Eine hohe Anzahl an zuordbaren Reads hingegen zeigten die Viren A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2) und A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) mit 24 bzw. 20 %.

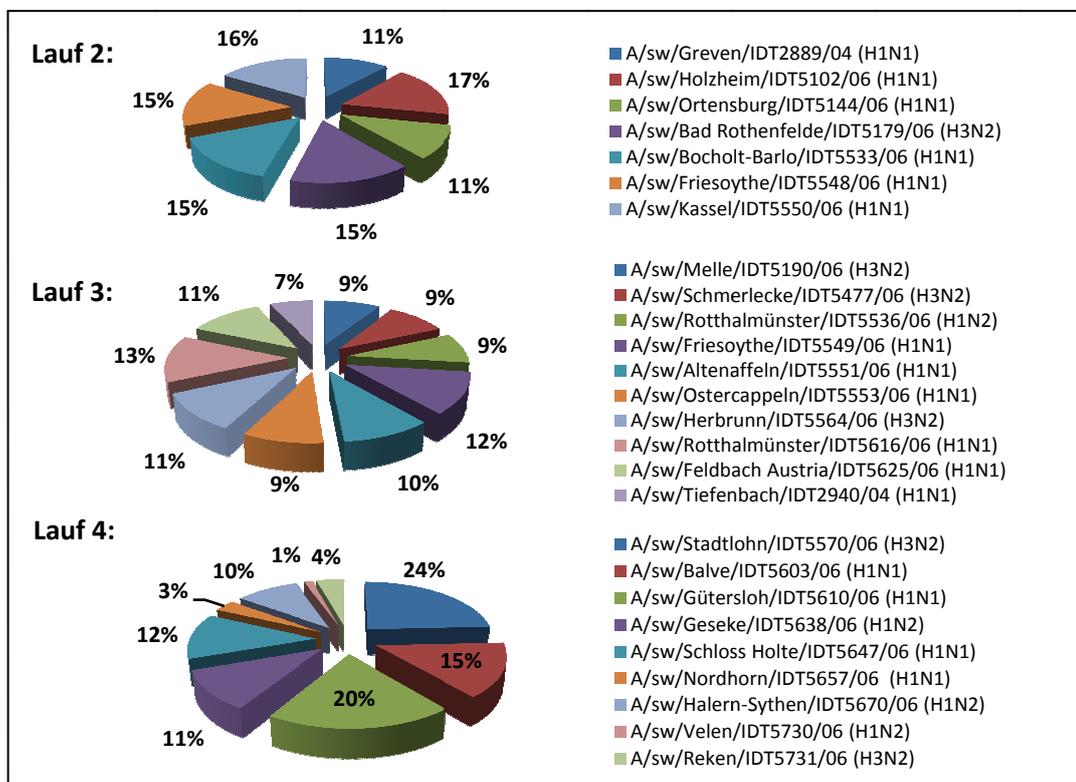


Abb. 15: Verteilung der *assigned reads* [%] pro Virus und pro Sequenzierlauf anhand von Tortendiagrammen.

Von den 13 bis 26 Millionen *assigned reads* konnten mittels verschiedener Influenza-A-Virusreferenzsequenzen 6-27 % als virusspezifisch identifiziert werden. Das Verhältnis zwischen *mappable* und *nonmappable reads* jedes sequenzierten Virusisolates ist in Abbildung 16 dargestellt. Der Anteil an virusspezifischen Reads schwankt zwischen 0,3 % (A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)) und 48,4 % (A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1)). Die für diese Graphik verwendeten Werte sind der Tabelle 16 zu entnehmen. Trotz teils geringer Ausbeute war eine 22,7- bis 14.650fache Abdeckung des 13,6 kb großen Virusgenoms möglich.

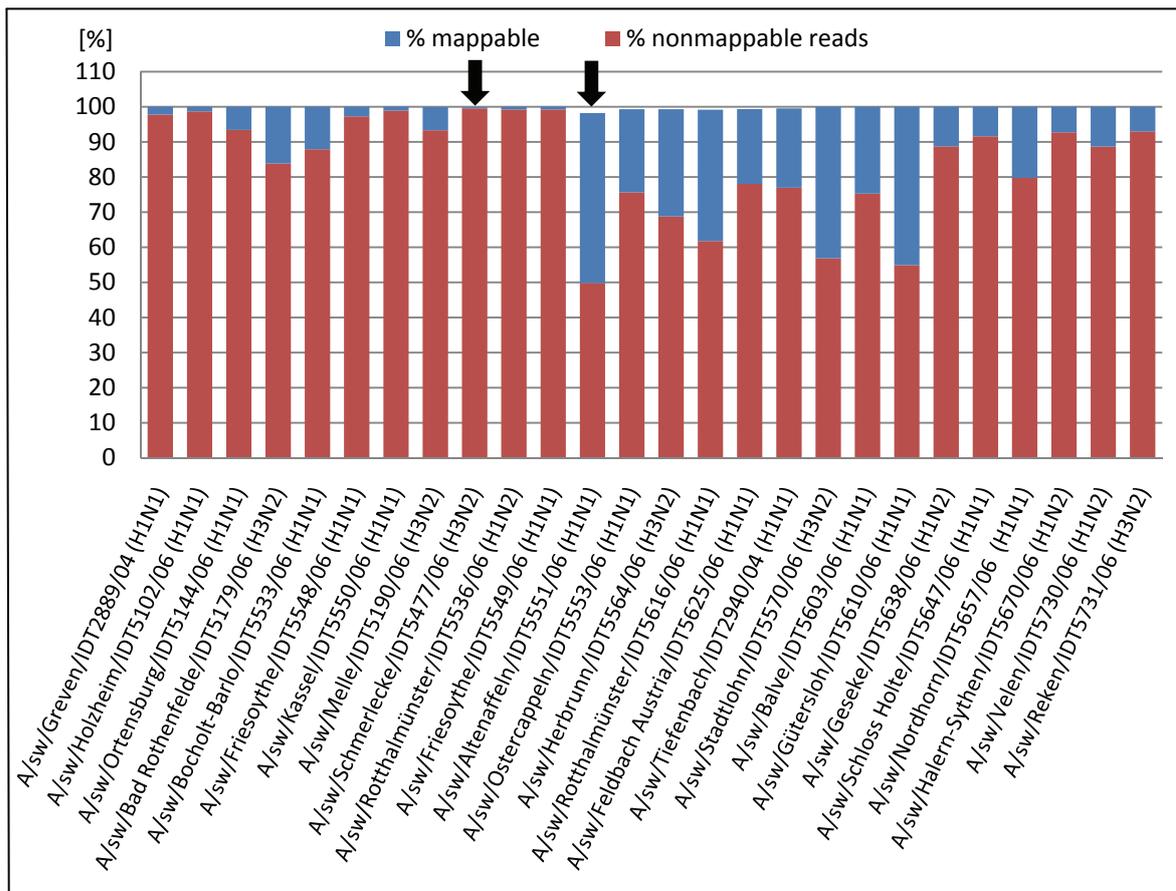


Abb. 16: Verhältnis zwischen *mappable* und *nonmappable reads* [%] der 26 sequenzierten Schweineinfluzaviren

Anhand einer auf ABySS (Simpson et al., 2009) basierenden *de-novo* Assemblierung wurden abhängig von der Menge und der Qualität der Reads 17 bis 32 Contigs pro Virus erzielt. Dies entspricht ungefähr 49-94 % des untersuchten Genoms. Mittels einer zusätzlichen Referenz-Assemblierung (*Eland-based*; Bentley et al., 2008) konnte die Identifikationsrate auf über 99 % erhöht werden.

Die statistische Auswertung zeigt, dass *nonmappable reads* den Großteil der *assigned reads* ausmachen. Um die Frage nach dem Ursprung dieser Reads zu klären, wurden 8.697 *nonmappable contigs* einer Blast-Analyse unterzogen. Dabei konnten

Sequenzähnlichkeiten zu Artiodactyla, Rodentia und Carnivora ermittelt werden. Eine detaillierte Auflistung der identifizierten Arten ist dem Tortendiagramm der Abbildung 17 zu entnehmen. Der Großteil der nichtviruspezifischen RNA (77 %) war ribosomalen Ursprungs (Abb. 18).

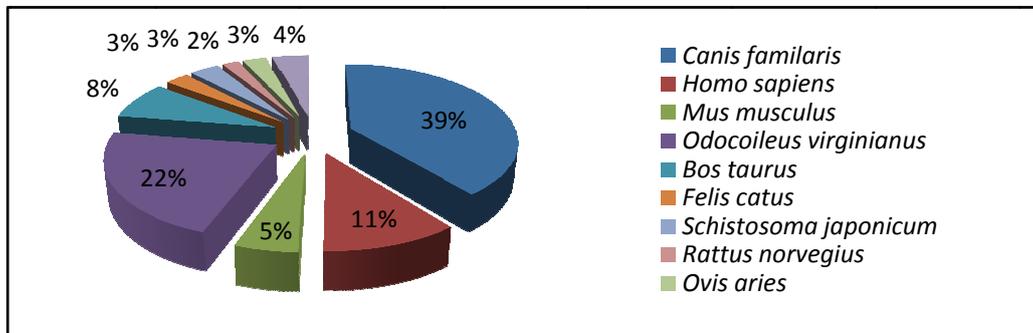


Abb. 17: Identifizierung von Sequenzähnlichkeiten mittels einer Blast-Analyse von 8.697 *nonmappable contigs*

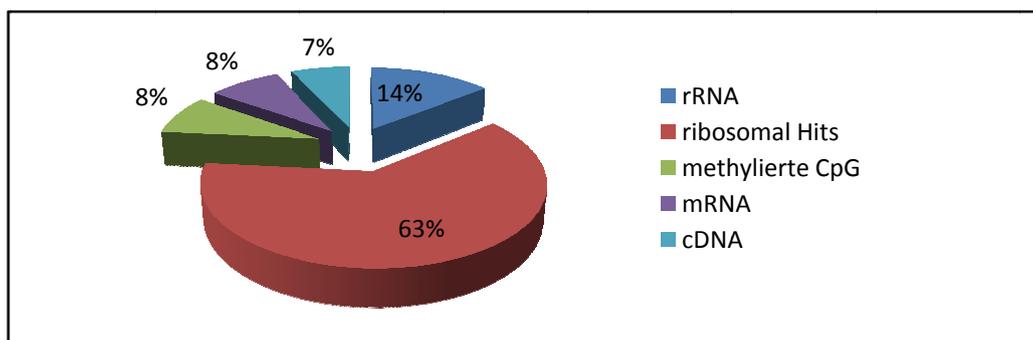


Abb. 18: Anteil nichtviruspezifischer RNA ermittelt aus 8.697 *nonmappable contigs*

In Tabelle 16 sind die ermittelten Reads der Sequenzierläufe 2, 3 und 4 zusammengefasst. Die orange hinterlegten Viren konnten mittels der Illumina-Technologie vollständig sequenziert werden. Hellblau markierte Virusstämme hingegen wiesen eine Lücke (nt 980-1100) im PA-Segment auf, welche mit der *cycle sequencing*-Methode nachträglich geschlossen wurde. Die eventuell durch Sekundärstrukturen entstandenen Probleme konnten teilweise durch die Zugabe eines zusätzlichen Primers (PA-Dekamer) behoben werden. Viren, die in mehr als zwei Segmenten Lücken enthielten, wurden weiß hinterlegt.

Beim Vergleich der *mappable reads* konnte kein Zusammenhang in Bezug auf das Sequenzierergebnis festgestellt werden. Innerhalb der vollständig sequenzierten Viren schwankten die *mappable reads* zwischen 8,4 und 43,2 %, Werte, die auch bei unvollständig sequenzierten Viren erreicht wurden.

Tab. 16: Zusammenfassung der ermittelten Reads von drei separaten Läufen nach der Illumina/Solexa-Sequenzierung

Virus	assigned reads	assigned reads [%]	mappable reads	mappable reads [%]	nonmappable reads	nonmappable reads [%]
A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1)	2.174.375	11,50	48.568	2,23	2.125.807	97,77
A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1)	3.170.052	16,77	42.263	1,33	3.127.789	98,67
A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1)	2.000.890	10,59	131.504	6,57	1.869.386	93,43
A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2)	2.900.048	15,34	468.116	16,14	2.431.932	83,86
A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1)	2.782.141	14,72	336.798	12,11	2.445.343	87,89
A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1)	2.810.728	14,87	76.906	2,74	2.733.822	97,26
A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1)	3.064.105	16,21	33.778	1,10	3.030.327	98,90
Lauf 2	Σ 18.902.339 Ø 2.700.334,14	Σ 100	Σ 1.137.933 Ø 162.561,86	6,02	Σ 17.764.406 Ø 2.537.772,3	93,98
A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2)	1.214.254	8,75	80.175	6,60	1.132.981	93,31
A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)	1.319.715	9,51	4.110	0,31	1.313.618	99,54
A/sw/Rotthalmünster/IDT5536/06 (H1N2)	1.196.309	8,62	9.272	0,78	1.187.048	99,23
A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1)	1.636.923	11,80	12.909	0,79	1.624.600	99,25
A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1)*	1.380.577	9,95	668.651	48,43	687.525	49,80
A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1)*	1.235.316	8,91	292.323	23,66	934.334	75,64
A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2)*	1.481.594	10,68	452.482	30,54	1.019.128	68,79
A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06 (H1N1)*	1.853.129	13,36	692.780	37,38	1.144.834	61,78
A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1)*	1.611.876	11,62	344.074	21,35	1.257.887	78,04
A/sw/Tiefenbach/IDT2940/04 (H1N1)*	941.088	6,78	212.800	22,61	724.097	76,94
Lauf 3	Σ 13.870.781 Ø 1.387078,1	Σ 100	Σ 2.769.576 Ø 276.957,6	19,97	Σ 11.026.052 Ø 1.102.6025,2	79,49

Farbkodierung: rot: Viren des Sequenzierlaufes 2; grün: Viren des Laufes 3; hellblau hinterlegte Viren: sieben Segmente vollständig sequenziert, Lücke im PA- Segment; weiß hinterlegte Viren: mehr als zwei Segmente mit unvollständiger Sequenz

* plaquegereinigte Viren

Fortsetzung Tab. 16: Zusammenfassung der ermittelten Reads von drei separaten Läufen nach der Illumina/Solexa-Sequenzierung

Virus	assigned reads	assigned reads [%]	mappable reads	mappable reads [%]	nonmappable reads	nonmappable reads [%]
A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2)*	6.410.356	24,28	2.766.503	43,16	3.643.853	56,84
A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1)*	3.863.636	14,64	955.246	24,72	2.908.390	75,28
A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1)*	5.237.840	19,84	2.362.539	45,11	2.875.301	54,89
A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2)*	2.849.650	10,79	321.287	11,27	2.528.363	88,73
A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1)*	3.290.364	12,46	276.942	8,42	3.013.422	91,58
A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1)*	833.621	3,16	168.575	20,22	665.046	79,78
A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2)*	2.509.231	9,50	182.605	7,28	2.326.626	92,72
A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2)*	330.215	1,25	37.327	11,30	292.888	88,70
A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2)*	1.074.586	4,07	75.260	7,00	999.326	93,00
Lauf 4	Σ 26.399.499 Ø 2.933.277,7	Σ 100	Σ 7.146.284 Ø 1.020.897,7	27,07	Σ 19.253.215 Ø 2.750.459,3	72,93

Farbkodierung: blau: Viren des Sequenzierlaufes 4; hellblau hinterlegte Viren: sieben Segmente vollständig sequenziert, Lücke im PA- Segment; weiß hinterlegte Viren: mehr als zwei Segmente mit unvollständiger Sequenz; orange hinterlegte Viren: vollständige Sequenz

* plaquegereinigte Viren

Die optische Einschätzung der RNA ergab ebenfalls keine Korrelation zwischen Sequenzvollständigkeit und Qualität zur RNA-Präparation. Abbildung 19 zeigt die nach Ultrazentrifugation und Ethanol-fällung aufgereinigte RNA (1 µg) von acht ausgewählten porzinen Influenzaviren. Die vollständig sequenzierten Viren A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2) (Spur 3), A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1) (Spur 4), A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) (Spur 5) und A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1) (Spur 7) weisen drei deutlich erkennbare Banden auf. Die RNA-Proben der Isolate A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2) (Spur 2) und A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2) (Spur 8) fallen durch sehr schwache Banden auf. Die Auswertung der Sequenzierreaktion ergab jedoch lediglich die bereits beschriebene Lücke im PA-Segment. Obwohl die A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2)-RNA (Spur 9) annähernd die Bandenstärken der vollständig sequenzierten H1N1-Viren A/sw/Balve/IDT5603/06 und A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 zeigt, wurden mehrere Sequenzlücken in insgesamt fünf Segmenten detektiert.

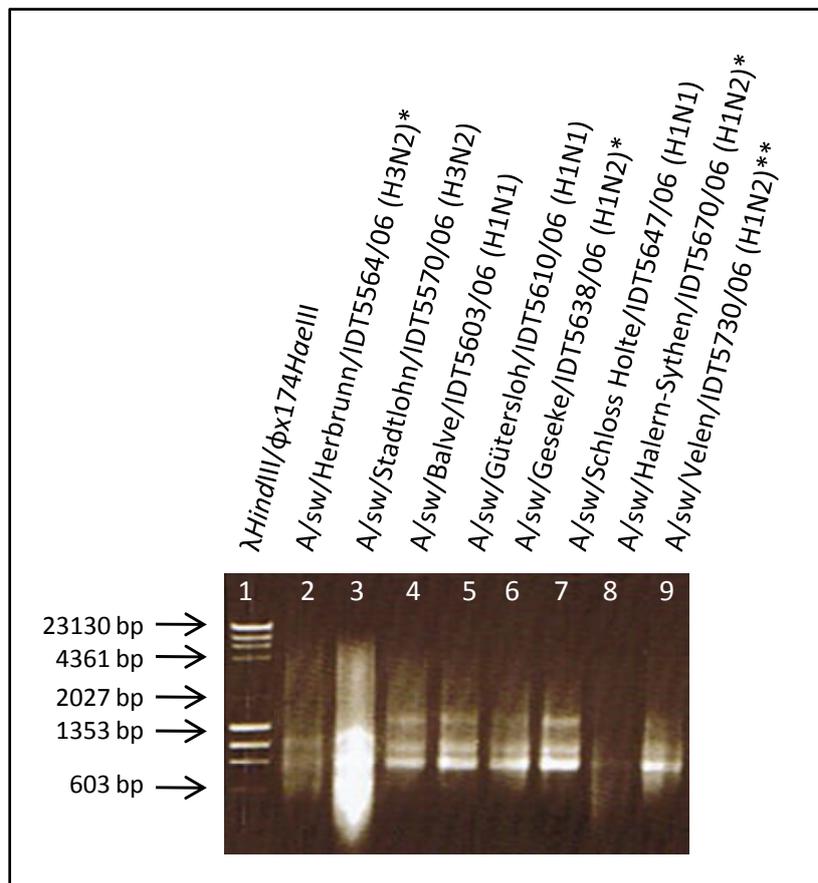


Abb. 19: Darstellung der Virus-RNA (1µg) in einem 1 %-igen Agarosegel. Spur 1 enthält die Größenstandards λ HindIII und ϕ X174HaeIII. Spur 2 bis 9: ausgewählte europäisch porzine Influenza-A-Viren; kein *: vollständige Sequenz; *: sieben Segmente vollständig sequenziert; **: fünf Segmente unvollständig sequenziert

4.2. Phylogenetische Analysen eurasisch porziner Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2

In dieser Arbeit wurden die Sequenzdaten von 132 porzinen Influenza-A-Viren (Tabelle 4 sowie Tabelle A1) aus den Jahren 1978 bis 2007 genetisch charakterisiert. All diese Stämme konnten am Institut für Virologie und Antivirale Therapie Jena, unter Leitung von Prof. Zell vollständig sequenziert werden.

Für vergleichende Untersuchungen wurden Vertreter der bisher bekannten Genotypen mittels der Datenbanken FluGenome (http://www.flugenome.org/show_genomes.php) und Influenza Virus Resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi?go=1>) herangezogen. Dazu zählten eurasisch porzine Viren, nordamerikanische und eurasische Vogelisolate, equine Influenza-A-Viren sowie humane Stämme der Subtypen H1N1, H1N2, H2N2 und H3N2. Desweiteren wurden Vertreter der *classical swine*-Linie verwendet, komplettiert durch die Sequenzdaten von porzinen H3N2-Tripelreassortanten und davon abgeleiteten H1N1- und H1N2-Viren.

Aufgrund des segmentierten Genoms der Influenzaviren werden die Segmente einzeln phylogenetisch untersucht. Durch die unterschiedlichen Evolutionsraten der Segmente untereinander (Lu et al., 2007) sowie den verschiedenen Bezeichnungen von Claden, Genotypen und Clustern wurde eine einheitliche Nomenklatur zur Genotypisierung der Influenza-A-Viren entwickelt. Die Genotypformel eines Virusisolates setzt sich aus den Genotypen der acht Segmente in folgender Reihenfolge zusammen: PB2-PB1-PA-HA-NP-NA-M-NS. Dabei wird jede Abstammungslinie eines Segmentes durch einen Buchstaben kodiert. Bei den HA-, NA- und NS-Segmenten werden die Subtypen bzw. die Allele durch Zahlen dargestellt. In der Datenbank des FluGenome sind drei Tabellen abrufbar. Die Tabelle *Segment* enthält ~ 30.000 Einträge von Genomsegmenten mit Informationen über deren Namen, Serotyp, Wirt, Land, Nukleotidsequenz sowie der GenBank *accession number*. In der *Genom*-Tabelle sind 7889 Genome einschließlich virusspezifischer Informationen eingetragen. 156 einmalige Genotypen können der Tabelle *Genotyp* entnommen werden. Aktuell sind 6581 Influenza-Genome verfügbar und insgesamt 482 Genotypen beschrieben (Stand: 21.3.2011). Tabelle 17 enthält eine Übersicht der vorherrschenden Genotypen porziner Influenza-A-Viren sortiert nach den Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2. Gelb hinterlegt sind die Genotypformeln, welche zurzeit in Europa vorzufinden sind.

Tab. 17: Verteilung der Genotypen der porzinen Influenza-A-Viren (www.FluGenome.org; Stand: 21.3.11)

Subtyp	Anzahl der Viren	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	Isolationsort
H1N1	3	B	D	C	1A	A	1B	A	1A	USA
	6	C	D	E	1A	A	1B	A	1A	USA, Korea
	10	F	G	I	1C	F	1F	F	1A	Asien
	98	B	A	C	1A	A	1B	A	1A	USA*, Asien
	31	F	G	I	1C	F	1F	F	1E	Asien/Europa
H1N2	4	B	A	C	1A	A	2A	A	1A	Asien
	31	C	D	E	1A	A	2A	A	1A	USA, Asien
	23	C	D	E	1B	A	2A	B	1A	USA
	5	F	G	I	1B	F	2A	F	1E	Europa
H3N2	21	A	D	B	3A	A	2A	B	1A	Nordamerika, Asien
	23	C	D	E	3A	A	2A	A	1A	Nordamerika**, Asien
	7	F	G	I	3A	F	2A	F	1E	Europa

* classical swine-Viren; ** Triple-Reassortanten

Zu Beginn der Analysen wurden die Sequenzen segmentabhängig Codon-basiert in einem Alignment angeordnet und anschließend für die Berechnung der phylogenetischen Distanzen genutzt. Die Anzahl der verwendeten Stämme pro Alignment sowie die Größe des jeweiligen Segmentes sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tab. 18: Anzahl der in die Stammbaumberechnung einbezogenen Sequenzen pro Segment und dessen Größe [nt]

Segment	Anzahl der Stämme	Segmentgröße des Alignments
PB2	191	2280 nt
PB1	199	2274 nt
PA	201	2154 nt
HAH1	139	1701 nt
HAH3	96	1701 nt
NP	201	1497 nt
NAN1	108	1413 nt
NAN2	136	1410 nt
M	189	982 nt
NS	208	835 nt

Die Erstellung der Stammbäume erfolgte mittels eines stochastischen Verfahrens – der *Maximum Likelihood*-Methode (maximale Wahrscheinlichkeit; MEGA5 Beta6.1). Die statistische Unterstützung der beobachteten Verzweigungen wurde durch *Bootstrap*-Analyse (500 Wiederholungen) ermittelt. Um eine bestmögliche Schätzung und Korrektur real beobachteter Nukleotidhäufigkeiten bzw. Änderungswahrscheinlichkeiten von Basensubstitutionen zu erhalten, wurde das *general time reversible* (GTR) -Modell unter Annahme einer Gamma-Verteilung mit invarianten Nukleotiden (GTR+G+I) verwendet. Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse ist in einem Übersichtsstammbaum dargestellt (Ausnahmen: Segment HAH3 und NAN1). Die Referenzgenotypen sowie

Ausschnitte der eurasisch porzinen Viruslinie sind separat und detailliert abgebildet. Bis auf die HA- und NA-Stammbäume wurden die Sequenzen der eurasisch porzinen Viren entsprechend ihres Subtyps markiert: H1N1=grün, H1N2=blau, H3N2=rot. Die Vertreter des pandemischen Virus vom Typ A/H1N1v sind hellgrün unterlegt. Hinweise auf Rekombinationsereignisse und wirtsübergreifende Infektionen werden mittels schwarzen und roten Pfeilen hervorgehoben. Die Bezeichnungen europäisch, eurasisch, nordamerikanisch etc. beziehen sich nicht auf die Abstammungslinie eines Virusisolates sondern geben lediglich den Isolationsort der Viren an.

Im Folgenden wird jedes Segment separat besprochen und auf Besonderheiten hingewiesen.

L SEGMENT 1 – PB2

Der Übersichtsstammbaum des Segmentes PB2 (Abb. 20A) zeigt das Ergebnis der phylogenetischen Analyse von 191 Sequenzen (132 eigene Sequenzen, 59 GenBank-Sequenzen). Diese konnten den Genotypen A bis L zugeordnet werden. Genotyp F enthält die eurasisch porzinen Influenza-A-Viren, welche eine monophyletische Entwicklung aufweisen. Diese Virusisolate zeigen eine enge Verwandtschaft zu den eurasischen Vogelviren der Genotypen G, H, I, J, K und L (Abb. 20B). Das PB2 der humanen Influenza-A-Viren (Genotyp A) ist von dem PB2 der eurasisch porzinen Viren klar abgegrenzt. Gleiches gilt für die Viren der *classical swine*-Linie (Genotyp B) sowie den Vertreter des Genotyps C. Letzteres beinhaltet die Sequenzdaten der H3N2-Tripelreassortanten und der davon abgeleiteten porzinen H1N1- und H1N2-Stämme sowie der pandemischen A/H1N1v-Viren, welche alle vom PB2 der nordamerikanischen Vogelviren (ebenfalls Genotyp C) abstammen (Abb. 20B).

Hinweise auf wirtsübergreifende Infektionen liefern die PB2-Segmente der humanen Virusisolate A/Thailand/271/05 (H1N1), A/Philippines/344/04 (H1N2) und A/HongKong/1774/99 (H3N2), welche innerhalb der eurasisch porzinen Viren anzutreffen sind. Ein weiteres Beispiel für Transspeziesinfektion findet sich im aviären H5N1-Virus A/Indonesien/CDC759/06 wieder, welches aus der Pleuraflüssigkeit einer 35-jährigen Frau isoliert werden konnte. Innerhalb des Genotyps F lassen sich Hinweise auf Reassortierungsereignisse finden. So gruppiert sich z.B. das PB2 der H3N2-Viren A/sw/Borgentreich/IDT4858/06, A/sw/Daseburg/IDT5022/06 und A/sw/Melle/IDT5706/06 in einem Cluster von H1N1-Stämmen ein (Abb. 20C).

Anhand des Alignments wurden die 191 Viren auf die in Tabelle 2a aufgelisteten Virulenzmarker hin untersucht. Die Substitution N265S bewirkt die Ausprägung einer temperatursensitiven Variante (Subbarao et al., 1993) und konnte in den *classical swine*-Viren A/sw/Tennessee/82/77 (H1N1) und A/sw/Iowa/15/30 (H1N1) detektiert werden (Abb. 20B). Der Aminosäure-Austausch E627K wird mit einer verbesserten

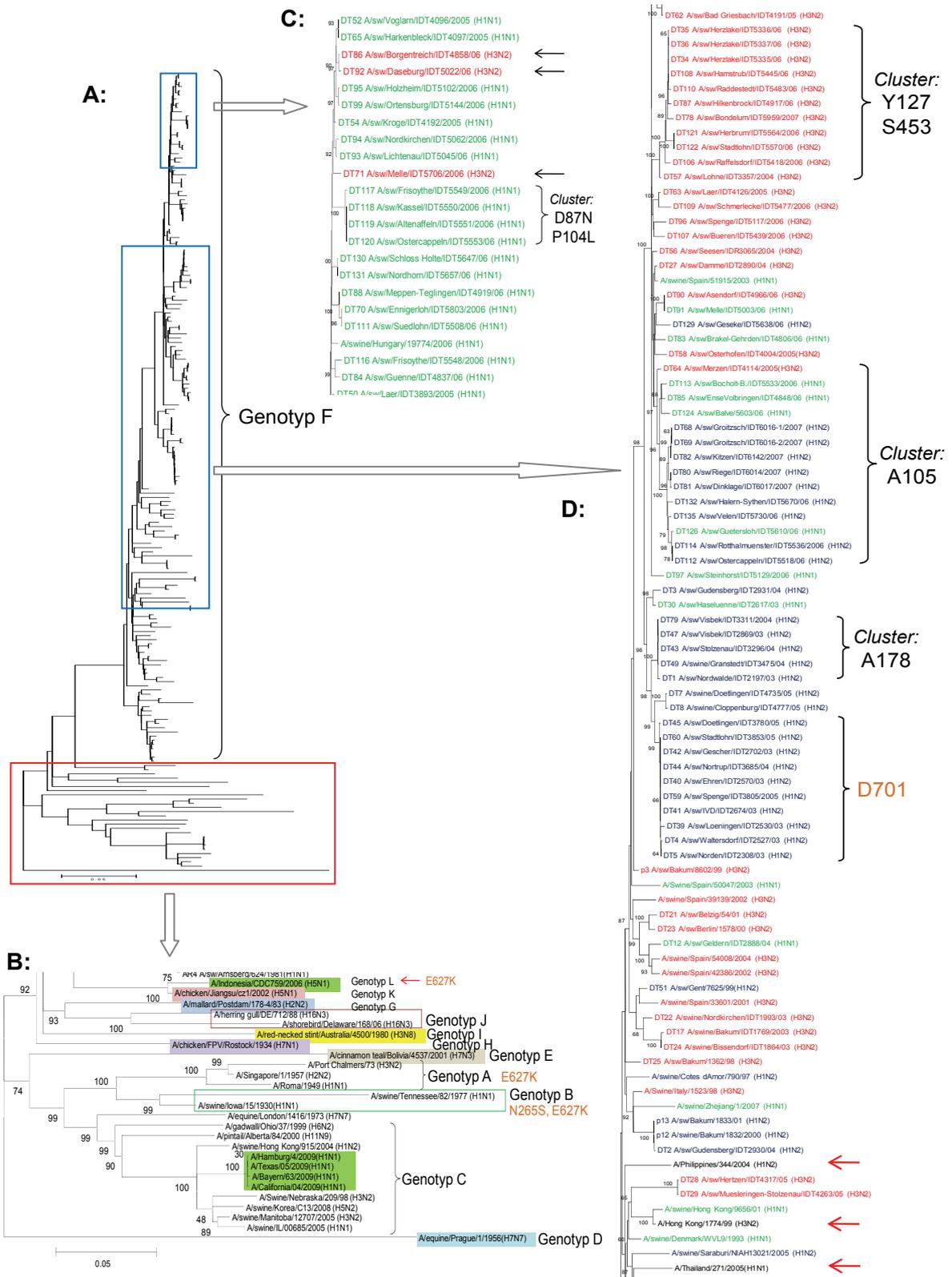


Abb. 20: Phylogenetische Analyse des Segmentes PB2 (2280 nt) von 191 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsstammbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen A-E, G-K; **C** und **D:** Ausschnitte des Genotypen F (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: *avian-like* H1N1-Linie; blau: *human-like* H1N2-Linie; rot: *human-like* H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; orange: pathogenitätsbeeinflussende Substitutionen

Polymeraseaktivität und höherer Virulenz in Verbindung gebracht (Labadie et al., 2007) und ist bei den Vertretern der Genotypen A und B sowie dem Virusisolat A/Indonesia/CDC759/06 (H5N1) zu finden (Abb. 20B). Die restlichen Viren mit Ausnahme von A/sw/Italy/670/87 (H1N1) (V627) weisen Glutaminsäure an dieser Position auf.

Die Mutation D701N ermöglicht eine verbesserte Interaktion des aviären PB2 mit Importin α sowie einer gesteigerten Transkriptions- und Replikationsrate (Gabriel et al., 2005, 2008). 120 Viren des Genotyps F sowie das Virusisolat A/equine/Praque/1/56 (H7N7) weisen diese AS-Substitution auf. Die Vertreter der Genotypen L, K, G, J, I, H, E, B, C und A (Ausnahme: A/Port Chalmers/73 - E701) sowie 12 eurasisch porcine Viren kodieren für die AS Aspartat. Zehn der 12 Schweineviren sind aus dem Zeitraum 2003-2005, sie besitzen den gleichen Subtyp (H1N2) und bilden zusammen ein Cluster (Abb. 20D). Die anderen beiden H1N1-Stämme (A/sw/Netherlands/25/80 und A/sw/Arnsberg/6554/79) wurden in den Jahren 1979 und 1980 isoliert und gruppieren zusammen mit älteren Stämmen des gleichen Subtyps.

Die in der Literatur beschriebenen AS-Substitutionen T333I, S714R und E158G (vergl. Tab. 2a, Seite 22) konnten innerhalb dieser Untersuchung nicht detektiert werden.

Die H1N1-Virusisolate A/sw/Friesoythe/IDT5549/06, A/sw/Kassel/IDT5550/06, A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 und A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 bilden einen eigenen Zweig innerhalb der eurasisch porcinen Viren. Die Sequenzdaten zeigen, dass sich diese Viren in den Aminosäurepositionen D87N und P104L von den anderen unterscheiden (Abb. 20C). Ein Cluster von 14 europäischen Schweineviren hat die AS Alanin an Position 105 gemeinsam. Auffällig ist, dass das älteste Isolat vom Subtyp H3N2 (2005) ist, gefolgt von H1N1 (2006) und H1N2 (2006 und 2007) (Abb. 20D). Weitere Cluster-bildende Mutationen sind dem Stammbaum der Abbildung 20D zu entnehmen.

II. Segment 2 – PB1

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse von 199 PB1-Sequenzen (132 eigene sowie 67 GenBank-Sequenzen) ist in Abbildung 21 dargestellt. Die zu Genotyp G gehörenden eurasischen Schweine- und Vogelviren weisen eine enge Verwandtschaft zueinander auf. Größere genetische Distanzen zu Genotyp G sind in den Sequenzdaten der humanen, der nordamerikanisch aviären und der *classical swine*-Viren zu finden. Letzt genannte Viren sind mit dem PB1 humaner H1N1-Viren eng verwandt (Genotyp A). Dem Genotyp D hingegen werden die humanen H3N2- und die Tripelreassortanten einschließlich der pandemischen A/H1N1v-Viren zugeordnet. Die aus Menschen isolierten H2N2-Viren gehören dem Genotyp E an.

Analog zu Segment 1 sind innerhalb der Genotyp-G-klassifizierten Viren wirtsübergreifende Infektionen nachweisbar. So entspricht das Segment 2 der humanen Virusisolate A/Thailand/271/05 (H1N1) und A/Philippines/344/04 (H1N2) dem der

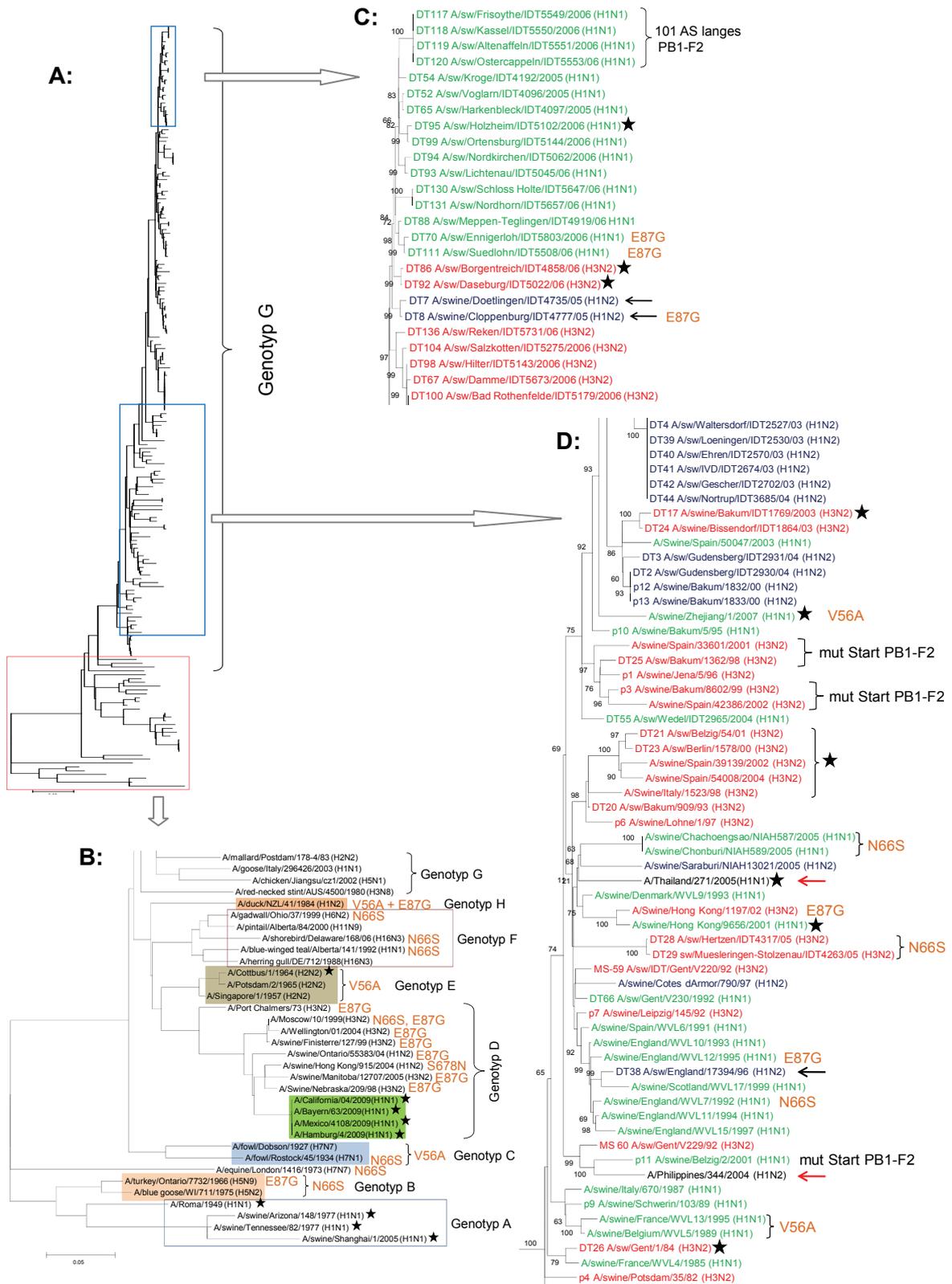


Abb. 21: Phylogenetische Analyse des Segmentes PB1 (2274 nt) von 199 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen A-H; **C und D:** Ausschnitte des Genotypen G (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: avian-like H1N1-Linie; blau: human-like H1N2-Linie; rot: human-like H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; orange: pathogenitätsbeeinflussende Substitutionen; Stern: nicht funktionsfähiges PB1-F2 (Trunkierung)

eurasisch porzinen Viren. Hinweise auf Reassortierungen liefern die PB1-Sequenzen der H1N2-Viren A/sw/England/17394/96, A/sw/Doetlingen/IDT4735/05 und A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05. In den Abbildung 21B, -C und -D sind zusätzlich Virusstämme mit Besonderheiten im PB1-F2 markiert. Dazu gehören zum einen Virusisolate, die ein verlängertes PB1-F2 (101 AS) besitzen, zum anderen Stämme mit trunkiertem, nicht funktionsfähigem Protein (☆) sowie Viren mit einem mutierten Startcodon (M→T). Die Mehrzahl der eurasisch porzinen Viren weist ein 79 bis 90 AS langes Protein auf, welches im Allgemeinen als funktionsfähig gilt (Zell et al., 2007). Die Häufigkeit der in dieser Studie nachgewiesenen PB1-F2-Varianten ist in Tabelle 19 zusammengefasst (detaillierte Auflistung: Tab. A3).

Auch für das PB1 werden einige Aminosäurepositionen im Zusammenhang mit der Pathogenität der Viren beschrieben. Dazu zählen die AS-Positionen 13, 436, 678 sowie die Aminosäuren 51, 56, 66 und 87 des PB1-F2-Leserahmens (Tab. 2a, Seite 22). Die AS Prolin an Position 13 wird mit einer gesteigerten Polymeraseaktivität assoziiert (Gabriel et al., 2005) und konnte in allen hier untersuchten PB1-Sequenzen nachgewiesen werden. Die von Hulse-Post et al. (2007) publizierte AS-Substitution Y436H wurde beim Vergleich der AS-Sequenzen nicht detektiert. Die Mutation S678N (Gabriel et al., 2005) bewirkt bei der Vermehrung hochpathogener Vogelviren in Säugerzellen eine gesteigerte Polymeraseaktivität und wurde nur beim H1N2-Virusisolat A/sw/HongKong/915/05 (Genotyp D) beobachtet. Die AS-Substitution N66S, welche unter anderem mit der Inhibierung der frühen Interferon-Antwort in Verbindung gebracht wird (Conenello et al., 2007, 2011), tritt bei insgesamt 6 aviären (Genotyp B, C, F), 5 porzinen (Genotyp G), 1 humanen (Genotyp D) sowie einem equinen Virusisolat auf (Abb. 21B und -D). Die restlichen Viren mit Ausnahme von A/sw/England/WVL15/97 (H1N1) (Genotyp G; I66) verfügen über ein Asparagin an Position 66. Die AS-Substitutionen T51M, V56A und E87G wurden erst kürzlich in einer Studie als pathogenitätsverringern beschrieben (Marjuki et al., 2010). Welche AS-Position für die Veränderung der Virulenz verantwortlich ist, konnte noch nicht bestimmt werden. Nur vier Isolate weisen ein Methionin an Position 56 auf (A/sw/England/WVL15/1997 (H1N1), A/sw/Zhejiang/1/2007 (H1N1), A/sw/Chachoengsao/NIAH587/05 (H1N1), A/equine/London/1416/73 (H7N7)). Die Substitution V56A ist bei den Vertretern der Genotypen C, E und H sowie bei drei H1N1-Stämmen des Genotyps G (A/sw/Zhejiang/1/2007, A/sw/France/WVL13/1995, A/sw/Belgium/WVL5/1989) nachzuweisen (Abb. 21B und -D). Virusisolate, bei denen der AS-Austausch von E→G der Position 87 des PB1-F2 detektiert wurde, sind den Abbildungen 21B, -C und -D zu entnehmen.

Tab. 19: Verteilung der Influenza-A-Viren und Genotypen bezüglich der Größe [AS] des PB1-F2

Länge [AS]	8	11	18	24	34	37	57	79	81	87	90	101	mut. Start
Anzahl	2	10	1	1	1	3	6	14	2	5	145	4	5
Genotyp	G	A, D, G	G	G	G	G	A, D, E, G	G	G	C, F, G	B-H	G	G

III. Segment 3 – PA

Der Übersichtsstammbaum des 3. Segmentes umfasst 201 PA-Sequenzen (132 eigene und 69 GenBank-Daten) von Influenza-A-Viren unterschiedlicher Genotypen. Die engen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den eurasisch porzinen und den europäisch aviären Viren drückt sich im gemeinsamen Genotyp I aus. Das PA der Tripelreassortanten sowie das der pandemischen A/H1N1v-Viren stammt von den nordamerikanischen Vogelviren (Genotyp E) ab (Abb. 22B). Die humanen H1N1-, H2N2- und H3N2-Viren (Genotyp A und B) weisen im PA eine enge Verwandtschaft zu den *classical swine*-Viren (Genotyp C) und einer weiteren Gruppe nordamerikanischer Vogelviren auf (Genotyp K). Beispiele für Transspeziesinfektionen und Reassortierungen innerhalb des Genotyps I sind im Stammbaum (Abb. 22C und -D) gekennzeichnet.

Auffällig ist ein Zweig mit 15 H1N2-Virusstämmen aus den Jahren 2003 bis 2005. Ein Sequenzvergleich auf AS-Ebene zeigte, dass vier bzw. 11 der 15 Viren über ein Threonin an Position 438 bzw. 333 verfügen (Abb. 22D). Ein Leucin an Position 441 verbindet diese 15 H1N2-Viren und grenzt sie zu den restlichen Virusisolaten des Genotyps I ab. Letztgenannte Position tritt durch vier weitere AS-Veränderungen hervor. Jeweils in einem Cluster befinden sich Virusisolate, welche anstelle des Methionins für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Valin und Alanin an Position 441 kodieren (Abb. 22C und -D). Eine Gruppe von sechs H3N2-Viren, einschließlich A/sw/Raffelsdorf/IDT5418/06 (außerhalb des Clusters) weist die AS-Substitution Y464H auf (Abb. 22C). Ein anderer Zweig bestehend aus H1N1- und H3N2-Stämmen der Jahre 2005-2007 kodiert für die Aminosäure 438 Valin anstelle eines Isoleucins (Abb. 22C). Das Virus A/sw/Bakum/909/93 (H3N2), welches ebenfalls über die AS-Substitution I438V verfügt, wurde ~ 13 Jahre früher isoliert und clustert mit Viren aus dem Zeitraum von 1992-2004 (Daten nicht gezeigt). Die H3N2-Stämme A/sw/Hertzen/IDT4317/05 und A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 fallen durch folgende AS-Veränderungen auf: P221Q, S617F, V/A/T619K.

Bei der Vergleichsanalyse der 201 PA-Sequenzen bezüglich der in Tabelle 2a (Seite 22) aufgelisteten Mutationen konnten keine Veränderungen der Positionen K102, D108, K134, H510 und T515 festgestellt werden. Die AS Prolin anstelle eines Serins an der Position 224 tritt nur bei dem pandemischen Isolat A/California/04/2009 (H1N1) auf (Abb. 22B). Diese Mutation wird mit einer höheren Virulenz und verbesserten Replikation in Entenzellen assoziiert (Song et al., 2011). Die Substitution N383D (↑ Polymerase-Aktivität; Song et al., 2011) weisen mit Ausnahme von drei humanen H3N2-Stämmen (A/Port Chalmers/73, A/Moscow/10/1999, A/Wellington/01/04) alle hier untersuchten PA-Sequenzen auf. Die H1N2-Viren des T330-Clusters treten durch den Besitz von Lysin an Position 615 hervor. Bis auf 2 Genotyp-C-Viren (A/sw/Tennessee/82/77 (H1N1) und A/sw/Shanghai/1/05 (H1N1): D615) und zwei europäischen Schweineviren (A/sw/Ense

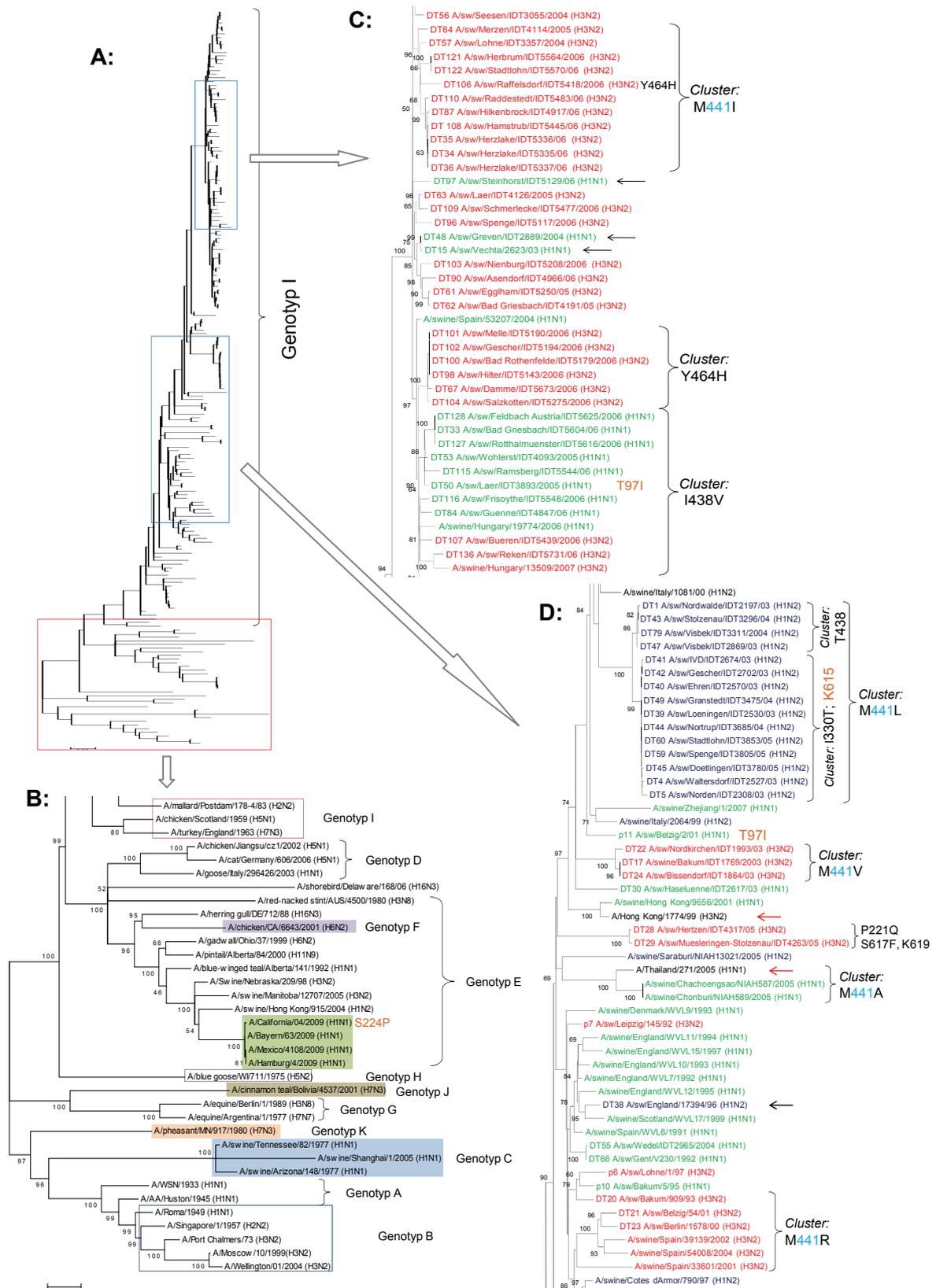


Abb. 22: Phylogenetische Analyse des Segmentes PA (2154 nt) von 201 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen A-K; **C** und **D:** Ausschnitte des Genotypen I (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: avian-like H1N1-Linie; blau: human-like H1N2-Linie; rot: human-like H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; orange: pathogenitätsbeeinflussende Substitutionen

Volbringen/IDT4848/06 (H1N1) und A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1): T615) verfügen die restlichen Viren über ein Asparagin an jener Position. Diese Substitution (K615N) wurde in einer Studie von Gabriel et al. (2005) als virulenzsteigernd identifiziert. Der Austausch T97I, welcher bei der Adaption aviärer Viren an Säugetierzellen nachgewiesen worden ist (Song et al., 2009), konnte bei A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) und A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1) detektiert werden (Abb. 22C und -D).

IV. Segment 4 – HA

Für das 4. Segment wurden zwei phylogenetische Analysen entsprechend den Subtypen H1N1/H1N2 und H3N2 durchgeführt. Der in Abbildung 23 dargestellte Stammbaum zeigt folgende als Genotyp 1A klassifizierten Viren: die *classical swine*-Viren, humane Viren vor 1933, Tripelreassortanten aus Nordamerika und das pandemische A/H1N1v-Virus. Das H1 nachstehender humaner und porziner Stämme stammt vom H1 der *classical swine*-Viren ab: A/Philippines/344/04 (H1N2), A/Thailand/217/05 (H1N1), A/sw/Chonburi/NIAH589/05 (H1N1) und A/sw/Chachoengsao/NIAH587/05 (H1N1). Das H1 humaner (nach 1933) und europäisch porziner H1N2-Viren wird dem Genotyp 1B zugeordnet. Innerhalb dieser humanen Stämme clustert das HA weiterer nord-amerikanischer Schweineviren. Eng verwandt zu dem H1 der in Eurasien isolierten Vogel-viren ist das H1 der eurasischen Schweineviren der H1N1-Linie (*avian-like*; Genotyp 1C). Beispiele für Transspeziesinfektionen innerhalb des Genotyps 1C finden sich in den humanen Isolaten A/Schweiz/8808/02 (H1N1) und A/sw/Netherlands/386/86 (H1N1) wieder. Die Nomenklatur des letztgenannten Isolates wurde nachträglich geändert. Eine weitere Besonderheit stellt das Virus A/sw/Germany/Sek1178/00 dar. Das HA dieses H1N2-Virus clustert nicht wie erwartet mit dem H1 der H1N2-Viren sondern mit dem H1 der H1N1-Virusisolate.

Innerhalb des Genotyps 1C (*avian-like* H1N1) fallen zwei Cluster auf, welche sich in der Aminosäuresequenz an mindestens zwei Positionen unterscheiden (Abb. 23B). Der untere Zweig enthält Stämme aus den Jahren 1977 bis 1999, welche an Position 106 ein Threonin aufweisen (Abb. 23B). Der obere Zweig bestehend aus Virusisolaten der Jahre 2001 bis 2006 trägt an dieser Position ein Alanin. Die in dieser Arbeit untersuchten europäischen porzinen Viren des Genotyps 1B (*human-like* H1N2) weisen an der AS-Position 106 alle ein Isoleucin auf (Ausnahme A/sw/England/191973/92: T106) (Abb. 23C). Die AS-Substitution Q382L haben 27 porzine H1N2-Stämme gemeinsam.

Eine detaillierte Auflistung der Rezeptorbindungsstellen sowie angrenzender Aminosäuren der untersuchten 139 HAH1-Sequenzen (81 eigene sowie 58 GenBank-Sequenzen) ist der Tabelle A4 zu entnehmen. Während die für die Rezeptorbindung zuständigen Aminosäuren Y108, W167, H197, Q240 und G242 hoch konserviert sind,

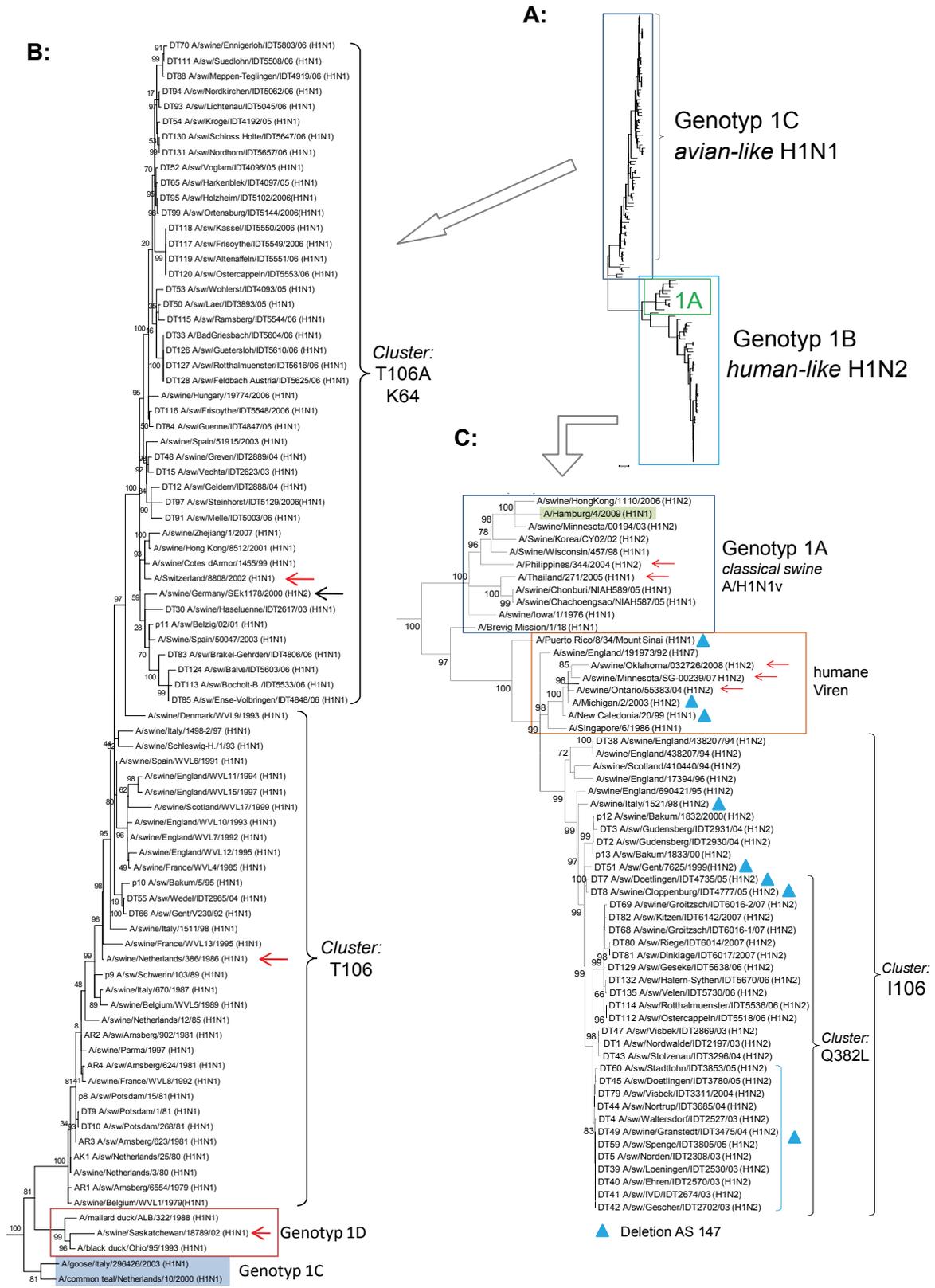


Abb. 23: Phylogenetische Analyse des Segmentes HAH1 (1701 nt) von 139 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, TN93+G+I, NNI); **A:** Übersichtsstammbaum; **B:** swH1N1-Linie des Genotyps 1C (*avian-like*) einschließlich aviäre Viren des Genotyp 1E und 1D; **C:** swH1N2-Linie des Genotyps 1B (*human-like*) einschließlich der humanen Viren sowie Genotyp 1A; Farbkodierung: schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion

weisen die Positionen 150 und 208 folgende AS-Substitutionen auf: T150S sowie L208I (Ausnahmen: 208M: A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) und 208T: A/sw/England/690421/95 (H1N2)). Die an die Rezeptorbindestellen angrenzenden Aminosäuren sind stark variabel. Erwähnenswert ist die Position 147. Hier weisen 19 porcine *human-like* H1N2-Stämme sowie drei humane Viren der Subtypen H1N1 (A/Puerto Rico/8/34, A/New Caledonia/20/99) und H1N2 (A/Michigan/2/03) eine Deletion auf (vergl. Abb. 23 und Tab. A4).

Die Verteilung des Glykosylierungsmusters ist in Tabelle 20 zusammengefasst. Jedoch sind lediglich die Daten für die Genotypen 1B und 1C repräsentativ. Glykosylierungssequenzen an den Positionen 27, 28 und 40 weisen alle hier untersuchten Sequenzen auf. Für die Aminosäuren 498, 502 und 557 konnte dies in drei Fällen (A/Switzerland/8808/02 (H1N1), A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1), A/sw/Netherlands/386/1986 (H1N1)) aufgrund von Partialsequenzen nicht bestätigt werden (Tab. A5). Die H1N2-Virusisolate A/sw/Doetlingen/IDT4735/05 und A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 besitzen an der Position 158 eine zusätzliche Glykosylierungsstelle. Gleiches konnte für A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1) an Position 275 sowie für A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1) an Position 502 ermittelt werden.

Tab. 20: Verteilung des Glykosylierungsmusters von 139 HAH1-Influenza-A-Sequenzen

GT	AS-Position (Anzahl an positiven/negativen Isolaten)															
	27	28	40	104	142	158	172	177	212	275	286	291	304	498	502	557
1A	11/0	11/0	11/0	11/0	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	11/0	10/-	0/10-	10/-
1B	46/0	46/0	46/0	3/43	5/41	2/44	36/10	44/2	0/46	0/46	41/5	0/46	46/0	46/0	0/46	45/-
1C	79/0	79/0	79/0	36/43	0/79	0/79	0/79	0/79	42/37	1/79	0/79	61/18	19/60	77/-	1/76-	77/-
1D	3/0	3/0	3/0	3/0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/0	3/0	0/3	3/0

GT: Genotyp; -: fehlende Referenzsequenz

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse des HAs der H3N2-Viren ist in Abbildung 24 dargestellt. Die 96 untersuchten Viren (51 eigene sowie 45 GenBank-Sequenzen) werden in die Genotypen 3A, 3B, 3C, 3D und 3F unterteilt. Die eurasisch porcinen Viren bilden zusammen mit den humanen H3N2-Stämmen und den nordamerikanisch porcinen Tripelreassortanten Genotyp 3A. Ebenfalls diesem Genotyp zugeordnet ist das Vogelisolat A/duck/Chabarovsk/1610/72 (H3N8), ein möglicher Vertreter der aviären Ausgangslinie. Auffällig sind die H3N2-Viren A/sw/Karrenzien/2/96, A/sw/Potsdam/35/82 und A/sw/Leipzig/145/92, die nicht wie erwartet mit den übrigen Schweineviren aus Eurasien clustern sondern sich innerhalb der humanen H3N2-Viren gruppieren. Inmitten der eurasisch porcinen Viren clustert ein H3N1-Virus (A/sw/Italy/66945/06), welches als Beleg für ein Reassortierungsereignis angesehen werden kann (Abb. 25). Hinweise für

wirtsübergreifende Infektionen sind auch in diesem Stammbaum zu finden: A/wild boar/Germany/WS169/06 (H3N2) und A/HongKong/1774/99 (H3N2) (Abb. 24).

Die hier untersuchten Stämme der Genotypen 3A bis 3F lassen sich anhand der Aminosäureposition 364 in zwei Gruppen einteilen (Abb. 24). Über Asparaginsäure verfügen die Viren der Genotypen 3B, 3C, 3D und 3F sowie 32 Virusisolate vom Typ 3A. Letzterer beinhaltet die nordamerikanischen porzinen Tripel-Reassortanten und humane H3N2-Viren sowie eurasisch porzine Viren der Jahre 1984-2005 (Abb. 24). Der Übergang von Asparaginsäure zu Asparagin fand innerhalb der eurasisch porzinen Viruslinie statt. Das älteste Isolat (A/sw/Jena/5/96 (H3N2)) mit dieser Substitution stammt aus dem Jahre 1996. Über die AS 219 ist sogar eine Dreiteilung des Stammbaumes möglich. Threonin an dieser Position tritt bei den Vertretern der Genotypen 3B, 3C, 3D und 3F sowie bei 37 Typ-3A-Viren auf. Das erste Isolat mit der Substitution T219I stammt aus der eurasisch porzinen Linie und wurde 1993 isoliert (A/sw/Bakum/909/93 (H3N2)). Für Methionin kodieren lediglich vier deutsche Schweineviren aus dem Jahre 2006. Bei Betrachtung des H3-Stammbaumes fallen die H3N2-Virusisolate A/sw/Hertzen/IDT4317/05 und A/sw/Muesleringen-Stolzenau/IDT4263/05 auf Grund ihrer großen genetischen Distanz zu den übrigen Viren auf. Mittels eines Alignments konnten folgende Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu den übrigen HAH3-Sequenzen dieser Studie detektiert werden: D/N47G, P119S, Y273H, T432A und E/G495K. Weitere AS-Substitutionen, die zur Clusterbildung beitragen, können der Abbildung 24 entnommen werden.

In der Tabelle A6 des Anhangs sind die Rezeptorbindungsstellen einschließlich der benachbarten Aminosäuren der 96 HAH3-Sequenzen aufgeführt. Unter den hier untersuchten Positionen fallen die Aminosäuren Y98, G134, S136, W153, H183, Y195 und R224 durch ihre hohe genetische Stabilität auf. Im Gegensatz dazu sind die AS der Positionen 135, 137, 155, 190 und 226 innerhalb der Referenzstämme variabel.

Tabelle 21 verdeutlicht die Verteilung der Glykosylierungen von insgesamt 96 HAH3-Influenza-A-Sequenzen. Mit Ausnahme von Typ 3A können über die anderen Genotypen aufgrund der geringen Virenanzahl keine repräsentativen Aussagen getroffen werden. Die Glykosylierungsstellen 8, 22, 38, 63, 126, 165, 285 und 483 treten mit einer Häufigkeit von 80 bis 100 % auf. Im Vergleich dazu wurden an den Positionen 81, 122, 133 und 246 seltener Glykosylierungssequenzen nachgewiesen (Genotyp 3A und 3B).

Tab. 21: Verteilung des Glykosylierungsmusters von 96 HAH3-Influenza-A-Sequenzen

GT	AS-Position (Anzahl an positiven/negativen Isolaten)													
	8	22	38	45	63	81	122	126	133	144	165	246	285	483
3A	79/7	86/0	86/0	64/22	84/2	3/83	11/75	81/5	5/81	58/28	86/0	13/73	86/0	86/0
3B	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	0/2	0/2	1/1	0/2	0/2	2/0	2/0	0/2	2/0
3C	3/0	3/0	3/0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/0	0/3	3/0	3/0
3D	3/0	3/0	3/0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/0	0/3	3/0	3/0
3F	-	2/0	2/0	0/2	2/0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/0	0/2	2/0	1/1

GT: Genotyp; -: fehlende Referenzsequenz

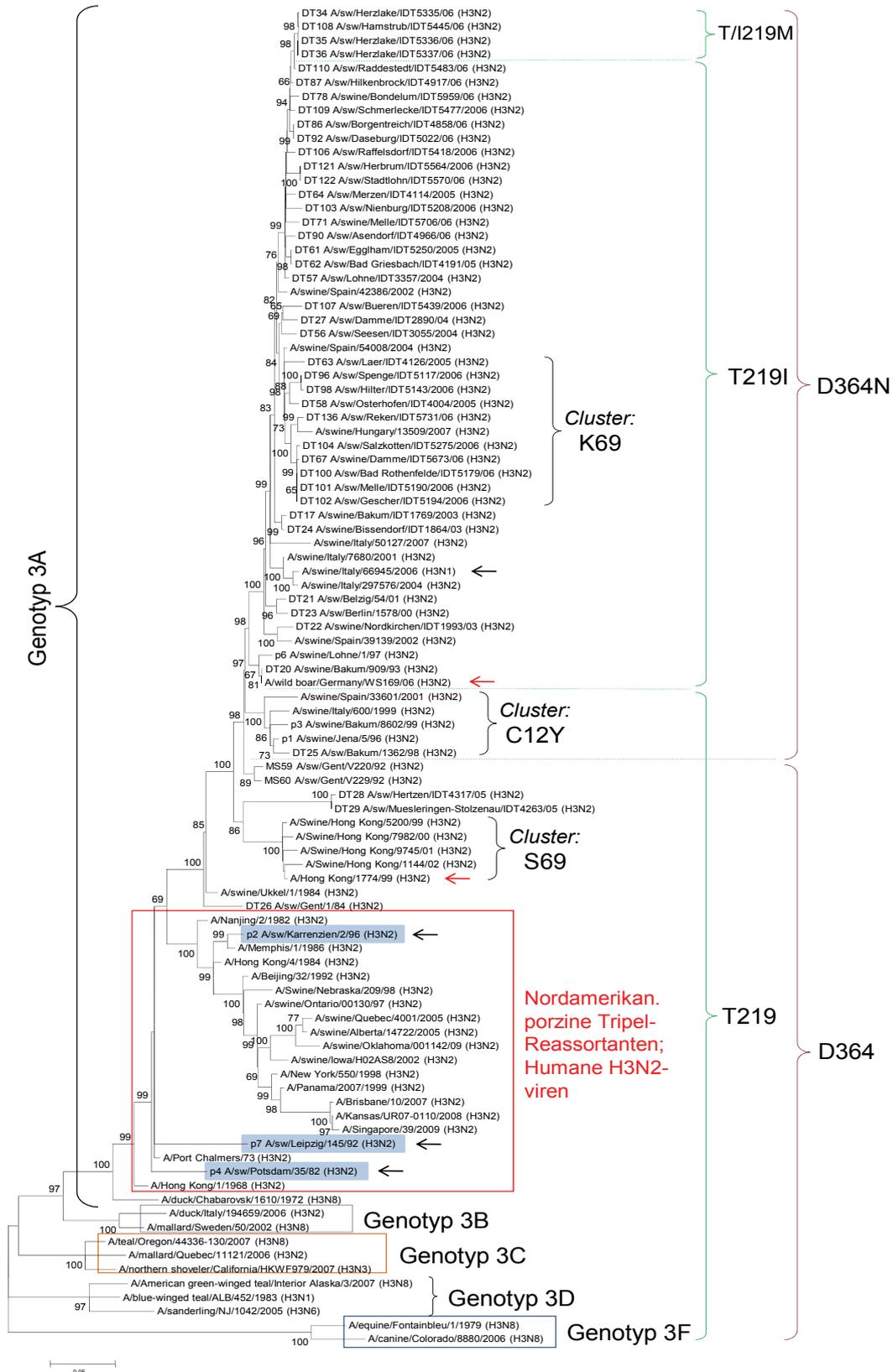


Abb. 24: Phylogenetische Analyse des Segmentes HAH3 (1701 nt) von 96 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); Darstellung der eurasisch porcinen Viren, der humanen H3N2-Stämme sowie der nordamerikanisch porcinen Tripelreassortanten (Genotyp 3A) und der Referenzgenotypen 3B, 3C, 3D, 3E; Farbkodierung: schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion

V. Segment 5 – NP

Die genetische Charakterisierung des Nukleoproteins umfasste 201 Sequenzen (132 eigene und 69 GenBank-Daten) der Genotypen A bis H. Genotyp A, bestehend aus humanen Viren, den pandemischen A/H1N1v-Viren, Vertretern der *classical swine*-Linie und den H3N2-Tripelreassortanten sowie den davon abgeleiteten H1N1- und H1N2-Stämmen, grenzt sich klar vom Genotyp F ab. Innerhalb der humanen H1N1-, H2N2- und H3N2-Viren clustern die europäisch porzinen Virusisolate A/sw/Finisterre/127/99 (H3N2), A/sw/England/191973/92 (H1N7), A/sw/Cambridge/39 (H1N1) und A/sw/Northern Ireland/38 (H1N1). Auf das Vorhandensein von *classical swine*-Viren in Europa weisen die Isolate A/sw/Italy/437/76 (H1N1) und A/sw/Italy/141/81 (H1N1) hin. Diese werden ebenfalls als Genotyp A klassifiziert und clustern zusammen mit den *classical swine*-Viren. Dem Genotyp B wurden bisher nur sechs Influenza-A-Viren zugeordnet (Stand März 2011). Dazu gehören drei nordamerikanische Schweineviren, bei denen es sich um die drei ältesten *classical swine*-Viren handelt (Abb. 25B). Desweiteren sind zwei humane Virusisolate (A/Bulgaria/12/82, A/Memphis/5/87) sowie ein aviärer Stamm (A/chicken/AR/30402/99) als Typ B bestimmt worden. Anhand des vorliegenden Stammbaumes ist die Klassifizierung der Typ A- und -B-Viren nicht nachvollziehbar. Genotyp F enthält die eurasisch porzinen Viren inklusive der eurasischen Vogelviren. Innerhalb dieser monophyletischen Linie liegen die humanen Stämme A/Thailand/271/05 (H1N1) und A/HongKong/1774/99 (H3N2).

Beispiele für Reassortierungen und wirtsübergreifende Infektionen sind auch im Segment 5 zu finden und können dem Phylogramm entnommen werden (Bsp.: A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2), A/sw/England/17394/96 (H1N2), A/sw/Finisterre/127/99 (H3N2), A/sw/Cambridge/39 (H1N1); Abb. 25B, -C und -D).

Sechzehn europäische Schweineviren aus den Jahren 1979 bis 1992 sowie die in dieser Arbeit untersuchten Referenzstämme fallen durch das Vorhandensein von Lysin an Position 48 auf. Ein Übergang zu Glutamin fand zwischen 1989 bis 1992 statt. Ein Zweig mit 3 H1N1- und 14 H1N2-Stämmen differenziert sich durch ein Glycin an Position 50 von den anderen Stämmen des Genotyps F. Außerhalb dieser Gruppe weist nur noch das Isolat A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) diese Veränderung auf (S50G). Die H1N1-Virusisolate A/sw/Friesoythe/IDT5549/06, A/sw/Kassel/IDT5550/06, A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 und A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 haben von allen hier untersuchten Stämmen ein Asparagin an Position 430 gemeinsam (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer AS-Austausch, welcher in nur drei porzinen H3N2-Stämmen nachzuweisen ist, betrifft die Position 332. Anstelle eines Alanins kodieren A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03, A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 und A/sw/Bakum/IDT1769/03 für ein Serin (Abb. 25D).

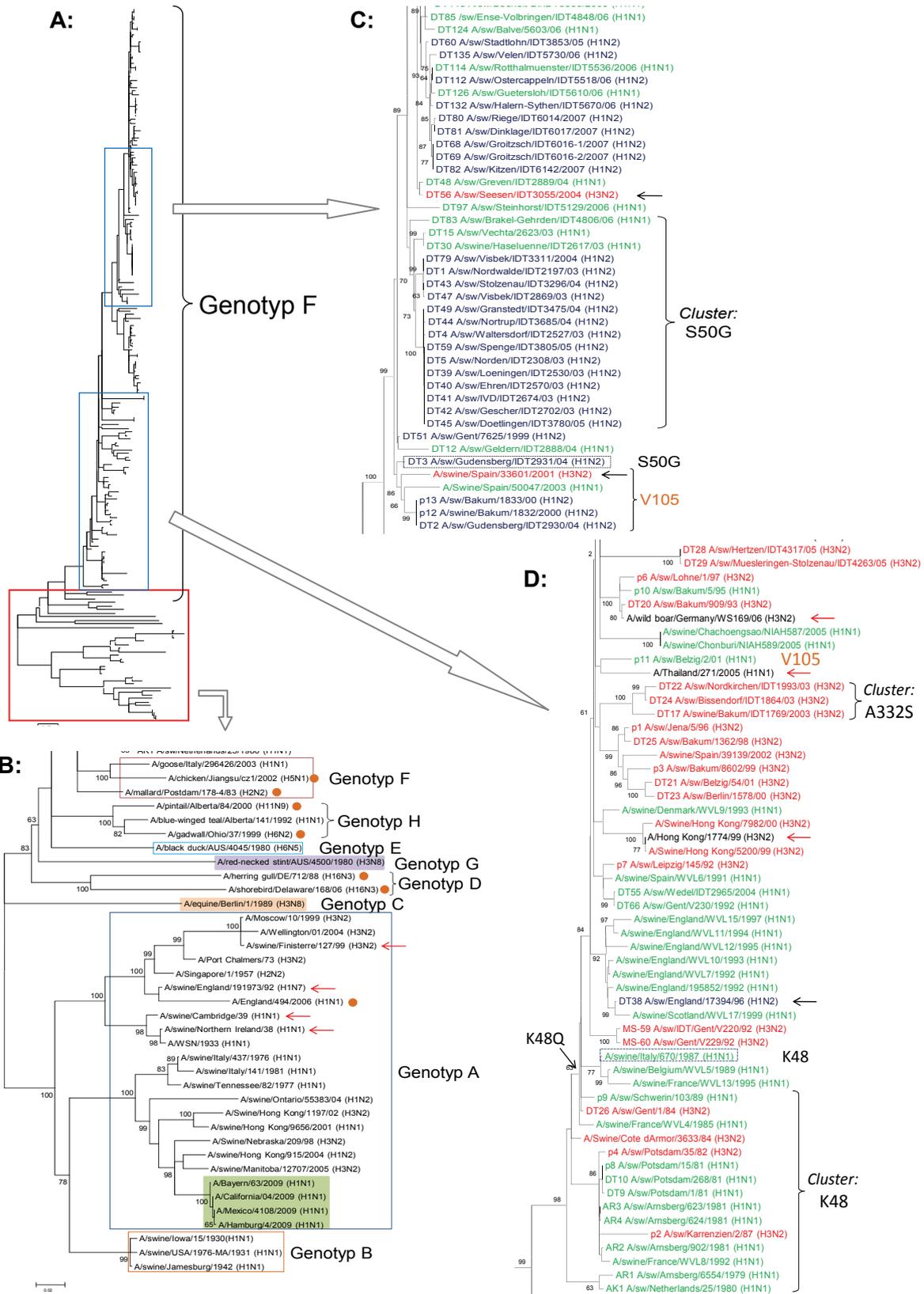


Abb. 25: Phylogenetische Analyse des Segmentes NP (1497 nt) von 201 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsstammbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen A-H; **C** und **D:** Ausschnitte des Genotypen F (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: avian-like H1N1-Linie; blau: human-like H1N2-Linie; rot: human-like H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; oranger Punkt bzw. Schrift: Virulenzmarker V105

Bezüglich der pathogenitätsbestimmenden AS 184 (vergl. Tab. 2a; Seite 22) weisen alle hier untersuchten Stämme ein Lysin auf. Die AS-Substitution N319K, welche unter anderem mit einer verbesserten Bindung an Importin α assoziiert wird (Gabriel et al., 2008), konnte nur bei dem Pferdeisolat A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8) festgestellt werden. Eine erst kürzlich als Virulenzmarker identifizierte AS betrifft die Position 105 (Tada et al., 2011). In Abbildung 25B sind die Isolate, welche über die Substitution 105V verfügen, mit einem orangen Punkt markiert. Innerhalb des Genotyps F kodieren 6 europäisch porcine Viren für Valin anstelle eines Methionins. Fünf der Viren bilden ein Cluster (Abb. 25C).

VI. Segment 6 – NA

Analog zum Segment 4 wurden auch für das NA-Segment zwei getrennte Berechnungen durchgeführt. Stammbaum NAN1 enthält bis auf einige Ausnahmen Viren des Subtyps H1N1, Stammbaum NAN2 vorwiegend H1N2- und H3N2-Isolate.

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse von 108 NAN1-Sequenzen (48 eigene sowie 60 GenBank-Sequenzen) zeigt die Genotypen 1A bis 1L. Die eurasisch porcine Viren (*avian-like* H1N1) sowie die pandemischen A/H1N1v-Virusisolate werden dem Genotyp 1F zugeordnet. Diese sind eng mit einigen eurasisch aviären Viren verwandt. Die zum Genotyp 1A gehörenden humanen H1N1-Viren zeigen enge Verwandtschaftsbeziehungen zu den *classical swine*-Viren des Genotyps 1B. Gleiches konnte für das Segment HA gezeigt werden. Auffällig ist die Lage des Virusstammes A/sw/Saskatchewan/18789/02 (H1N1), welches mit den nordamerikanischen Vogelviren des Genotyps 1E clustert. Die eurasisch porcine Viren teilen sich in 2 große Gruppen ein, determiniert durch die AS-Positionen 9 (I/T) und 210 (D/G) (siehe Abb. 26). Die im oberen Cluster aufgeführten 16 Viren und A/sw/Hungary/19774/06 (H1N1) der Abbildung 26 unterscheiden sich von den anderen Stämmen des Genotyps 1F in Position 90 durch ein Prolin anstelle eines Serins. Eine weitere Gruppe von 14 europäischen Schweineviren hat an Position 388 ein Leucin gemeinsam. Die Substitution D344N, welche bereits in der Literatur mit einer Erhöhung der NA-Aktivität beschrieben wurde (Collins et al., 2009; Casalegno et al., 2010) ist bei den Stämmen des Genotyps 1B, den humanen H1N1-Isolaten A/Berlin/1/08 und A/WSN/33 sowie den Viren des Genotyps 1F mit Ausnahme von 9 europäischen Schweineviren der Jahre 1979-1992 (Y344) nachzuweisen (Abb. 26). Die zur Oseltamivir-Resistenz führende Mutation H275Y konnte in dieser Untersuchung nur im humanen Isolat A/England/494/06 (H1N1) beobachtet werden. Die AS-Substitutionen V267I, N307D und V321I wurden erst kürzlich mit einer reduzierten Oseltamivir-Suszeptibilität bei nordamerikanisch aviären Viren in Verbindung gebracht (Stoner et al., 2010). Die Isolate, welche über diese Substitutionen verfügen, sind dem

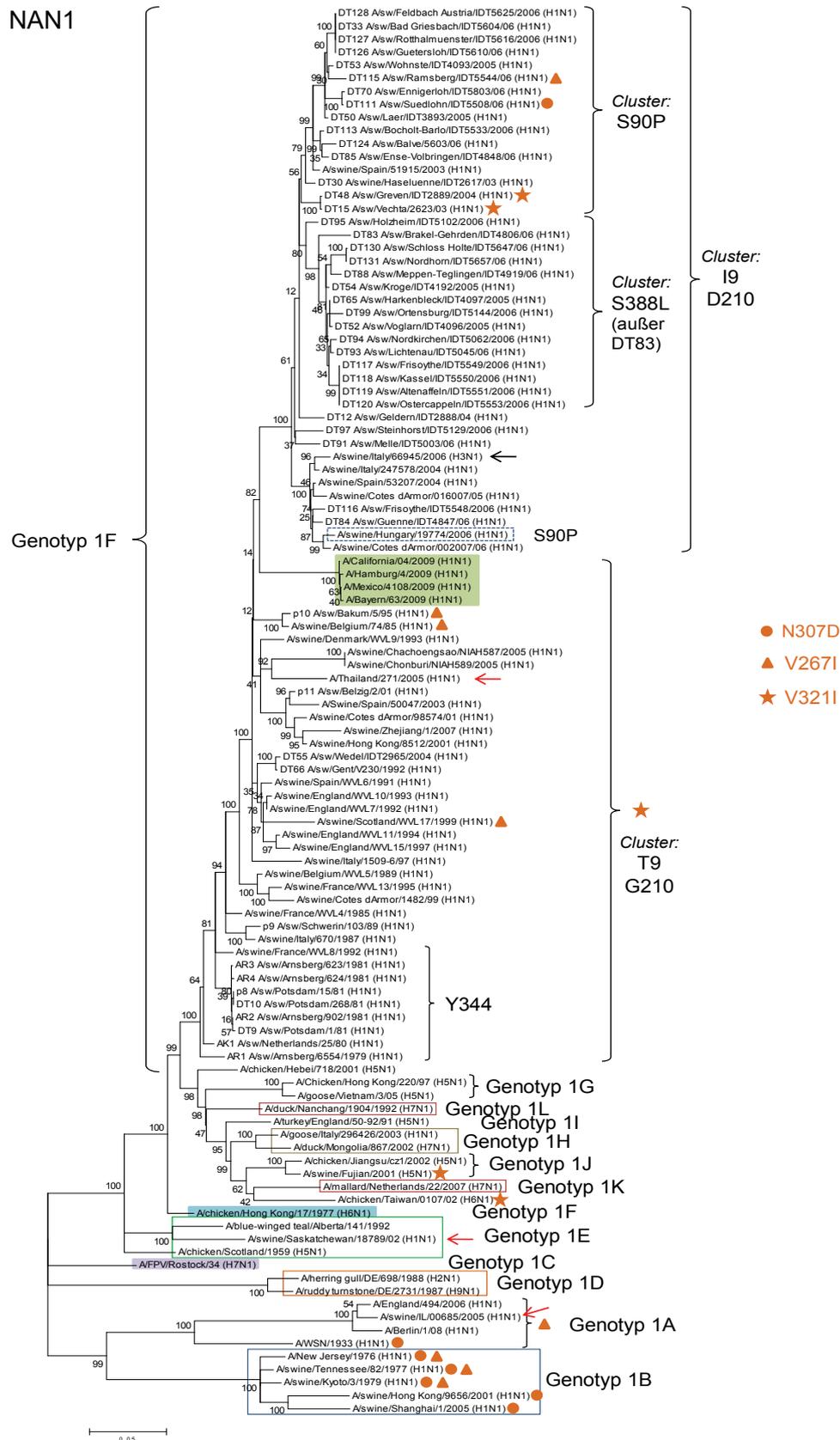


Abb. 26: Phylogenetische Analyse des Segmentes NAN1 (1413 nt) von 108 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); Darstellung des Genotyps 1F (eurasisch porcine und A/H1N1v-Viren, *avian-like*) sowie der Referenzgenotypen 1A bis 1L; Farbkodierung: schwarzer Pfeil: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; orange: Virulenzmarker

Stammbaum der Abbildung 26 zu entnehmen. Die V321I identifizierten eurasisch porzinen Viren befinden sich bis auf A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) und A/sw/Vechta/IDT2623/03 (H1N1) alle innerhalb des T9/G210-Clusters (Abb. 26).

Beim Vergleich des aktiven Zentrums und der angrenzenden Aminosäuren konnten bei den 108 verwendeten NAN1-Sequenzen keine Unterschiede festgestellt werden (Ausnahme: A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1): E277K; Tab. A8). In Tabelle 22 ist die Verteilung ermittelter Glykosylierungsstellen zusammengefasst. Analog zum HA können für die Referenzgenotypen keine repräsentativen Aussagen getroffen werden. An den AS-Positionen 50, 58, 63, 68, 88, 146 und 235 treten häufig Glykosylierungssequenzen auf. Im Vergleich dazu sind an den Positionen 42, 341, 381, 434 und 455 nur vereinzelt Glykosylierungsstellen zu finden (Tab. 22 und A9).

Tab. 22: Verteilung ermittelter Glykosylierungsstellen von 108 NAN1-Sequenzen nach Genotypen aufgeschlüsselt

GT	AS-Position (Anzahl an positiven/negativen Isolaten)													
	42	44	50	58	63	68	88	146	235	341	381	386	434	455
1F	2/81	42/41	66/17	83/0	83/0	80/3	46/37	83/0	83/0	1/82	1/82	46/37	0/83	0/83
1A	0/4	4/0	0/4	3/-	3/-	0/3-	4/0	3/1	4/0	0/4	0/4	0/4	3/-	3/1
1B	0/5	2/3	4/1	5/0	5/0	5/0	4/1	5/0	5/0	0/5	0/5	1/4	0/5	0/5
1C	0/1	0/1	1/0				1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
1D	0/2	0/2	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1E	0/3	0/3	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
1G	0/2	0/2	2/0				2/0	2/0	1/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1H	0/2	0/2	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1I	-	-	-	1/-	1/-	1/-	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1J	0/2	0/2	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	2/0	0/2	0/2
1K	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	2/0	2/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
1L	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	2/0	2/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

GT: Genotyp; -fehlende Referenzsequenz

Der Stammbaum NAN2 enthält die NA-Sequenzen von 136 Influenza-A-Viren (84 eigene und 52 GenBank-Daten). Dem Genotyp 2A zugeordnet und damit eng miteinander verwandt sind die eurasisch porzinen Viren der H1N2- und der H3N2-Linie, die humanen Viren sowie die nordamerikanisch porzinen H3N2-Tripelreassortanten und die davon abgeleiteten H1N2-Stämme. Das N2 der eurasischen Schweineviren stammt von frühen humanen H3N2-Stämmen ab (A/Port Chalmers/1/73) (Abb. 27B). Analog zu den bereits besprochenen Genomsegmenten finden sich in A/wild boar/Germany/WS169/06 (H3N2) und A/HongKong/1774/99 (H3N2) Hinweise auf Transspeziesinfektionen wieder. Anzeichen auf Rekombinationsereignisse liefern z.B. die H1N2-Virusisolate A/sw/Doettingen/IDT4735/05 und A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05, welche nicht wie erwartet mit den H1N2-Viren clustern sondern innerhalb der H3N2-Linie zu finden sind.

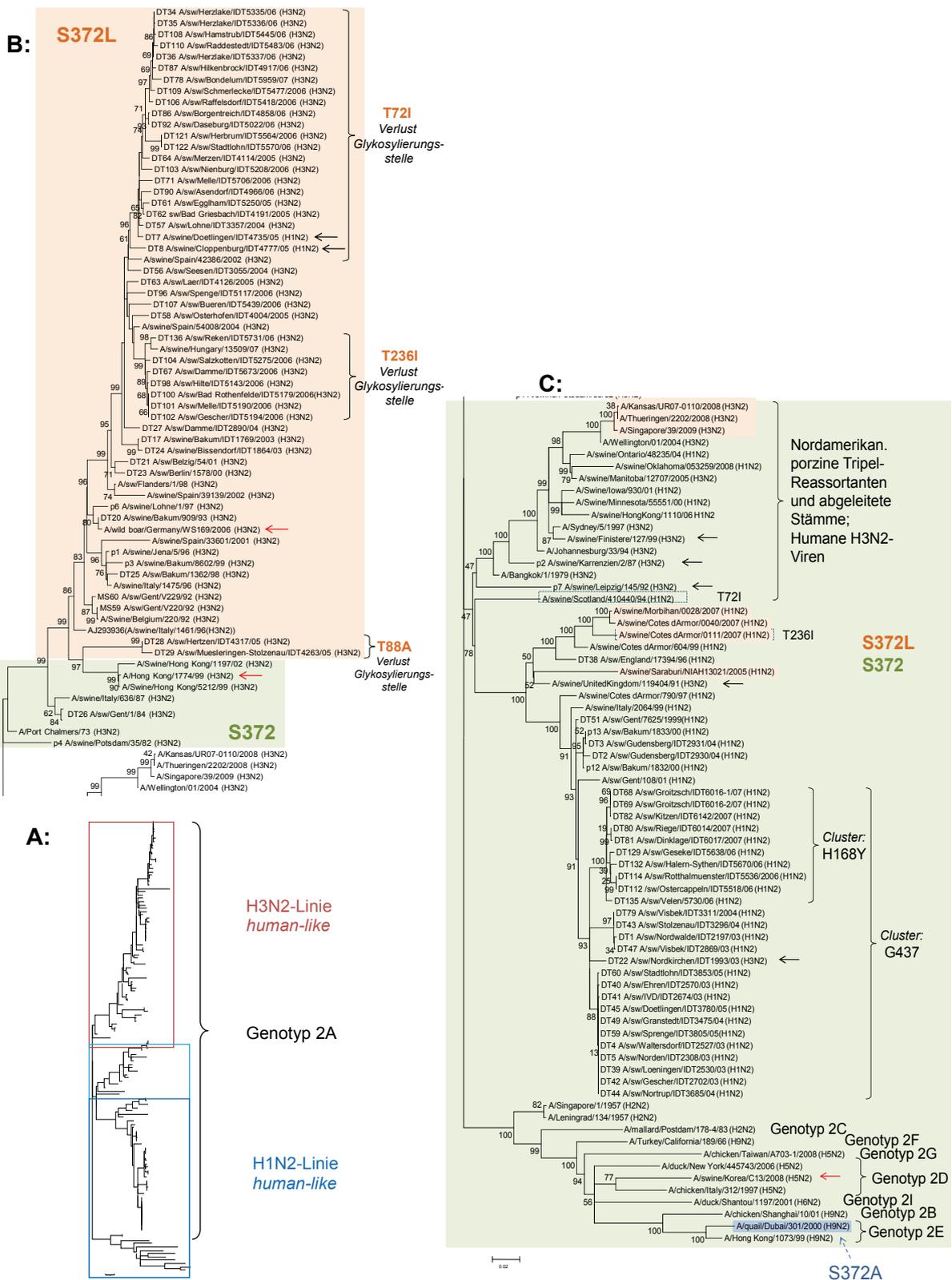


Abb. 27: Phylogenetische Analyse des Segmentes NAN2 (1410nt) von 136 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); A: Übersichtsbaum; B: H3N2-Linie des Genotyps 2A (human-like); C: H1N2-Linie (Genotyp 2A) einschließlich der nordamerikanischen porcinen Tripelreassortanten und abgeleitete Stämme plus humane H3N2-Viren und Referenzgenotypen; Farbkodierung: schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion

Innerhalb der eurasisch porzinen H3N2-Linie treten Mutationen auf, die zu Veränderungen im Glykosylierungsmuster führen. Betroffen sind die AS-Positionen 72, 88 und 236, an denen ein Threonin durch ein Isoleucin bzw. Alanin ersetzt wurde (Abb. 27B). Ein Zweig der H1N2-Linie grenzt sich durch ein Tyrosin anstelle eines Histidins an AS-Position 168 von allen hier untersuchten Viren ab (Abb. 27C). Die Aminosäure Glycin an Position 473 haben 26 H1N2-Viren einschließlich der H3N2-Reassortante A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 gemeinsam. Analog zum H3 clustert das N2 der H3N2-Viren A/sw/Karrenzien/2/96, A/sw/Potsdam/35/82 und A/sw/Leipzig/145/92 bei den humanen H3N2-Stämmen. Wie dem Stammbaum zu entnehmen ist, weist das N2 des Genotyps 2A verwandtschaftliche Beziehungen zu eurasisch aviären Viren auf.

Das aktive Zentrum sowie die angrenzenden Aminosäuren des NAN2 sind bis auf die Position 372 hochkonserviert (Tab. A10). Von den 136 Influenza-A-Viren tragen an dieser Position 69 ein Serin (grün hinterlegt), 66 ein Leucin (orange hinterlegt) und ein Stamm ein Alanin (blau hinterlegt). Bis auf sieben Isolate bilden die Serin- bzw. Leucin-tragenden Virusstämme je ein Cluster.

Glykosylierungssequenzen an den Positionen 61, 70, 86, 146, 200, 234 und 402 sind in 80 bis 100 % der 136 untersuchten NAN2-Sequenzen nachzuweisen (Tab. 23 und A11). Im Vergleich dazu konnten an den Positionen 32 (A/sw/Spain/39139/02 (H3N2); A/sw/Iowa/930/01 (H1N2)), 48 (A/sw/Cotes d'Armor/0111/07 (H1N2)), 309 (A/sw/Cotes d'Armor/790/97 (H1N2)), 313 (A/sw/Saraburi/NIAH13021/05 (H1N2)), A/sw/HongKong/1197/02 (H3N2)), 358 (A/sw/Hungary/13509/07 (H3N2)) und 414 (A/chicken/Taiwan/A703-1/08 (H5N2)) nur vereinzelt Glykosylierungssequenzen festgestellt werden.

Tab. 23: Verteilung ermittelter Glykosylierungsstellen von 136 NAN2-Sequenzen nach Genotypen aufgeschlüsselt

GT	AS-Position (Anzahl an positiven/negativen Isolaten)														
	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
2A	2/124	0/126	1/125	126/0	4/122	102/24	123/3	126/0	126/0	117/9	1/125	2/124	1/125	117/9	0/126
2B	0/1	1/0	0/1		1/0	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1
2C	0/1	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1
2D	0/3	0/3	0/3	3/0	3/0	2/1	2/1	3/0	3/0	3/0	0/3	0/3	0/3	3/0	0/3
2E	0/2	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	0/2	0/2	0/2	2/0	0/2
2F	0/1	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1
2G	0/1	0/1	0/1				1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	0/1	1/0	1/0
2I	0/1	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1

VII. Segment 7 – M

Für die phylogenetische Analyse des M-Segmentes wurden 189 (132 eigene sowie 57 GenBank-Sequenzen) Influenza-A-Viren herangezogen. Die eurasisch porzinen Viren sowie die eurasischen Vogelviren gehören dem Genotyp F an. Das M der pandemischen A/H1N1v-Viren wird ebenfalls diesem Genotyp zugeordnet. Einen gemeinsamen aviären Vorfahren weisen die eng miteinander verwandten Stämme der Genotypen A und B auf. Als Genotyp A werden die *classical swine*-Viren, die nordamerikanischen H3N2-Tripelreassortanten sowie die davon abgeleiteten H1N1- und H1N2-Viren klassifiziert (Abb. 28B). Genotyp B enthält humane H1N1-, H2N2- und H3N2-Stämme sowie ein Beispiel für eine wirtsübergreifende Infektion (A/sw/Czech Republic/1/75 (H3N2)).

Ein weiterer Hinweis auf Transspeziesinfektion liefert das Virusisolat A/turkey/Germany/3/91 – ein porzines *avian-like* H1N1-Virus, welches aus einem Truthahn isoliert wurde (Abb. 28D). Auf Reassortierungsereignisse lassen z.B. folgende Virusisolate schließen: A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2), A/sw/Melle/IDT5706/06 (H3N2) und A/sw/ Stadtlohn/IDT3853/05 (H1N2) (Abb. 28C und -D).

Die porzinen Viren des Genotyps F können anhand der AS31 des M2 genotypisch in amantadinsensitive (S31) und amantadinresistente (N31) Stämme eingeteilt werden (Abb. 28A). Über die AS 26 ist ebenfalls eine Zweiteilung der eurasisch porzinen Viren möglich. Der Übergang von Leucin zu Isoleucin ist in dieser Untersuchung erstmals 2003 nachzuweisen. Aminosäurepositionen, die zur Zweigbildung beitragen, sind sowohl im M1- als auch M2-Leserahmen zu finden. Nennenswert sind die Positionen 83 (A→S) und 96 (A→S) im M1 sowie 8 (Y), 11 (L→I) und 61 (R→G) im M2 (Abb. 28C und -D). Das Basentriplett 88-90 im ersten Leserahmen (M1) kodiert unter den 189 untersuchten M-Sequenzen für 4 verschiedene Aminosäuren (AS30). Die Virusisolate der Genotypen A, B, C, E und G sowie die aviären Viren des Genotyps F weisen Asparaginsäure an jener Position auf. Gleiches gilt für 36 eurasisch porzine Viren, welche sich alle in einem Cluster befinden (Abb. 28D). Die restlichen Virusisolate des Genotyps F mit Ausnahme der pandemischen A/H1N1v-Viren (S30) besitzen anstelle der Asparaginsäure ein Glycin. Die dem Genotyp D zugeordneten Viren fallen durch ein Asparagin an AS-Position 30 (M1) auf.

Tabelle 24 zeigt eine Zusammenfassung über die Verteilung wichtiger AS-Substitutionen im M2. Während die Positionen 30 und 34 hoch konserviert sind, fallen die Positionen 26 und 27 durch eine hohe Variabilität auf. Letztgenannte Position kodiert für insgesamt vier Aminosäuren. Isoleucin ist bei vier Genotyp-A-Stämmen (Abb. 28B) und dem deutschen H2N2-Vogelisolat A/mallard/Potsdam/178-4/83 (Genotyp F; Abb. 28B) nachzuweisen. Für Threonin kodieren vier europäische Schweineviren, von denen drei ein Cluster innerhalb der I26-Linie bilden (Abb. 28C), sowie das humane H1N1-Isolat A/Beijing/262/97

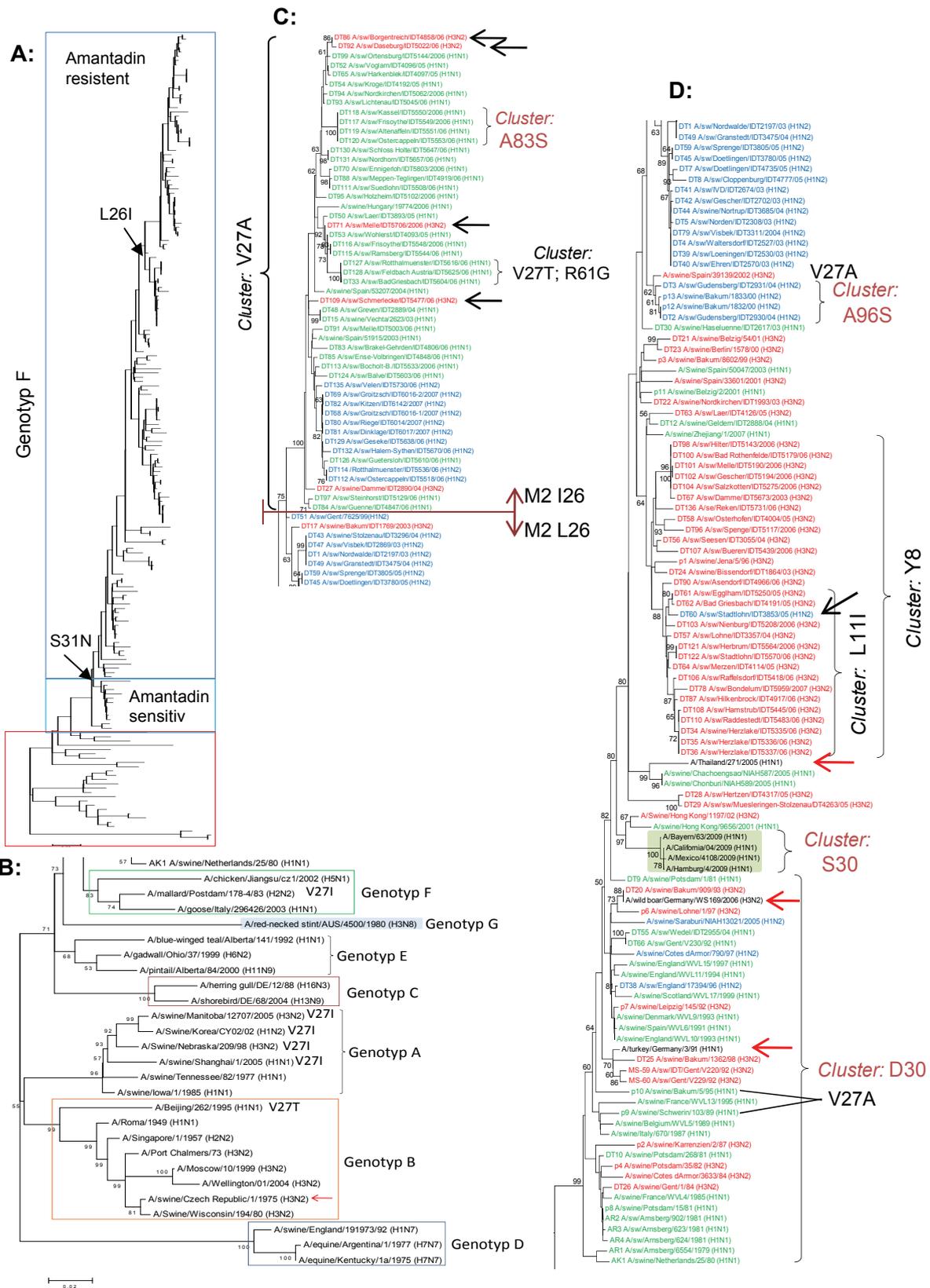


Abb. 28: Phylogenetische Analyse des Segmentes M (982 nt) von 189 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsstammbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen A-G; **C** und **D:** Ausschnitte des Genotypen F (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: avian-like H1N1-Linie; blau: human-like H1N2-Linie; rot: human-like H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; braun: M1-Leserahmen; schwarz: M2-Leserahmen

(Genotyp B; Abb. 28B). 50 Schweineviren aus Europa verfügen über ein Adenin an Position 27, 43 davon kodieren für I26 und liegen somit innerhalb derselben Linie. Ausnahmen bilden die Isolate A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1), A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) und A/sw/Spain/39139/02 (H3N2). Die restlichen M-Sequenzen verfügen über V27. Die Positionen 31 und 77 sind, bis auf zwei Genotyp C- (A/shorebird/DE/68/04 (H13N9), A/herring gull/DE/12/88 (H16N3) - S31/Q77) und zwei Genotyp B- (A/Moscow/10/99 (H3N2), A/Beijing/262/95 (H1N1) - N31/R77) Viren, in folgenden Kombinationen vorzufinden: S31/R77 sowie N31/Q77 (Tab. A12).

Tab. 24: Zusammenfassung und Vergleich wichtiger Aminosäurepositionen im M2

	I26	L26	F26	V27	A27	T27	I27	A30	S31	N31	G34	R77	Q77
Eigene Sequenzen (Σ 132)	48	84	0	82	46	4	0	132	11	121	132	11	121
GenBank-Sequenzen (Σ 57)	3	53	1	47	4	1	5	57	26	31	57	26	31

Rot: Amantadinresistenz vermittelnde Aminosäuren

VIII. Segment 8 – NS

Der Übersichtsstammbaum des 8. Segmentes umfasst 208 NS-Sequenzen von (134 eigene und 74 GenBank-Sequenzen) Influenza-A-Viren unterschiedlicher Sub- und Genotypen. Die engen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den eurasisch aviären und den eurasisch porzinen Viren drückt sich im gemeinsamen Genotyp 1E aus. Dem Genotyp 1A werden die humanen Viren der Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2 zugeordnet. Das NS der nordamerikanischen Tripelreassortanten und die davon abgeleiteten porzinen H1N1- und H1N2-Viren sowie die pandemischen A/H1N1v-Virusisolate entstammen der *classical swine*-Linie, welche ebenfalls dem Genotyp 1A zugehörig ist (Abb. 29B). Die Isolate A/Thailand/271/05 (H1N1) und A/sw/Saraburi/NIAH13021/05 (H3N2) fallen durch ihre Gruppierung mit den *classical swine*-Viren auf (Abb. 29B). Gleiches konnte für das HA gezeigt werden, jedoch nicht für die übrigen 6 Segmente, welche innerhalb der eurasisch porzinen Viren clustern. Eine große genetische Distanz zu den Viren des Genotyp 1 weisen die aviären Virusisolate der Genotypen 2A, 2B und 2D auf (Abb. 29B). Der Genotyp 2C wurde bisher noch nicht eingeführt (Stand: März 2011; www.fluggenome.org). Folgende zwei Virusisolate sind in der FluGenome-Datenbank als Genotyp E klassifiziert: A/northern shoveler/California/27820/07 (H7N3) und A/swine/Thailand/CU-SA412/10 (H1N1) (Abb. 29B). Da letztgenanntes Isolat innerhalb der Typ-1A-Viren clustert, ist dessen Genotypisierung fraglich.

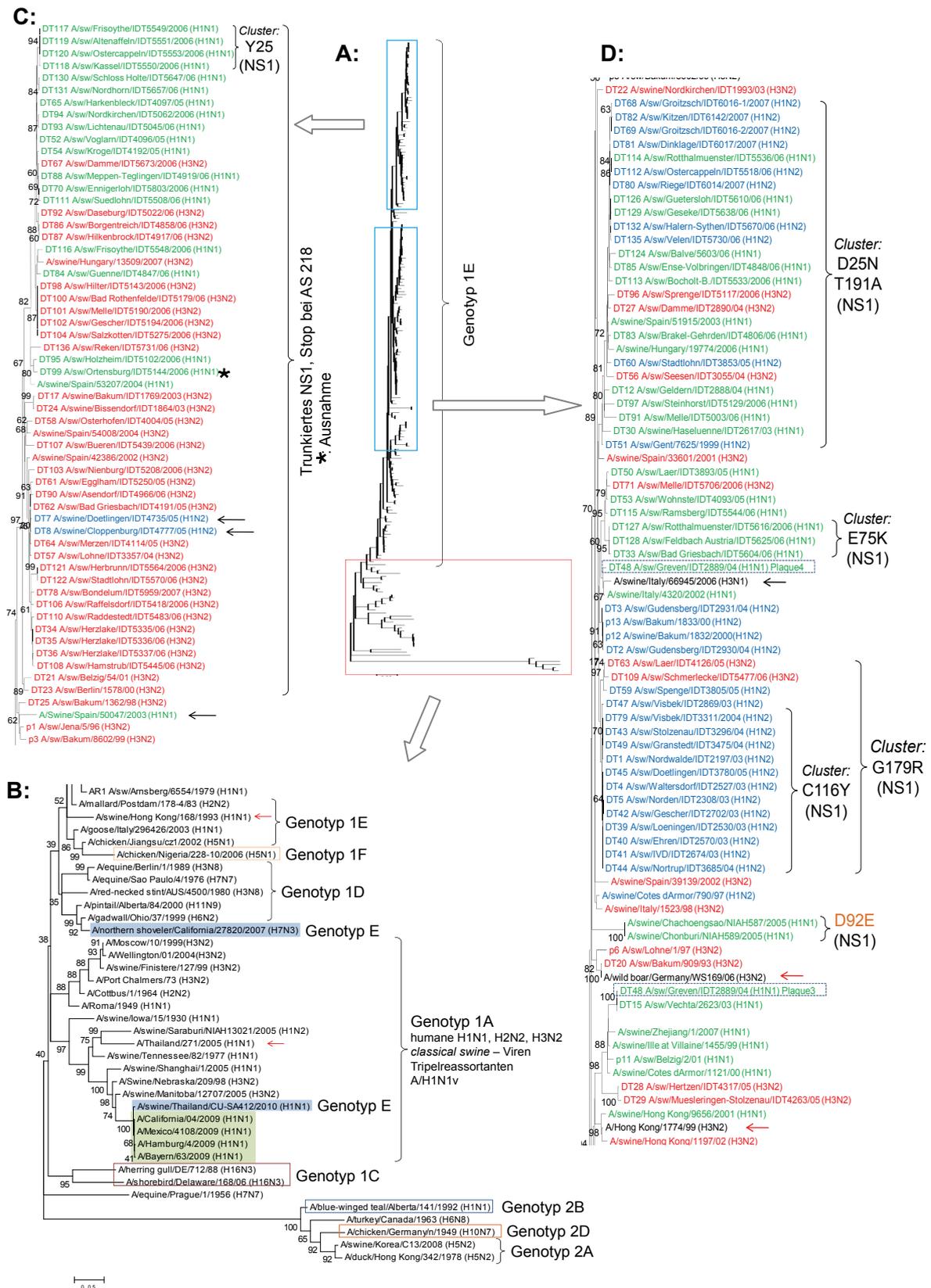


Abb. 29: Phylogenetische Analyse des Segmentes NS (835 nt) von 209 Influenza-A-Viren (Berechnung: ML, 500 bs, GTR+G+I, NNI); **A:** Übersichtsstammbaum; **B:** Darstellung der Referenzgenotypen; **C** und **D:** Ausschnitte des Genotypen 1E (eurasisch porcine Viren); Farbkodierung: grün: avian-like H1N1-Linie; blau: human-like H1N2-Linie; rot: human-like H3N2-Linie; schwarze Pfeile: Reassortierung; rote Pfeile: Transspeziesinfektion; orange: Virulenzmarker

Innerhalb des Genotyps 1E lassen sich analog zu den anderen Genomsegmenten Hinweise auf Reassortierungen (A/sw/Spain/50047/03 (H1N1), A/sw/Doetlingen/IDT4735/05 (H1N2), A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2)) und Transspeziesinfektionen (A/HongKong/1774/99 (H3N2), A/Thailand/217/05 (H1N1)) finden (Abb. 29B, -C und D).

Mutationen des NS1-Leserahmens, die zur Zweigbildung innerhalb der eurasisch porzinen Viren beitragen, sind den Abbildungen 29C und -D zu entnehmen.

Die Sequenzierung des NS-Segmentes von A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) wies auf das Vorhandensein einer Mischsequenz hin. Mittels Plaquereinigung konnten verschiedene Varianten identifiziert werden. Beispielfhaft wurden die NS-Sequenzen der Plaques 3 und 4 in die Analyse integriert. Die genetischen Unterschiede werden dadurch sichtbar, dass beide Plaques in verschiedenen Gruppen clustern (Abb. 29D).

Der Großteil der hier untersuchten Viren verfügt über ein 230 AS langes NS1 (Tab. 25; Tab. A13). Die Sequenzen eines Clusters mit 19 H1N1-, 2 H1N2- sowie 34 H3N2-Viren vom Genotyp 1E weisen ein um 13 Aminosäuren trunkiertes Protein auf (Ausnahme: A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1)).

Die AS-Substitution D92E führt eventuell zu einer Zytokinresistenz (Seo et al., 2004) und wurde in den H1N1-Isolaten A/sw/Chachoengsao/NIAH587/2005 und A/sw/Chonburi/NIAH589/2005 detektiert (Abb. 29D). C-terminale Deletionen im NS1, welche eine schlechtere Virusvermehrung sowie ein Erhöhung der Interferon-Antwort (Garcia-Sastre et al., 1998; Kochs et al., 2007) zur Folge haben, treten innerhalb der Studie nicht auf. Die sich auf die Polymerase-Aktivität negativ auswirkenden AS-Substitutionen E67S, E74S und E75S (Akarsu et al., 2011) konnten ebenfalls nicht ermittelt werden.

Tab. 25: Verteilung der Influenza-A-Viren und Genotypen bezüglich der Trunkierungen des NS1

Länge [AS] NS1	217	219	230	237
Eigene Sequenzen (Σ 134)	50	0	84	0
GenBank-Sequenzen (Σ 74)	4	11	54	5
Genotyp	1E	1A, E	1A, 1C-1E, 2A, 2B, 2D, E	1A, 1E, 1F

4.3. Reverse Genetik-Studien bei porzinen Influenza-A-Viren

4.3.1. Herstellung und Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter Schweine-Influenzaviren

Um die Kombinationsmöglichkeiten zwischen humanen und porzinen Genomsegmenten sowie die Auswirkungen von Basensubstitutionen im M-Segment untersuchen zu können, wurde ein Plasmid-gestütztes System nach Hoffmann et al. (2000) generiert.

Im ersten Schritt erfolgte die Klonierung der acht vRNA-Segmente der porzinen H1N1-Virusisolate A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in Form kompletter cDNA-Kopien in den pHW2000-Vektor. Dieser ist so konstruiert, dass das Insert sowohl von einem humanen RNA-Polymerase I-Promotor (plh) und einem murinen Pol I-Terminator (tl) als auch von einem RNA-Polymerase II-Promotor (pCMV) und einem Polyadenylierungssignal (bovines Wachstumshormon - aBGH) flankiert ist (Abb. 11). Durch diese Anordnung wird gewährleistet, dass die cDNA - nach der Transfektion der acht Plasmide in humane Zellen (HEK-293) - *erstens* in negativ polarisierte virale vRNA und *zweitens* in positivsträngige mRNA transkribiert wird (Abb. 10). Die von den viralen mRNAs translatierten Proteine assemblieren mit den vRNPs und neue rekombinante Viren werden freigesetzt.

Die Klonierung der Inserts in den pHW2000 erfolgte über die *BsmBI*-Schnittstellen der *multiple cloning site* des Vektors. Hierfür wurde der mit *KpnI* linearisierte Vektor mit *BsmBI* verdaut und anschließend über das Enzym Shrimps Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Nach Ligation (16 ° C über Nacht) und Transformation in *Escherichia coli* erfolgte das Screening der Klone über Kolonie-PCR und Plasmidverdau. Potenziell richtige Klone wurden mittels der *cycle-sequencing*-Methode (CEQ8000) auf ihre Richtigkeit überprüft. In den folgenden Abschnitten sind die für die Plasmidkonstruktion angewandten Strategien näher erläutert.

L Segment 1 – PB2

In Abbildung 30 ist die Klonierungsstrategie für das erste Genomsegment der Viren A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) schematisch dargestellt. Das PB2 des aus dem Jahre 1981 stammenden Virus wurde aufgrund zweier interner *BsmBI*-Schnittstellen über einen Zwischenvektor in den pHW2000 eingebracht. Im ersten Schritt erfolgte mittels PCR die Amplifikation zweier sich überlappender Fragmente (A und B). Durch die speziell dafür designten Primer besaßen die Fragmente am 5'-Ende eine *KpnI*- und am 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle. Zusätzlich wurden mittels der Oligonukleotide 08-PB2-Kpn-A bzw. -B je eine *BsmBI*-Erkennungssequenz eingefügt (Abb. 30). Die Amplifikate konnten nach dem Verdau mit *KpnI* und *XbaI* gelaufgereinigt und in einem mit *KpnI*- und *XbaI*-linearisierten pUC19-Vektor kloniert werden. Bevor die Fragmente anhand

der gemeinsamen *NsiI*-Schnittstelle zu einem Segment ligiert und in den pHW2000 übertragen werden konnten, erfolgte die Entfernung der internen *BsmBI*-Schnittstellen mittels gezielter Mutagenese. Anschließend wurden die Plasmide pUC19-[mutA] und pUC19-[mutB] einem Doppelverdau mit *KpnI* und *NsiI* unterzogen. Mittels Ligation der dabei entstandenen Fragmente *a* (1322 bp; pUC19-[mutA]) und *b* (3709 bp; pUC19-[mutB]) konnte das komplette Segment wieder zusammengesetzt werden. Über einen Verdau mit *DraI* und *BsmBI* wurde die PB2-Sequenz aus dem pUC19-Vektor herausgeschnitten und in den linearisierten pHW2000 ligiert. Die anschließende Sequenzierung der nach der Transformation entstandenen Klone ergab eine Deletion in der 3'-NTR des PB2-Segmentes. Die Reparatur erfolgte über die Amplifikation eines Fragmentes, dessen 5'- bzw. 3'-Ende über eine *MscI*- bzw. eine *ApaI*-Schnittstelle verfügte. Nachdem sowohl das Amplifikat als auch das Plasmid pHW2000-[PB2-p8- Δ 3'NTR] mit den Enzymen *MscI* und *ApaI* behandelt wurden, konnte das fehlerhafte Fragment ausgetauscht werden (Abb. 30).

Das Einbringen des PB2-Segmentes von A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in den pHW2000-Vektor erfolgte nicht anhand klassischer Klonierungstechniken, sondern über eine sogenannte *target-primed plasmid amplification* (Stech et al., 2008). Diese Methode basiert auf der QuickChange-Reaktion von Geiser et al. (2001) und kann unabhängig von Restriktionsenzymen durchgeführt werden. Für die Amplifikation des Genomsegmentes wurden zunächst spezielle Oligonukleotide synthetisiert. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer waren so konzipiert, dass sie sowohl Vektor- (5'-Ende) als auch Insertsequenzen (3'-Ende) enthielten. Das resultierende PCR-Produkt konnte anschließend als Megaprimer für die Insert-Plasmid-PCR eingesetzt werden (Abb. 30). Nach der Denaturierungsphase binden die Vektorsequenzen der Megaprimer an die komplementäre Sequenz des linearisierten pHW2000-Vektors. Die Elongation findet jeweils entlang der Vektorsequenz statt, die Insertsequenz bleibt einzelsträngig. Die beiden neusynthetisierten Stränge hybridisieren schließlich zu zirkulären Molekülen. Durch Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen werden die Amplifikate zu Plasmidringen geschlossen und vermehrt. Die Sequenzierung des Inserts ergab eine Deletion an Position 2195 sowie vier Basensubstitutionen (nt 914, nt 1298, nt 1502, nt 1786), welche über gezielte Mutagenesen korrigiert wurden. Desweiteren erfolgte die Reparatur der 3'-NTR-Sequenz des PB2-Segmentes. Dafür wurden die Plasmide pHW2000-[PB2-p8-Rep3'NTR] und pHW2000-[PB2-p11- Δ 3'NTR] mit den Enzymen *MscI* und *SaII* geschnitten und das PB2 von A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in den pHW2000 mit vollständiger 3'NTR von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) ligiert und transformiert (Abb. 30).

SEGMENT PB2

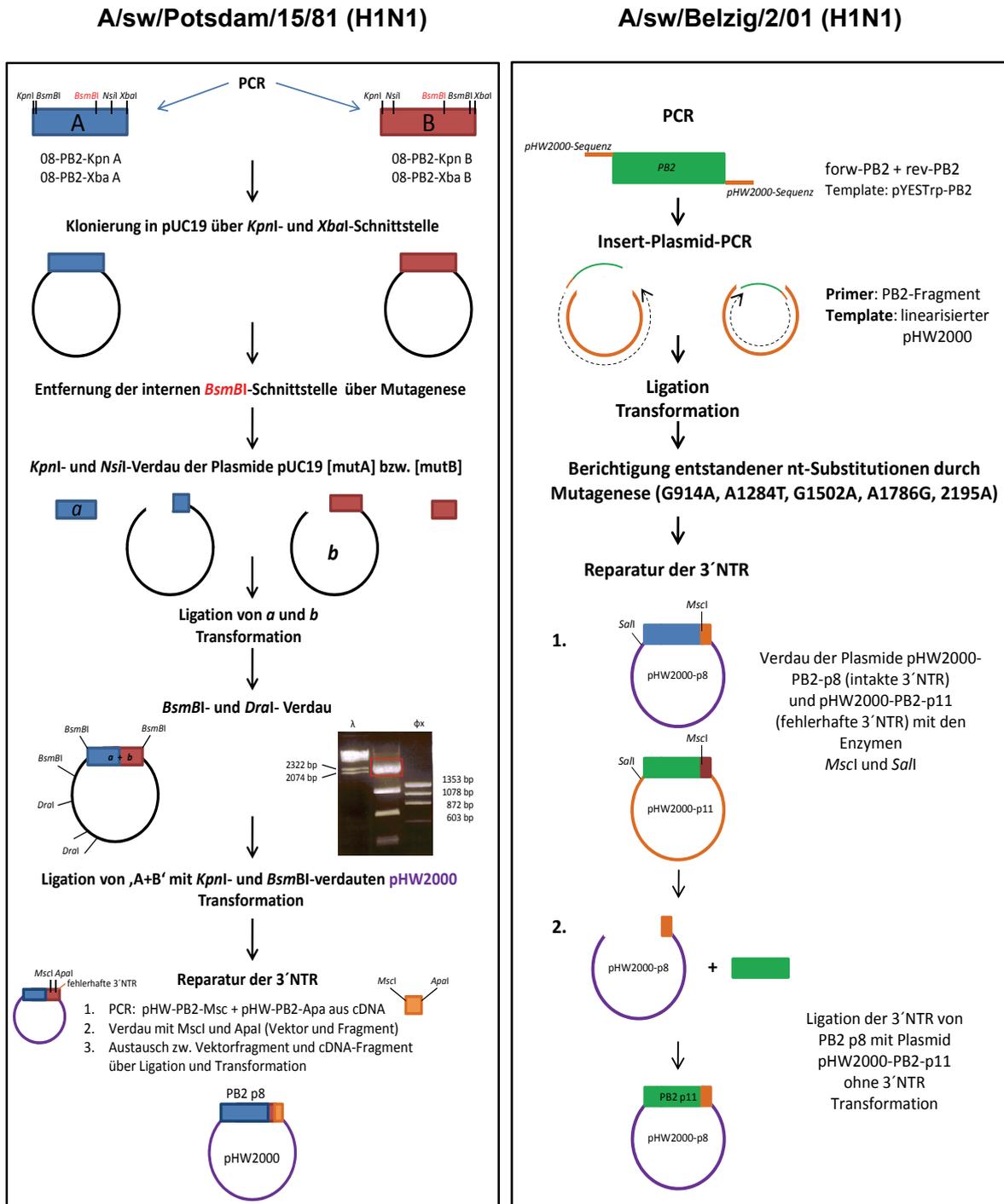


Abb. 30: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des 1. Segmentes (PB2) der Virusisolate A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in den pHW2000-Vektor (keine maßstabsgetreue Abbildung der Plasmide und Fragmente sowie der eingezeichneten Enzymschnittstellen)

II. Segment 2 – PB1

Die Herstellung der PB1-Plasmide beider porziner H1N1-Viren erfolgte nach dem in Abbildung 31 dargestellten Schema. Analog zum PB2 des Potsdam-Virus wurden zwei sich überlappende Fragmente (A und B) mit integrierten *KpnI*, *XbaI* und *BsmBI*-Schnittstellen amplifiziert. Nach der Klonierung in den pUC19-Vektor konnte die interne *BsmBI*-Erkennungssequenz in den A-Fragmenten über Mutagenese geändert werden. Das Zusammenfügen der PB1-Fragmente erfolgte durch einen Doppelverdau der Plasmide pUC19-[mutA] und pUC19-[B] mit den Enzymen *KpnI* und *AvrII* sowie anschließender Ligation der dabei entstandenen Fragmente *a* (1255 bp) und *b* (3776 bp). Nach der Transformation in DH5 α wurden die Klone mittels Kolonie-PCR auf das richtige Insert überprüft. Im letzten Schritt konnte die PB1-Sequenz aufgrund der durch die PCR integrierten terminalen *BsmBI*-Schnittstellen aus den pUC19 geschnitten und in den pHW2000 ligiert werden.

III. Segment 3 – PA

Die Klonierungsstrategie des PA-Segmentes von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) ist im linken Teil der Abbildung 32 zusammengefasst. Zunächst wurden zwei Fragmente mit zusätzlichen *BsmBI*-Schnittstellen, welche sich am 5'-Ende von Fragment A sowie am 3'-Ende von Fragment B befanden, hergestellt. Über die Sequenz des Primers 08-PA-Psp2 konnte gleichzeitig die interne *BsmBI*-Erkennungssequenz mutiert werden. Anschließend wurden die Amplifikate in den Zwischenvektor pJET1.2 kloniert. Nach dem Verdau der Plasmide mit den Enzymen *XhoI*(A) bzw. *NotI*(B) sowie *XbaI*, *BsmBI* und *Psp1406I* konnten die Fragmente *a* und *b* in den linearisierten pHW2000 ligiert werden. Die Sequenzierung der entstandenen Plasmide ergab eine 39 nt große Insertion im PA-Segment. Diese konnte mittels der Enzyme *XbaI* und *HindIII* herausgeschnitten werden. Nach Ligation der ca. 1000 und 4000 bp großen Fragmente sowie anschließender Transformation wurden die Klone nochmals mittels Sequenzierung überprüft (Abb. 32). Das PA des aus dem Jahre 2001 stammenden H1N1-Virus wurde analog dem PB2-Segment mittels spezifischer PCR (*target-primed plasmid amplification*) in den pHW2000-Vektor eingefügt. Auch hier ergab die Sequenzierung Basensubstitutionen, welche zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führten. Um den ursprünglichen Zustand wiederherzustellen, wurden zwei Bereiche durch Zwischenklonierung von cDNA-generierten Fragmenten sowie anschließenden Enzymverdauen ausgetauscht (Abb. 32). Die zwischen der *BamHI*- und *BglII*-Schnittstelle liegende PA-Sequenz (646 nt) entspricht der des pHW2000-[PA p8]-Plasmides (Abb. 32).

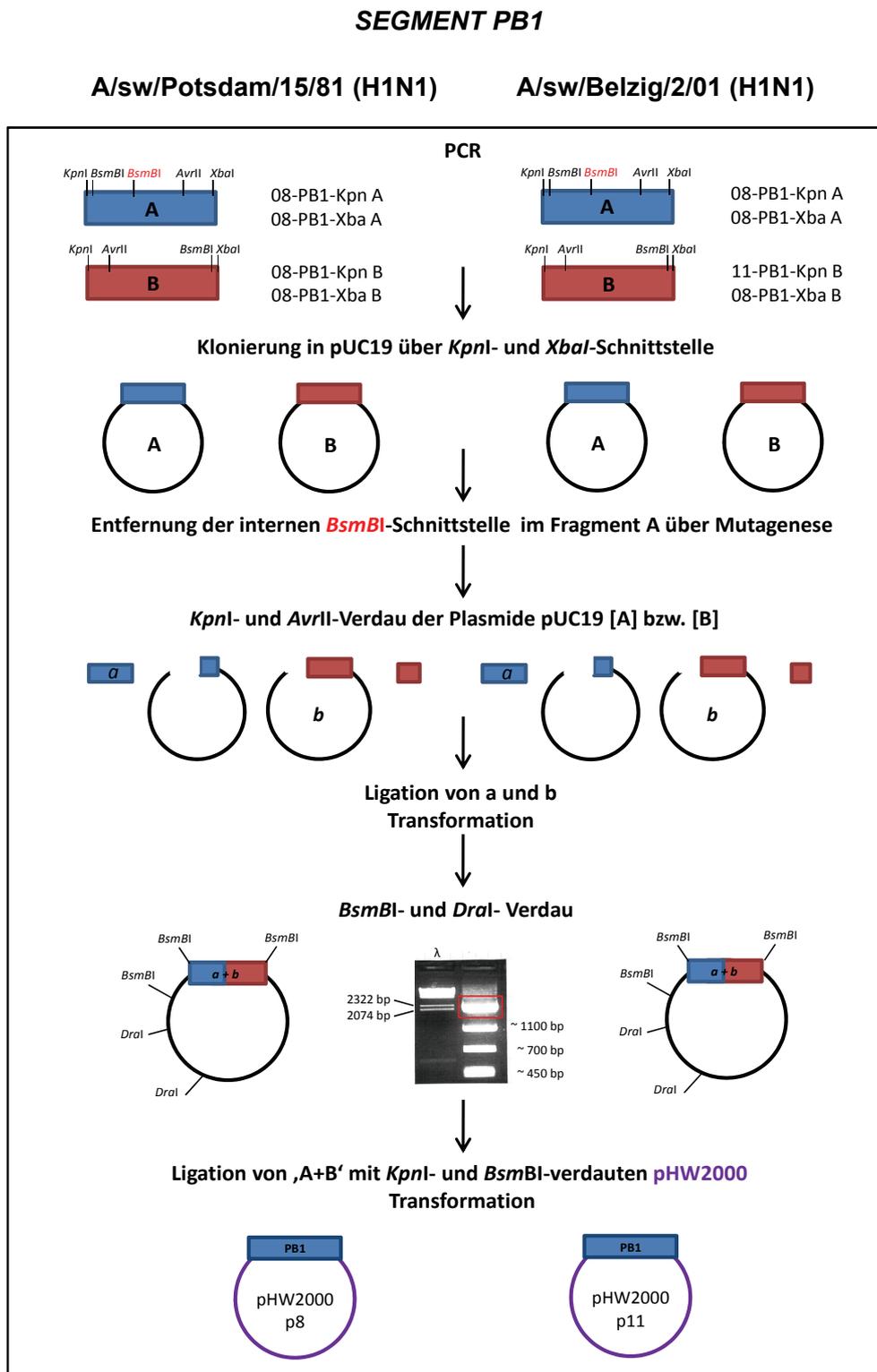


Abb. 31: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des 2. Segmentes (PB1) der Virusisolate *A/sw/Potsdam/15/81* (H1N1) und *A/sw/Belzig/2/01* (H1N1) in den pHW2000-Vektor (keine maßstabsgetreue Abbildung der Plasmide und Fragmente sowie der eingezeichneten Enzymschnittstellen)

SEGMENT PA

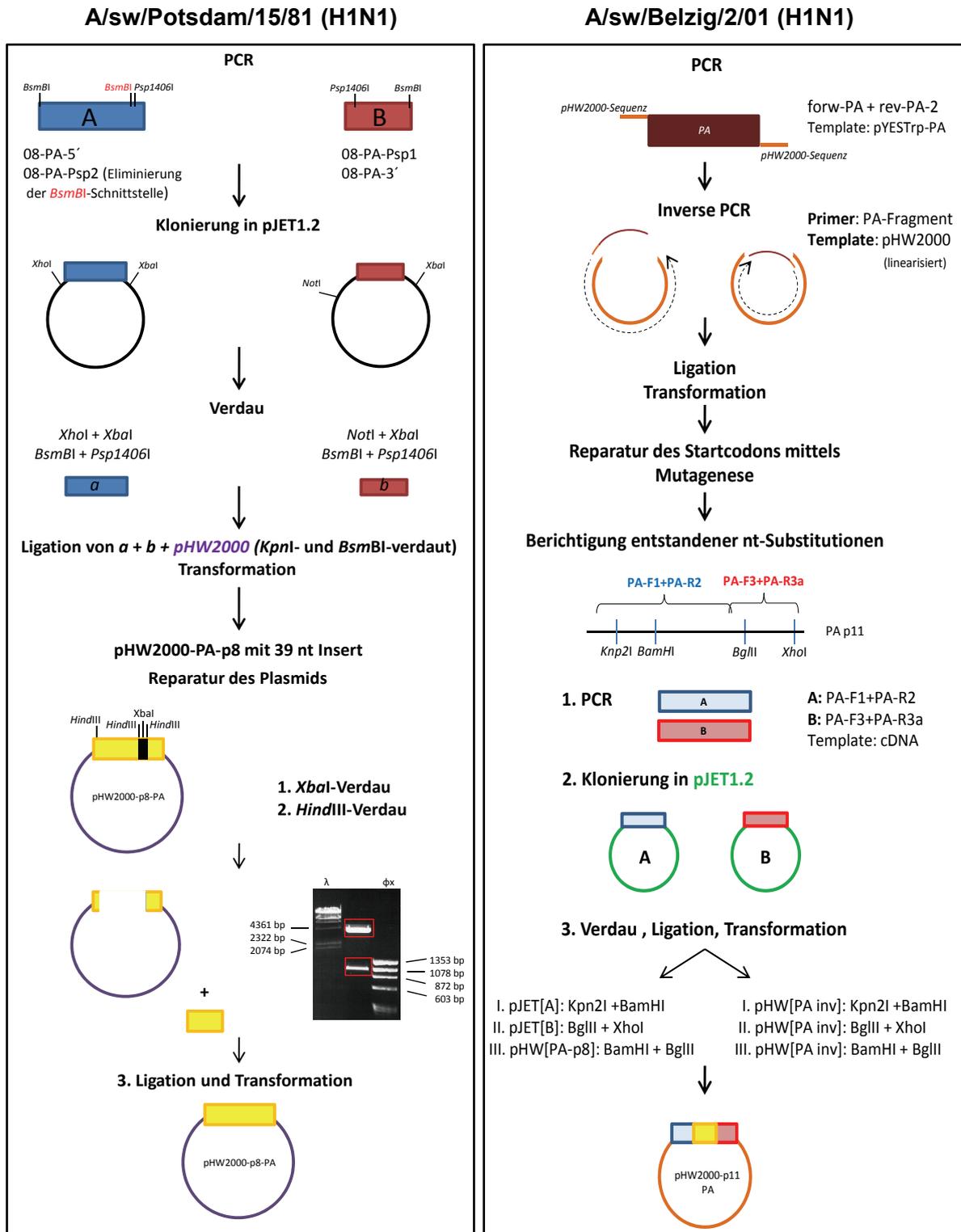


Abb. 32: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des 3. Segmentes (PA) der H1N1-Virusisolate A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01 in den pHW2000-Vektor (keine maßstabgetreue Abbildung der Plasmide und Fragmente sowie der eingezeichneten Enzymschnittstellen)

IV. Segmente 4, 6, 7 und 8 – HA, NA, M und NS

Die Generierung der pHW2000-[HA]-, -[NA]-, -[M]- und -[NS]-Plasmide konnte aufgrund fehlender interner *BsmBI*-Schnittstellen in einem Klonierungsschritt durchgeführt werden. Der in Abbildung 33 zusammengefasste Strategieverlauf zeigt zunächst die Amplifikation der Segmente HA, NA, M und NS mit den Primer-vermittelten *BsmBI*-Schnittstellen an den 5'- und 3'-Enden. Die zu diesem Zeitpunkt unbekanntenden Enden des viralen Genoms wurden durch A/WSN/33-Sequenzen ersetzt. Nach Aufreinigung der Amplifikate und dem anschließenden *BsmBI*-Verdau über Nacht erfolgte die Ligation der Fragmente in den pHW2000-Vektor. Mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung wurden die nach der Transformation entstandenen Klone auf das richtige Insert überprüft.

V. Segment 5 – NP

Die Nukleoprotein kodierenden Segmente der H1N1-Viren A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01 wurden unter Verwendung eines Zwischenvektors in den pHW2000 kloniert (Abb. 34). Zunächst erfolgte die Amplifikation zweier sich überlappender Fragmente. Die für die Klonierung in den Zielvektor benötigten *BsmBI*-Schnittstellen wurden durch die Primer 08/11-NP-5' bzw. 08/11-NP-3' an das 5'- (Fragment A) bzw 3'-Ende (Fragment B) eingefügt. Zusätzlich konnte mittels der Oligonukleotide 08/11-NP-1 eine *MunI*-Erkennungssequenz an das 5'-Ende der B-Fragmente integriert werden. Die interne *BsmBI*-Schnittstelle in den A-Fragmenten wurde über die Primer 08/11-NP-2 mutiert, welche gleichzeitig für eine *EcoRI*-Sequenz am 3'-Ende kodierten. Nach der Klonierung in den pJET1.2 konnten die Plasmide mit *BsmBI* und *EcoRI* (A) bzw. *MunI* (B) verdaut werden. Anschließend erfolgte die Ligation der zwei Fragmente *a* (375 bp) und *b* (1231 bp) in den linearisierten pHW2000. Während bei A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) Klone mit integrierten NP-Segment über Kolonie-PCR ermittelt werden konnten, blieb die Transformation des Ligationsansatzes pHW2000-[NP-p11] ohne Ergebnis. Daraufhin wurden die Plasmide pJET1.2-[A-p11] und pJET1.2-[B-p11] zusätzlich zu den oben genannten Enzymen mit *XhoI* und *XbaI*, welche in der *multiple cloning site* des pJET1.2 schneiden, verdaut. Nach erneuter Ligation und Transformation war der Nachweis von NP-tragenden Klonen erfolgreich.

SEGMENTE HA, NA, M und NS

A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)

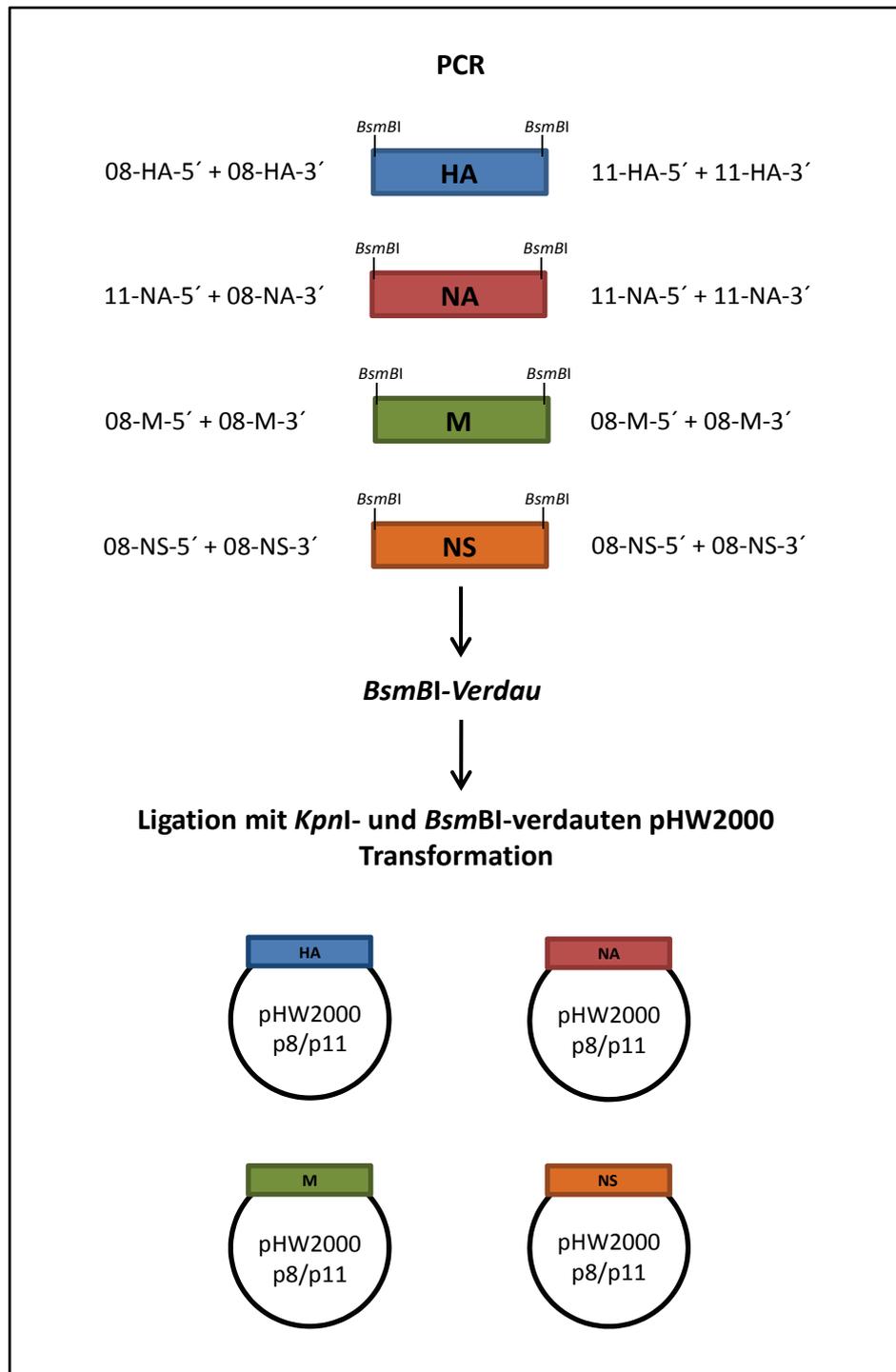


Abb. 33: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Segmente 4, 6, 7 und 8 der Virusisolate A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in den pHW2000-Vektor (keine maßstabsgetreue Abbildung der Plasmide und Fragmente sowie der eingezeichneten Enzymschnittstellen)

SEGMENT NP

A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)

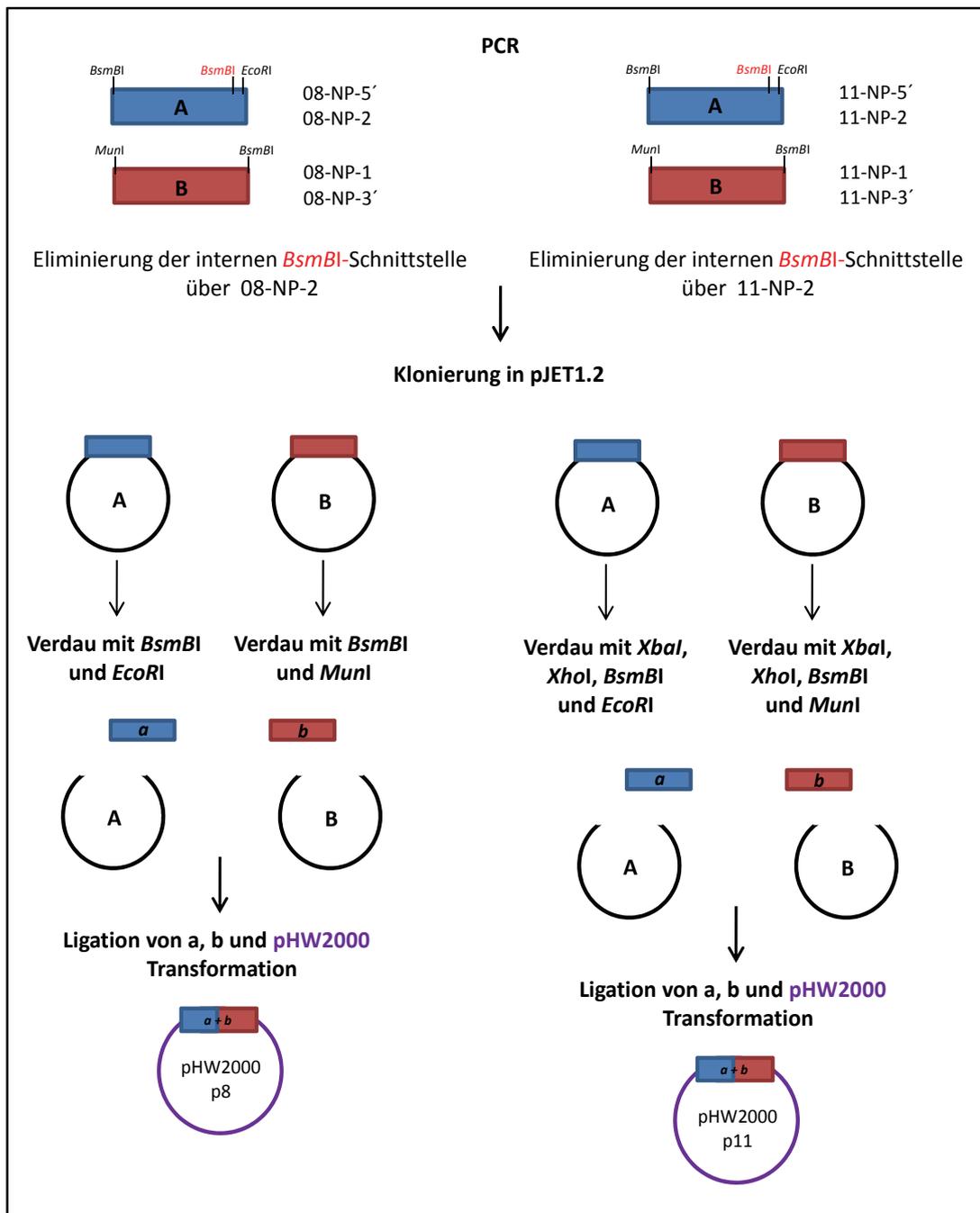


Abb. 34: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des 5. Segmentes (NP) der H1N1-Virusisolate A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01 in den pHW2000-Vektor (keine maßstabsgetreue Abbildung der Plasmide und Fragmente sowie der eingezeichneten Enzymschnittstellen)

VI. Polymeraseaktivitätstest

Die für die Polymeraseuntereinheiten kodierenden Plasmide wurden unter Verwendung eines GFP-Reportergens auf ihre Funktionalität getestet. Die genetische Information des aus der *Aequorea victoria*-Qualle stammenden grün fluoreszierenden Proteins wurde in einem pHW2000-Vektor mit fehlendem Polymerase II-Promotor (pCMV) kloniert. In Abbildung 35 ist der Aufbau des Plasmides sowie dessen Funktionsweise im Zusammenhang mit der viralen Polymerase dargestellt. Über die RNA-Polymerase I erfolgt zunächst die Transkription des GFP-Genes. Die dabei entstandene negativ orientierte RNA wird durch die virale Polymerase zu positiv-strängiger mRNA transkribiert. Die anschließende Translation bewirkt die Synthese des GFPs, welches unter Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht durch seine grüne Fluoreszenz detektiert werden kann. Als Negativkontrolle wurden die GMK-Zellen ausschließlich mit dem GFP-Plasmid transfiziert (Abb. 36A). Die Positivkontrolle bestand zusätzlich zu dem Reportergenplasmid aus den in den pHW2000 klonierten Polymeraseuntereinheiten (PB2, PB1, PA und NP) des Virusisolates A/WSN/33 (H1N1) (Abb. 36B). Die porzinen Polymerasebestandteile von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) wurden zunächst einzeln im Kontext mit dem humanen Virusstamm und anschließend als „reine porzine“ Polymerase getestet (Abb. 36C und -D).

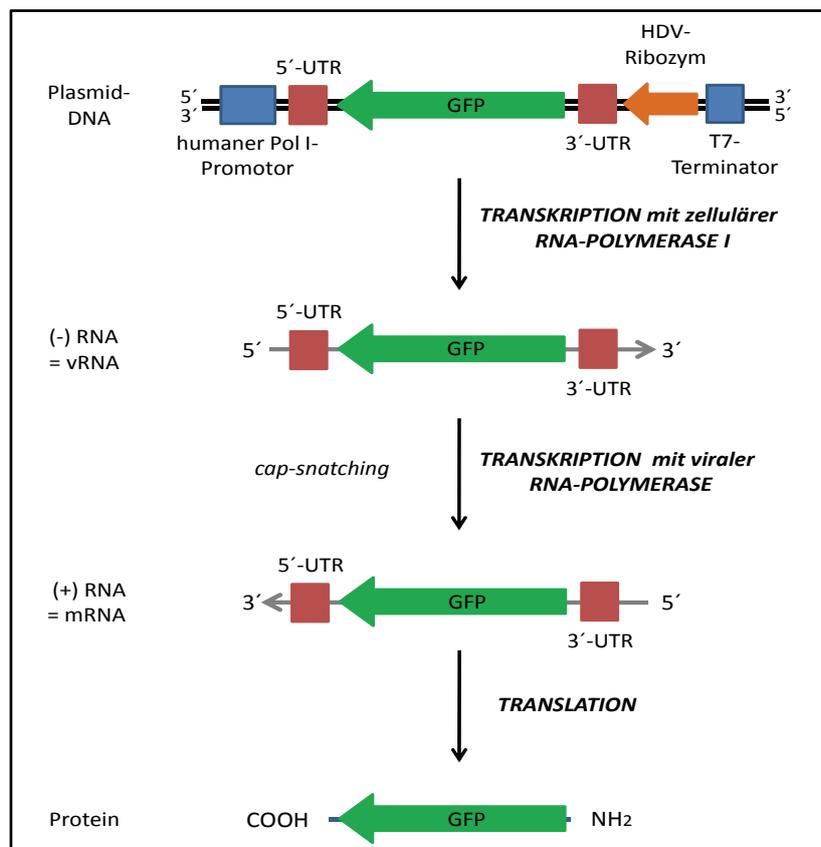


Abb. 35: Aufbau des GFP-Plasmides und dessen Wirkungsweise im Zusammenhang mit der viralen Polymerase (UTR: untranslatierte Region des Influenza-A-Virus, HDV: Hepatitis Delta-Virus)

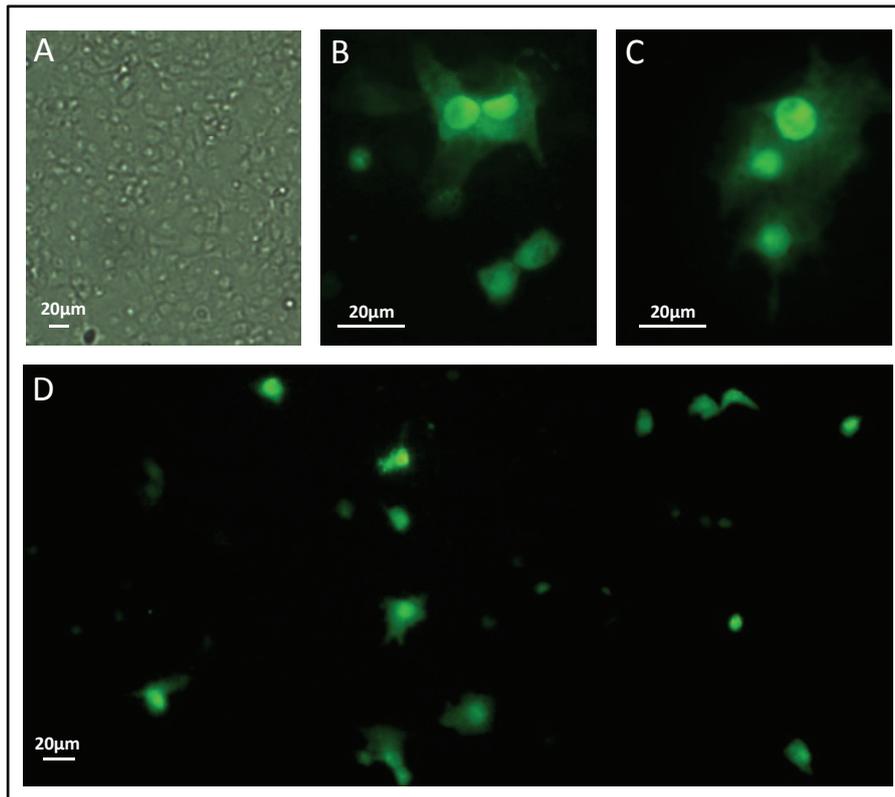


Abb. 36: Nachweis der aktiven viralen Polymerase (PB2, PB1, PA und NP) im Zellkern transfizierter GMK-Zellen mittels des grün fluoreszierenden Proteins unter Anregung mit blauem Licht; **A:** Negativ-Kontrolle (Weißlicht); **B:** virale Polymerasen von A/WSN/33 (H1N1) (Positiv-Kontrolle), **C:** virale Polymerasen von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und **D:** von A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)

4.3.2. Synthese rekombinanter Viren bestehend aus dem genetischen Material von A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) und A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

Nachdem die Plasmide hergestellt und mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft worden waren, konnte deren Funktionsfähigkeit durch Transfektion getestet werden. Der für diese Transfektion hergestellte Ansatz enthielt die zu testenden Plasmide der H1N1-Viren A/sw/Belzig/2/01 bzw. A/sw/Potsdam/15/81. Nach Zugabe des DNA-Lipofectamine-Gemisches zu den HEK-293/MDCK-Zellen erfolgte eine 18-stündige Inkubation mit anschließendem Mediumwechsel (EMEM+Trypsin+Na-Bikarbonat). Nach drei weiteren Tagen im Brutschrank wurden die Zellen gesplittet und nach 20-stündiger Inkubation mit trypsinhaltigem Medium versehen. Konnte nach vier Tagen noch kein zpE festgestellt werden, erfolgte das Splitten der Zellen ein weiteres Mal. Mit Erreichen des Lysestadiums wurde die RNA zur Bestätigung des Genotypes präpariert und sequenziert. Weitere Untersuchungen bezüglich Pathogenität und Wachstumsverhalten wurden nicht durchgeführt.

4.3.3. Analyse ausgewählter Basensubstitutionen im M-Segment der H1N1-Viren A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01

L Generierung und Analyse der AS31-Serin-Mutanten

Die Aminosäure 31 spielt eine zentrale Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber dem M2-Ionenkanalblocker Amantadin. Influenzaviren mit einem Serin an dieser Position sind genotypisch amantadinsensitiv. Interessanterweise wurden bei den in dieser Studie analysierten Influenzaviren nur zwei (AGT und AGC) der sechs möglichen Serin-Codons beobachtet. Der Austausch von Guanin zu Adenin an der zweiten Position des für das Serin kodierenden Codons bewirkt eine Substitution von Serin zu Asparagin. Mittels der reversen Genetik konnte diese Mutation als Ursache für die Resistenzentwicklung gegenüber Amantadin ermittelt werden (Abed et al., 2005). Innerhalb der Genotyp F-klassifizierten eurasischen Schweineinfluenzaviren dieser Studie wurden insgesamt 12 Isolate als genotypisch Amantadin-sensitiv und 145 als Amantadin-resistent identifiziert (Abb. 28 und Tab. A12).

Ob andere für Serin kodierende Basentriplets der AS 31 Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Viren haben, und ob diese Mutationen stabil bleiben oder während einer 20-fachen Passagierung revertieren, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Dafür wurde im pHW2000-[M p8]-Plasmid mittels Mutagenese das Serin-kodierende Codon AGT zu TCA bzw. TCT verändert. Die für diese Studie hergestellten rekombinanten Viren bestanden aus dem Wildtyp-M bzw. dem mutierten M von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) sowie den restlichen Segmenten des humanen Virus A/WSN/33 (H1N1). Desweiteren wurde das Wildtypvirus A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) für die Auswertung als Vergleichsprobe herangezogen.

Im ersten Teilversuch sollte das Wachstumsverhalten der Viren analysiert werden. Dazu wurden MDCK-Zellen mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert. Nach 1-stündiger Adsorptionszeit (= 0 h) sowie 3, 6, 8, 10, 12, 24, 36 und 48 h p.i. erfolgte die Entnahme des Zellüberstandes aus drei parallelen Ansätzen. Die Virustiter wurden anschließend mit der TCID₅₀-Methode bestimmt. Die für die Auswertung verwendeten Titer ergaben sich aus dem Mittelwert der Dreifachbestimmung. Die Wachstumskinetiken der vier untersuchten Viren sind in Abbildung 37 graphisch dargestellt. Bis auf die Mutante WSN-[M p8-TCA] ähneln sich die Vermehrungskinetiken der einzelnen Isolate. Ungefähr 6-8 h nach Infektion begann die Freisetzung neugebildeter infektiöser Viren. Das Wildtypvirus A/sw/Potsdam/15/81 sowie das Virus WSN-[M p8-TCT] erreichten nach 24 h p.i. einen maximalen Titer von $1-1,8 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50 µl. Bei der Mutante mit dem natürlich vorkommenden Serin-Codon AGT konnte das Titermaximum ($2,2 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50 µl) erst 12 h später ermittelt werden. Das TCA-Virus zeigte bereits nach drei Stunden p.i. einen

Anstieg des Virustiters um eine log-Stufe. Im weiteren Verlauf deutet das Wachstum jedoch eher auf eine langsamere und im Vergleich zu den anderen Viren schlechtere Replikation hin.

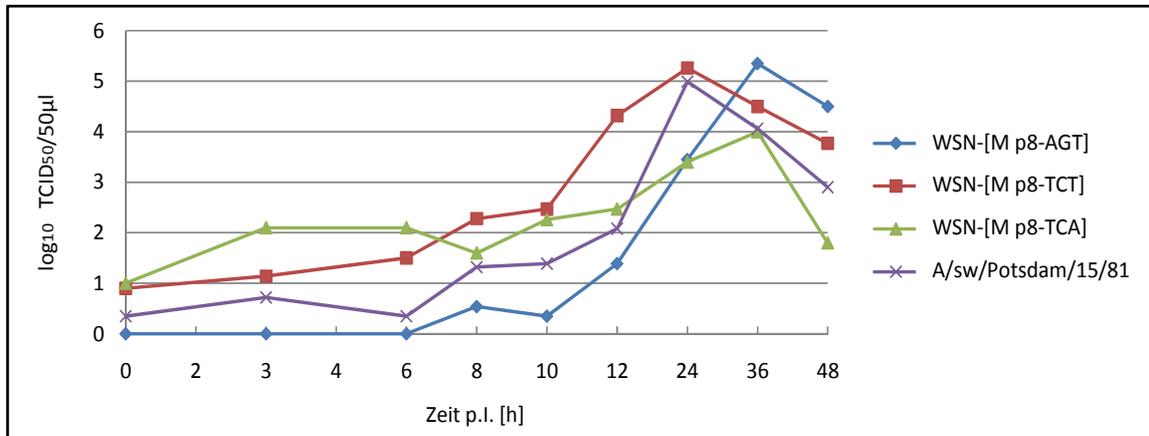


Abb. 37: Wachstumskinetik der mutierten Viren mit verschiedenen Serin-kodierenden Basentriplets (AS31 M2) im Vergleich zum Wildtypvirus A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) in MDCK-Zellen, die mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte der Virustiter im Überstand (n=3). Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

Im zweiten Teil der Untersuchung sollte die Stabilität der zwei alternativen Serin-kodierenden Basebriplets getestet werden. Dafür wurden die Mutanten WSN-[M p8-TCT] und WSN-[M p8-TCA] in MDCK-Zellen über einen Zeitraum von 20 Passagen vermehrt. Nach der 5. und 10. Passage erfolgten die Virus-RNA-Isolierungen mit anschließender Sequenzierung der M-Segmente. Der Virusüberstand der 20. Passage wurde zunächst plaquegereinigt und dann sequenziert. Die Sequenzdaten konnten mit MEGA4.0 ausgewertet und verglichen werden. Als Referenzsequenz diente das M von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1). Das Ergebnis der Sequenzanalyse (Abb. 38) zeigte, dass die Mutationen im Serin-Codon (nt 779-781) auch nach 20 Passagen unverändert vorlagen. Desweiteren wurde bei beiden Serin-Mutanten je eine AS-Substitution (L117F (TCT-Mutante) und A125T (TCA-Virus)) im M1 der 20. Passage detektiert (Abb. 38). Diese liegen 405 bzw. 429 Nukleotide von dem S31-kodierenden Codon entfernt. Beim Vergleich der M-Sequenzen dieser Studie konnte weder die Substitution L117F noch die Mutation A125T beobachtet werden.

Passagierung des Serin-Mutanten (TCT und TCA)

Leserahmen	M1	M2
A/swine/Potsdam/15/81 M	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 5. Passage	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 10. Passage	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 20. Pass Plaque1	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 20. Pass Plaque2	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 20. Pass Plaque3	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCT 20. Pass Plaque4	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCTATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 5. Passage	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 10. Passage	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 20. Pass Plaque1	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 20. Pass Plaque2	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 20. Pass Plaque3	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG
WSN-M-p8-TCA 20. Pass Plaque4	AGGAGGTGGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCACCTTGCCAGT	ATTGCAGCATCAATCATTGG

Aminosäure: L117F A125T S31

Abb. 38: Übersicht der Basensubstitutionen (M1) sowie der AS31-Serin-Codons (M2) der mutierten Viren WSN-[M p8-TCT] und WSN-[M p8-TCA] nach 20-facher Passagierung in MDCK-Zellen; Vergleichssequenz: A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

Nachdem die Stabilität der Serin-Mutationen über 20 Passagen bestätigt werden konnte, sollte im dritten Teil der Einfluss von Amantadin getestet werden. Hierfür wurden die Viren WSN-[M p8-AGT], WSN-[M p8-TCA] und WSN-[M p8-TCT] in MDCK-Zellen unter Amantadinselektionsdruck 20-mal passagiert. Die eingesetzte Konzentration des Ionenkanalblockers lag bei 1-2 µg/ml. Das entspricht ungefähr einer 25- bis 51-fach höheren IC₅₀-Konzentration der rekombinanten Serin-Mutanten (vergl. Tab. 26). Nach Plaquereinigung der Virussuspensionen aus den Passagen 3, 7, 10, 15 und 20 erfolgte die Sequenzierung des M-Segmentes von jeweils 3-5 Plaques. In den Abbildungen 39-41 sind die Basensubstitutionen, die während der Passagierung auftraten, anhand von Alignments zusammengefasst.

Während der Vermehrung des Virusstammes WSN-[M p8-AGT] konnten folgende Mutationen identifiziert werden: V27A, S31N und G34E (Abb. 39). Diese Aminosäuresubstitutionen wurden bereits 1985 mit der Resistenzentstehung gegenüber Amantadin in Zusammenhang gebracht (Hay et al., 1985). Interessanterweise konnte die AS-Substitution S31N in nur einem Plaque (3. Passage) nachgewiesen werden, die Mutation G34E jedoch in 16 von 19 sequenzierten Virusisolaten. Ab der 15. Passage trat eine weitere Basensubstitution an Position 744 auf. Der Einbau von Adenin anstelle eines Guanins bewirkte sowohl im M1- als auch im M2-Leserahmen folgenden Aminosäureaustausch: M248I (M1) und C19Y (M2). Diese Substitutionen waren bei Viren nachzuweisen, die über die Resistenzmutation G34E verfügten. Innerhalb der phylogenetischen Studie dieser Arbeit kodieren die M248I/C19Y-tragenden Viren alle für ein Glycin an Position 34. Bei 95 % der eurasisch porzinen Viren des Genotyps F lässt

sich jedoch ein Zusammenhang mit der Substitution S31N feststellen (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung der Aminosäure 77 konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden.

Passagierung des Serin-[AGT]-Wildtyps unter Substanzdruck

Leserahmen:	M2
A/swine/Potsdam/15/81 M	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 3.Pass Plaque1	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 3.Pass Plaque2	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 3.Pass Plaque3	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 7.Pass Plaque1	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 7.Pass Plaque2	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 7.Pass Plaque3	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 10.Pass Plaque1	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 10.Pass Plaque2	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 10.Pass Plaque3	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 15.Pass Plaque1	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 15.Pass Plaque2	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 15.Pass Plaque3	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 15.Pass Plaque4	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 15.Pass Plaque5	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 20.Pass Plaque1	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 20.Pass Plaque2	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 20.Pass Plaque3	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 20.Pass Plaque4	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG
WSN-M-p8-AGT AMA 20.Pass Plaque5	GTGCAAGATGCAGCGATTCAAAGTGATCCTCTCGTTATTGCAGCAAGTATCATTGGGATCTTG

Aminosäure: M248I (M1)/C19Y (M2) V27A S31N G34E

Abb. 39: Zusammenfassung der Basensubstitutionen im M-Segment der Virusmutane WSN-[M p8-AGT], entstanden während der 20-fachen Passagierung in MDCK-Zellen unter Amantadin-Einfluss (1 µg/ml: bis 13. Passage; 2 µg/ml: ab 14. Passage), Referenzsequenz: A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

Die Vermehrung des Virus WSN-[M p8-TCT] unter Amantadineinfluss ergab insgesamt zwei Basensubstitutionen. Die isolierten Viren der 3. Passage wiesen keine Unterschiede zur Referenzsequenz A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) auf (Abb. 40). Während der 7. Passage ist der Übergang des mutierten Serin-Codons TCT (AS31) zu TTT festzustellen. Diese Basensubstitution, welche für Phenylalanin kodiert, setzte sich bis in die 20. Passage fort. Desweiteren fielen die Plaques 2 und 3 der letzten Passage durch den Aminosäureaustausch A227T im M1 auf. Die Virusisolate A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2) und A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2) verfügen als einzige der Genotyp F klassifizierten Schweineinfluenzaviren über diese AS-Substitution (Daten nicht gezeigt).

Passagierung der Serin-[TCT]-Mutante unter Substanzdruck

Leserahmen:	M1										M2																																																	
A/swine/Potsdam/15/81 M	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 3.Pass Plaquel	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 3.Pass Plaquet2	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 3.Pass Plaquet3	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 7.Pass Plaquet1	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 7.Pass Plaquet2	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 7.Pass Plaquet3	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 10.Pass Plaquet1	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 10.Pass Plaquet2	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 10.Pass Plaquet3	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 14.Pass Plaquet1	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 14.Pass Plaquet2	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 14.Pass Plaquet3	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 14.Pass Plaquet4	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 14.Pass Plaquet5	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 20.Pass Plaquet1	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 20.Pass Plaquet2	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 20.Pass Plaquet3	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 20.Pass Plaquet4	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T
WSN-M-p8-TCT AMA 20.Pass Plaquet5	G	G	G	A	C	T	C	A	T	C	C	T	A	G	C	T	C	C	A	G	T	G	C	T	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	T	A	T	T	G	C	A	G	C	A	A	G	T	A	T	C	A	T	T	G	G	G	A	T	C	T

Aminosäure:

A227T

S31F

Abb. 40: Zusammenfassung der Basensubstitutionen im M-Segment des mutierten Virus WSN-[M p8-TCT], entstanden während der 20-fachen Passagierung in MDCK-Zellen unter Amantadin-Einfluss (1 µg/ml: bis 13. Passage; 2 µg/ml: ab 14. Passage), Referenzsequenz: A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

Nach mehrfacher Passagierung der TCA-Mutante unter Amantadindruck konnten AS-Substitutionen an den Positionen 95 und 195 im M1 sowie an Position 30 im M2 identifiziert werden. Das Codon der Aminosäure 30 (GCA) unterlag gleich zwei Mutationen. Die Plaques 1 und 3 der 3. Passage wiesen einen Basenaustausch an erster Stelle des Codons auf (GCA [Ala] → ACA [Thr]). Ab der 7. Passage wurde anstelle von Cytosin eine Adeninbase an zweiter Position des Basentripletts eingebaut. Das daraus resultierende Codon kodiert für die Aminosäure Glutamat. Basensubstitutionen, welche die Aminosäuren 95 und 195 des ersten Leserahmens betreffen, treten ab der 10. bzw. der 15. Passage auf und sind in der Abbildung 41 markiert. Während die Mutation S195A innerhalb der ausgewählten Influenzaviren nicht zu beobachten ist, tritt die Substitution R95K bei acht eurasisch porzinen Viren des Genotyps F auf. Diese Viren stammen aus den Jahren 1996-2006 und weisen keine Clusterung auf. Eine Veränderung der eingeführten Serinmutation TCA konnte über den Zeitraum der 20 Passagen nicht verzeichnet werden.

Passagierung der Serin-[TCA]-Mutante unter Substanzdruck

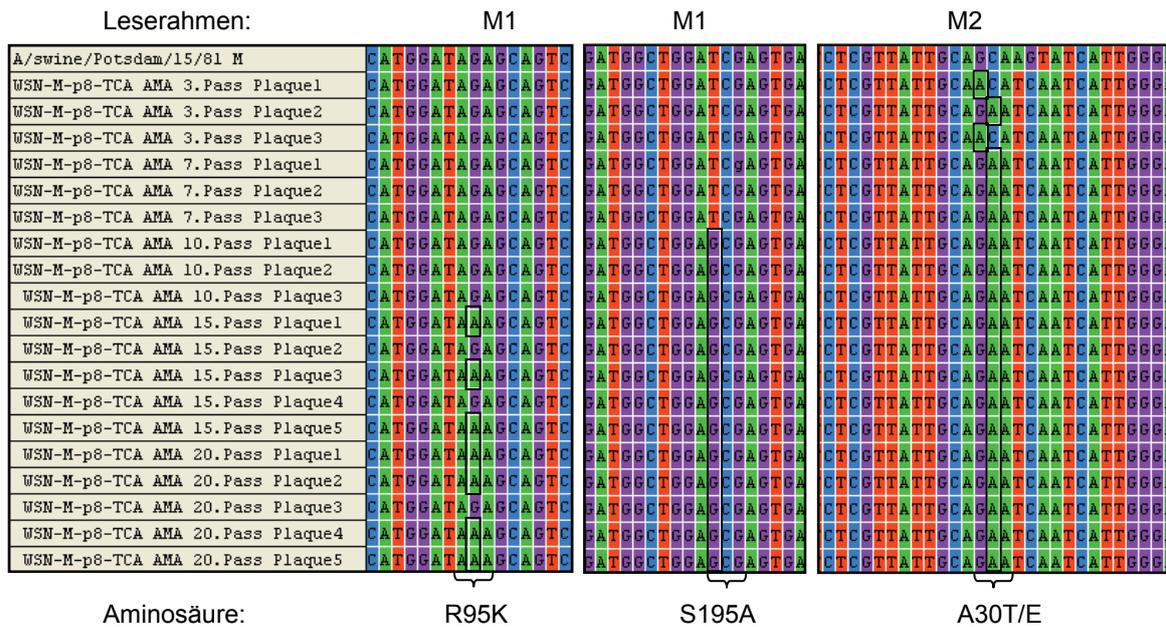


Abb. 41: Zusammenfassung der Basensubstitutionen im M-Segment der Virusmutante WSN-[M p8-TCA], entstanden während der 20-fachen Passagierung in MDCK-Zellen unter Amantadin-Einfluss (1 µg/ml: bis 13. Passage; 2 µg/ml: ab 14. Passage), Referenzsequenz: A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)

In Abbildung 42 sind die Mutationen, welche im Rahmen der Passagierung unter Substanzdruck entstanden sind, anhand von Elektropherogrammen zusammengefasst. Ausgehend vom Wildtypvirus A/sw/Postdam/15/81 (H1N1) (a) sind die durch Amantadin hervorgerufenen Mutationen (b) sowie die Serin (31)-Mutanten (c) und deren durch Substanzdruck entstandenen Basensubstitutionen (d) dargestellt.

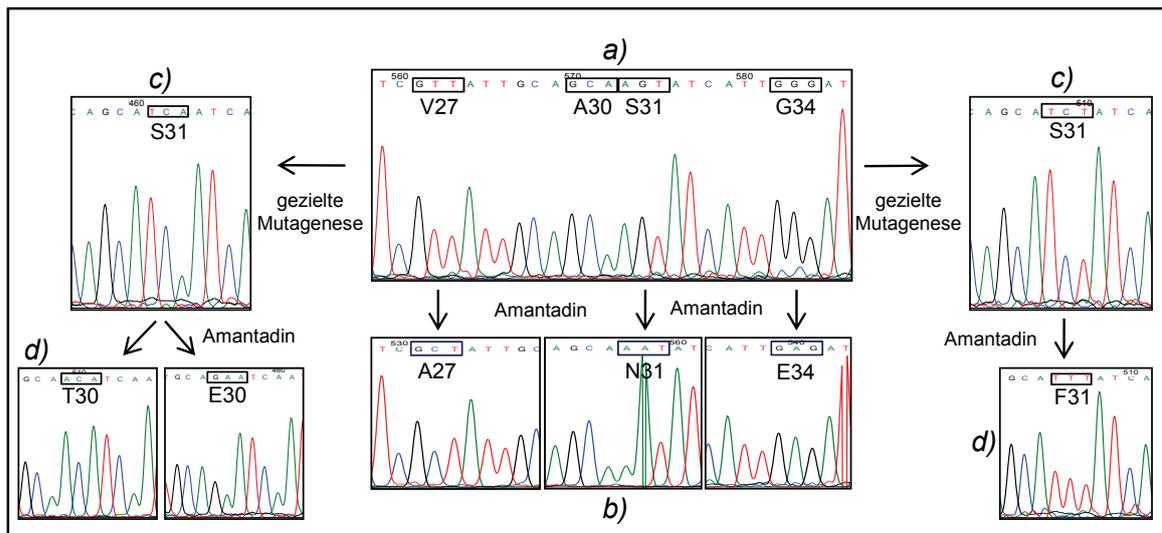


Abb. 42: Elektropherogramme der detektierten Basensubstitutionen nach Passagierung unter Substanzdruck des M-Segmentes von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1). Rot: Thymin; Blau: Cytosin; Grün: Adenin; Schwarz: Guanin

Ob die Mutationen der passagierten Viren letztendlich zu Resistenzen gegenüber Amantadin führen, wurde im 4. Teil der Versuchsreihe mittels Plaquereduktionstest (PRT) überprüft. Als Kontrollen dienten die mutierten Ausgangsviren WSN-[M p8-AGT], WSN-[M p8-TCA] und WSN-[M p8-TCT]. In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der PRTs zusammengefasst. Viren, die einen IC₅₀-Wert von unter 1 µg/ml aufweisen, werden als Amantadin-sensitiv eingestuft, Virusisolate mit einer IC₅₀ über 10 µg/ml als Amantadin-resistent. Wie zu erwarten, weisen die Kontrollviren IC₅₀-Werte von 0,035-0,045 µg/ml Amantadin auf. Bei den unter Substanzdruck vermehrten Viren konnte weder bei 12,5 µg/ml noch bei der maximal eingesetzten Amantadinkonzentration von 22,5 µg/ml eine 50 %-ige Plaquereduktion festgestellt werden.

Tab. 26: Zusammenfassung der im Plaquereduktionstest erzielten IC₅₀-Werte ausgewählter Mutanten nach Passagierung unter Amantadindruck in MDCK-Zellen

Virus	MUT nt	MUT AS	IC ₅₀ (µg/ml)			
WSN-[M p8-AGT] 1.Passage			0,035	0,045		Sens.
WSN-[M p8-AGT] 3.P. AMA PI1	GGG→GAG	G34E	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-AGT] 3.P. AMA PI2	GTT→GCT	V27A	>10	>12,5	>22,5	Res.
WSN-[M p8-AGT] 3.P. AMA PI3	AGT→AAT	S31N	(4,4)	>12,5	>22,5	Res.
WSN-[M p8-AGT] 7.P. AMA PI1	GGG→GAA	G34E	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-AGT] 15.P. AMA PI2	Doppelmut	C19Y und G34E	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-TCA] 1.Passage	AGT→TCA	S31S	0,037	0,042		Sens.
WSN-[M p8-TCA] 3.P. AMA PI3	AGC→AAC	A30T	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-TCA] 7.P. AMA PI2	GCA→GAA	A30E	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-TCA] 10.P. AMA PI3	Doppelmut	S195A und A30E	>10	>12,5	>22,5	Res.
WSN-[M p8-TCA] 20.P. AMA PI5	Dreifach-Mut.	R95K+S195A+A30E	>10	>22,5		Res.
WSN-[M p8-TCT] 1.Passage	AGT→TCT	S31S	0,037	0,0045		Sens.
WSN-[M p8-TCT] 7.P. AMA PI3	TCT→TTT	S31F	>10	>22,5		Res.

Die Substanzkonzentrationen beziehen sich auf eine 50%-ige Reduktion der Plaqueanzahl. AMA: Amantadin; Sens.: Amantadin-sensitiv; Res.: Amantadin-resistent

II. Analyse weiterer Mutationen im M-Segment von A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Belzig/2/01

Die Bedeutung der Aminosäure Isoleucin an Position 26 und 27 des M2 bezüglich der Resistenzprägung gegenüber Amantadin wurde bisher noch nicht untersucht. Die Substitution L26I tritt bei 47 europäisch porzinen Viren auf, welche alle innerhalb eines Clusters liegen. Der Austausch V27I betrifft vier Genotyp A-Viren sowie das aviäre Isolat A/mallard/Potsdam/178-4/83. Mittels der reversen Genetik und der Plaquereduktionsteste sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss der AS Isoleucin an den Positionen 26 und 27 ermittelt werden. Nach Generierung der mutierten Viren WSN-[M p8-I26] und WSN-[M p8-I27] wurden diese auf ihre Replikationsfähigkeit getestet. Die Titer ergaben sich aus den Mittelwerten der Dreifachbestimmung. Die mit einer MOI von 0,1 infizierten

MDCK-Zellen wurden nach einer Stunde gewaschen und mit neuem Infektionsmedium versehen. Zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte die Abnahme der Virusüberstände, aus denen mittels $TCID_{50}$ die Virustiter bestimmt werden konnten. Die Wachstumskinetiken der rekombinanten Viren verliefen im Vergleich zum Wildtypvirus bis zur 6. Stunde nach Infektion identisch (Abb. 43). Während bei A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) die Freisetzung neuer Viren bereits nach 6 h p.i. nachzuweisen war, konnte dieses Stadium bei den Virusmutanten erst nach 10 h p.i. beobachtet werden. Zudem wies das [M p8-I27]-Virus eine deutlich schwächere Replikationsrate auf (Abb. 43). Diese ist jedoch nicht der Reassortierung mit A/WSN/33 (H1N1) zuzuschreiben, da die nach gleichem Prinzip aufgebauten Viren WSN-[M p8-AGT] und WSN-[M p8-I26] annähernd identische Wachstumskinetiken gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Die maximal erreichten Titer (24 bzw. 36 h p.i.) schwankten zwischen $1 \cdot 10^3$ - $2,2 \cdot 10^5$ $TCID_{50}/50\mu l$.

Die für eine 50 %-ige Plaquereduktion benötigte Amantadin-Konzentration lag bei den hier untersuchten Virusisolaten zwischen 0,08 und 0,34 $\mu g/ml$. Durch diese IC_{50} -Werte werden die Viren als Amantadin-sensitiv klassifiziert. Die Aminosäure Isoleucin an den Positionen 26 und 27 hat somit keinen direkten Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber dem M2-Ionenkanalblocker.

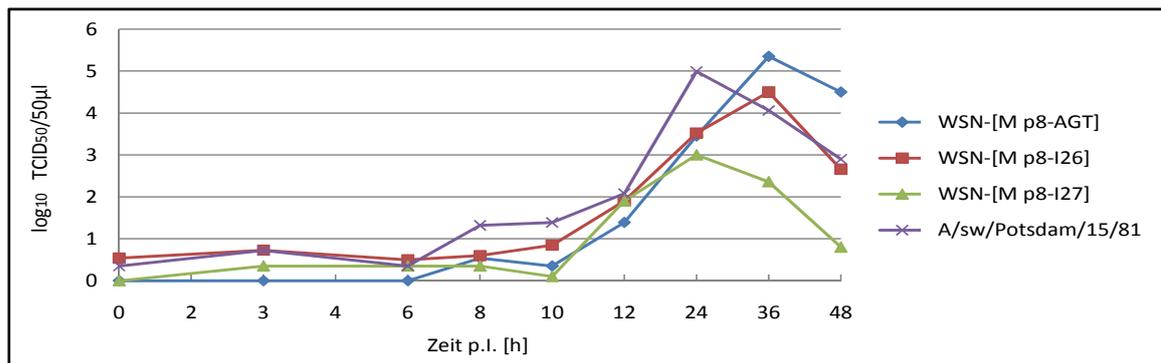


Abb. 43: Wachstumskinetik der mutierten Viren WSN-[M p8-AGT], WSN-[M p8-I26] und WSN-[M p8-I27] im Vergleich zum Wildtypvirus A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) in MDCK-Zellen, die mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte der Virustiter im Überstand (n=3). Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

Desweiteren wurde die Rolle der Aminosäure 77 im M2 untersucht. Bei allen bisher untersuchten Schweineinfluenzaviren treten die AS 31 und 77 in den Kombinationen Serin und Arginin sowie Asparagin und Glutamin auf. Das porcine H1N1-Virus A/sw/Potsdam/15/81 (S31/R77) konnte im Plaquereduktionstest als Amantadin-sensitiv charakterisiert werden (IC_{50} : 0,38 $\mu g/ml$). Als Amantadin-resistent hingegen wurde das Virus A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) mit der Kombination N31 und Q77 getestet (IC_{50} : > 20 $\mu g/ml$). Im Zuge der Untersuchung wurde die Aminosäure 77 zwischen den beiden Viren mittels Mutagenese ausgetauscht. Die über Transfektion synthetisierten

Virusmutanten WSN-[M p8-R77Q] und WSN-[M p11-Q77R] sind zunächst auf ihr Wachstumsverhalten und anschließend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Amantadin getestet worden. Die Erstellung der Wachstumskinetiken erfolgte analog der vorangegangenen Replikationsstudien. Die Vermehrung der Wildtypviren sowie der Mutante WSN-[M p11-Q77R] sind annähernd identisch. Wie in Abbildung 44 erkennbar, replizierte sich das Virusisolat WSN-[M p8-R77Q] im Vergleich zu den anderen Viren deutlich schlechter. Dies spiegelt sich auch in den maximalen Virustitern, welche 24 h p.i. erlangt wurden, wider. Während die Wildtypviren A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) Titer von $\sim 1 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50µl erreichten, wies die Virusmutante WSN-[M p8-R77Q] mit $1,86 \cdot 10^2$ TCID₅₀/50µl einen deutlich geringeren Anteil nachweisbarer Viren auf.

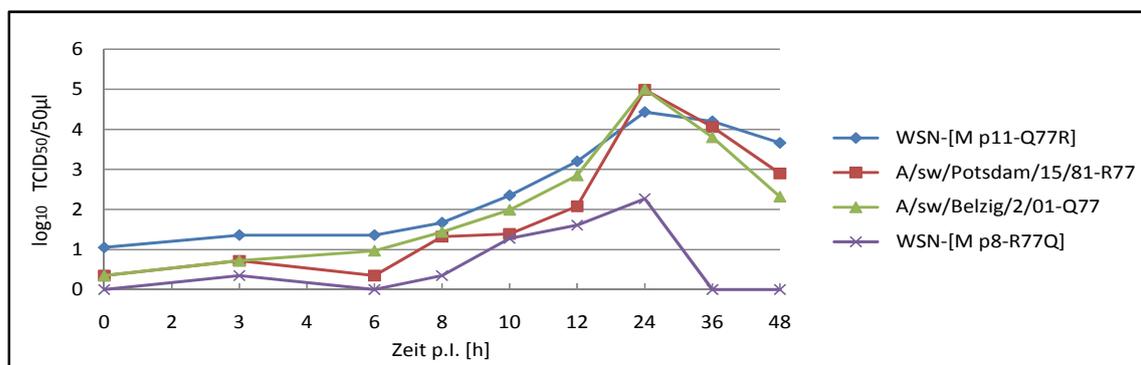


Abb. 44: Wachstumskinetik der mutierten Viren WSN-[M p8-R77Q] und WSN-[M p11-Q77R] im Vergleich zu den Wildtypviren A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) in MDCK-Zellen, die mit einer MOI von 0,1 pfu/Zelle infiziert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Virustiter im Überstand (n=3). Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurde auf die Abbildung der Standardabweichung verzichtet.

In Tabelle 27 sind die ermittelten IC₅₀-Werte der beiden Mutanten WSN-[M p8-R77Q] und WSN-[M p11-Q77R] im Vergleich zu den Wildtypviren A/sw/Potsdam/15/81 (R77) und A/sw/Belzig/2/01 (Q77) zusammengefasst. Anhand der Daten ist deutlich zu sehen, dass die Potsdam-Viren auf Amantadin sensitiv reagieren, während die N31-tragenden Viren (A/sw/Belzig/2/01 und WSN-[M p11-Q77R]) resistent gegenüber dem Ionenkanalblocker sind. Die AS 77 trägt somit nicht zur Resistenzentwicklung bei.

Tab. 27: Zusammenfassung der im Plaquereduktionstest erzielten IC₅₀-Werte der mutierten Viren WSN-[M p8-R77Q] und WSN-[M p11-Q77R] im Vergleich zu den Wildtypviren A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1).

Virus	Codon AS77	AS77	IC ₅₀ (µg/ml)		
A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	CAA	R	0,476	0,3	sensitiv
A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)	CGA	Q	>10	>20	resistent
WSN-[M p8-R77Q]	CAA→CGA	R→Q	0,38	0,35	sensitiv
WSN-[M p11-Q77R]	CGA→CAA	Q→R	>10	>22,5	resistent

Die Substanzkonzentrationen beziehen sich auf eine 50%-ige Reduktion der Plaueanzahl.

5. Diskussion

5.1. Illumina-Sequenzierung – eine schnellere Alternative zur Genomcharakterisierung von Influenzaviren

Die in dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen waren erst nach Generierung einer großen Anzahl an Sequenzdaten durchführbar. Die AG Zell am Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena sequenziert seit mehreren Jahren humane, aviäre und porcine Influenza-A-Viren. Zunächst erfolgte die Sequenzierung über den ABI Prism®310 Genetic Analyser. Dieses Sequenziergerät ist mit einer Kapillare ausgestattet und benötigt für die Erstellung eines Elektropherogramms circa 1 h. Seit der Verwendung eines 8-Kapillar-Sequenzierers (*CEQ8000 Genetic Analysis System*) konnte die Generierung von Sequenzdaten im Vergleich zum ABI Prism deutlich gesteigert werden. In der Vergangenheit wurden mittels dieser Methode im Rahmen von Diplomarbeiten 10-15 Viren pro Jahr sequenziert (Motzke S, 2007; Bergmann S, 2008, Steglich C, 2010). Um eine Beschleunigung des doch arbeitsintensiven Verfahrens zu ermöglichen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Illumina/Solexa-Sequenzierung getestet werden. Diese gehört, neben der SOLiD- (Sequenzierung durch Ligation) und Pyrosequenzierung mit der 454-Methodik, der *Next-Generation Sequencing*- (NGS) Technologie an. Die Vorteile gegenüber den Sanger-Sequenziermethoden liegen unter anderem in der klonierungsfreien Amplifikation sowie der gleichzeitigen Produktion von tausenden bis Millionen von sogenannten reads (*high-throughput sequencing*). Die NGS-Technologie wird zur Analyse von Genexpressionsmustern sowie zur Entdeckung und Charakterisierung von small ncRNAs, mRNAs und Transkriptionsfaktoren herangezogen (Ansorge, 2009; Morozova und Mara, 2008). Desweiteren können anhand dieser Technologie DNA-Methylierungsmuster und Chromatinstrukturen ermittelt werden (Ansorge, 2009). Die Illumina-Methode wird vorzugsweise bei der Transkriptom- und der Re-Sequenzierung, der Analyse von Genexpressionen sowie von Protein-DNA/RNA-Interaktionen angewandt (www.illumina.com). Das Verfahren kennzeichnet sich durch den Einsatz von reversiblen Terminatoren mit entfernbaren Fluoreszenzfarbstoffen aus. Die *short reads*, welche über die *sequencing by synthesis*-Technologie generiert werden, besaßen zu Beginn der Einführung eine Länge von 25-30 bp. Inzwischen erreichen sie eine Länge von 75 bis 100 bp. Eine weitere Verlängerung um 50 bp und mehr ist geplant. Laut den Herstellerangaben können bei einem Sequenzierlauf, welcher derzeit etwa 5 Tage in Anspruch nimmt, bis zu 640 Millionen *pair end reads pro flow cell* generiert werden (www.illumina.com, Stand 2011). Die Auswahl dieser Technologie, welche noch nicht für die Sequenzierung segmentierter RNA-Viren ausgelegt ist, liegt sowohl im Einsatz von 12 Indexprimern als auch in der geringen Menge an einzusetzender RNA (1-10 µg) begründet. So ermöglicht diese Multiplex-Sequenzierung die genetische

Charakterisierung von 12 verschiedenen Proben in einem einzigen Lauf. Dass dieses Prinzip auch auf RNA-Viren übertragbar und praktikabel ist, wurde in drei separaten Läufen mit insgesamt 26 europäisch porzinen Influenza-A-Viren überprüft.

Pro Lauf (5 Tage) konnten bis zu 30 Millionen Reads mit einer Länge von 76 bp generiert werden. Einen ähnlich hohen Wert (25 Mio.) erzielte die Arbeitsgruppe um Franchini et al. (2011), welche mittels der Illumina die Transkriptomstrukturen der Meeresschnecke *Haliotis midae* ermittelten. Wang et al. (2010) erreichten bei einem Sequenzierlauf zur Charakterisierung der Transkriptome der Tabakmottenschildlaus 43 Millionen Reads.

Von den *high quality reads* konnten anhand der Indexprimer im Durchschnitt 87 % (13-20 Mio.) einem Index zugeordnet werden. Diese *assigned reads* waren in den Läufen 2 (7 Viren) und 3 (10 Viren) annähernd gleichverteilt (Abb.15; Durchschnitt 14,3 bzw. 10 %). Lauf 4 (9 Viren) hingegen wies bei der Verteilung der Reads starke Unterschiede auf. So konnten den Viren zwischen 1 und 24 % der *assigned reads* zugeordnet werden (Abb. 15). Die Anzahl der *assigned reads* pro Virus gibt aber noch nicht Aufschluss über den Anteil an virusspezifischen Reads. Über Referenzsequenzen werden die *assigned reads* in *mappable* (virusspezifische) und *nonmappable* (nichtvirusspezifische) *reads* klassifiziert. Anhand der Tabelle 16 ist ersichtlich, dass es keine Korrelation zwischen der Anzahl der *assigned reads* zu der Anzahl der *mappable reads* gibt. Folgende Beispiele zeigen, dass Viren mit einer hohen Anzahl an *assigned reads* nicht automatisch einen hohen oder niedrigen Wert an virusspezifischen Reads aufweisen:

*Lauf 2: A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1): 16,7 % assigned reads (abs. 3.170.052)
davon 1,33 % mappable reads (abs. 42.263)*

*Lauf 3: A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1): 9,95 % assigned reads (abs. 1.380.577)
davon 48,43 % mappable reads (abs. 668,651)*

*Lauf 4: A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2): 24 % assigned reads (abs. 6.410.356) davon
43,16 % mappable reads (abs. 2.766.503)*

Aufgrund der geringen Ausbeute an virusspezifischen Reads sowie lückenhaften Konsensussequenzen wurde das Standardprotokoll für den 3. Lauf modifiziert. Zunächst erfolgte die Plaqueaufreinigung von sechs der 10 zu untersuchenden Virussuspensionen. Desweiteren wurden zur cDNA-Synthese dem Randomprimer-Mix das Influenza-5'-Oligo sowie ein Nonamer-Primermix beigelegt.

Die Auswertung der im 3. Lauf generierten Daten sowie deren Vergleich zu den Daten des vorhergehenden Laufes ergaben einen Anstieg an *mappable reads* um 14 % (von 6 auf 20 %). Desweiteren konnten im Gegensatz zu Lauf 2 die 5'- und 3'-Enden der Genomsegmente vollständig sequenziert werden. Dieser positive Effekt ist vermutlich auf die Zugabe des Influenza-5'-Primers zurückzuführen. Beim Vergleich der Daten des 3.

Durchganges konnte zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den plaquegereinigten und nicht plaquegereinigten Virusstämmen festgestellt werden. Der Anteil an *mappable reads* der nicht vereinzelt Viren liegt zwischen 0,31-6,6 %, die der plaquegereinigten Viren zwischen 21,35-48,43 %. Aufgrund der hohen Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase treten in einer Virussuspension Populationen von Virusvarianten auf, die als Quasispezies bezeichnet werden. Die Virusvarianten unterscheiden sich durch 1-2 Basensubstitutionen von einander. Manche der untersuchten Virusisolate liegen als Mischungen vor, wodurch die Entstehung von Reassortanten in der Zellkultur ermöglicht wird. Durch die Plaquereinigung wird dieses Phänomen reduziert, was sich auch im Anstieg der virusspezifischen Reads widerspiegelt. Die Plaquereinigung birgt aber auch den Nachteil, dass mögliche Reassortierungen unentdeckt bleiben. Um dem zu entgehen, wäre eine Sequenzierung mehrerer Plaques eines Virusstammes ratsam, ist jedoch finanziell entsprechend aufwendiger.

Für den 4. Lauf wurden alle 9 Viren einer Plaquereinigung unterzogen. Desweiteren erfolgte aufgrund einer bis dahin immer wieder auftretenden Lücke im PA-Segment (Abb. 45) die Synthese eines 10 nt langen PA-Oligos. Dieser Primer bindet ca. 72 Nukleotide vor der nichtzusequenzierenden Region und sollte die Synthese der entsprechenden Reads erleichtern.

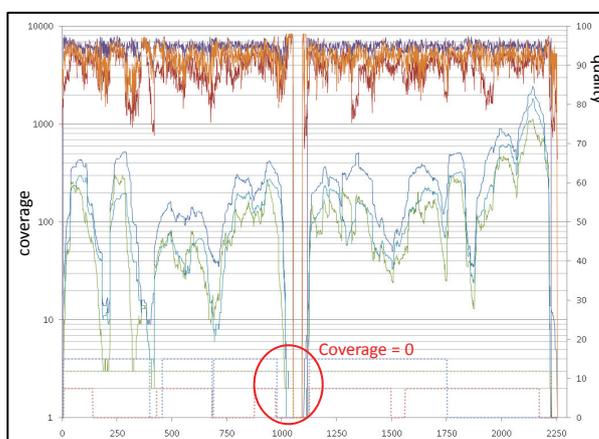


Abb. 45: Darstellung der Coverage [Anzahl der reads] sowie der Qualität [%] der PA-Sequenz von A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1). In der Region um 1000-1125 nt fiel die Coverage auf 0 % zurück, d.h. es konnten keine entsprechenden Sequenzen für diesen Bereich ermittelt werden. Entsprechend liegt auch die Qualität der Reads innerhalb dieser Region bei null.

Bei der Identifizierung der *mappable reads* des 4. Laufes wurde ein weiterer Anstieg um 7 % registriert. Bei vier der neun Viren konnte die vollständige Genomsequenz ermittelt werden. Beim Vergleich der *assigned* und *mappable reads* wiesen drei dieser vier Viren den höchsten Anteil auf (Tab. 16). In vier weiteren Fällen blieb die Lücke im PA-Segment bestehen. Die Ursache für dieses immer wieder auftretende Problem ist noch ungeklärt. Es könnte sich dabei um Sekundärstrukturen handeln, wodurch die Prozesse der cDNA-Synthese, Adapterligation, der Indexierung sowie der PCR-Reaktionen gestört werden.

Anhand der *de-novo*-Assemblierung mit ABySS (*Assembly By Short Sequences*) werden die *mappable reads* zu Contigs und schließlich zur Konsensussequenz (=Virusgenom) zusammengesetzt (Simpson et al., 2009). Durch dieses Verfahren konnten 49-94 % der genetischen Information der Viren assembliert werden. Durch die zusätzliche Nutzung der Referenz-Assemblierung nach Bentley (2008) war eine Identifizierungsrate über 99 % möglich.

Die über Computerprogramme gestützte Auswertung der Reads ist kritisch. Aufgrund der verschiedenen Subtypen müssen die Reads/Contigs mit mehreren Referenzsequenzen, welche die verschiedenen Subtypen repräsentieren, abgeglichen werden. Desweiteren sind die Programme nicht zur Analyse von Doppelsequenzen geeignet. Dies zeigte sich bei der genetischen Charakterisierung des Virusstammes A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1). Zunächst sollte die Sequenz des NS-Segmentes mittels der *cycle sequencing*-Methode ermittelt werden. Die Auswertung der Elektropherogramme zeigte jedoch keine einheitliche Sequenz. Über die Illumina-Sequenzierung war eine Generierung der NS-Konsensussequenz ebenfalls nicht möglich. Dieses Phänomen liegt in der Methodik der Contig-Zusammensetzung begründet. Die 76 bp langen Reads werden anhand von ~ 20 nt langen Überlappungssequenzen, welche zu 100 % übereinstimmen müssen, aligned. Sobald auch nur ein Unterschied innerhalb der 20 Nukleotide auftritt, werden die Reads durch das Programm nicht erkannt und somit nicht in die Auswertung einbezogen (Abb. 46). Das Vorhandensein von Quasispezies sowie die hohe genetische Variabilität der Viren im Zusammenhang mit der eben erläuterten Auswertemethodik erschwert die Auswertung der Reads sowie die Bildung von Konsensussequenzen. Mit der Einführung der Plaquereinigung der Viren, wodurch ein einheitlicheres genetisches Profil gewährleistet wurde, stieg der Anteil an virusspezifischen Reads deutlich an. Die Option zur Parametermodifizierung bezüglich der Übereinstimmungsrate innerhalb der überlappenden Regionen muss beim Alignen der Reads abhängig von der Qualität und Quantität der Reads individuell angepasst werden.

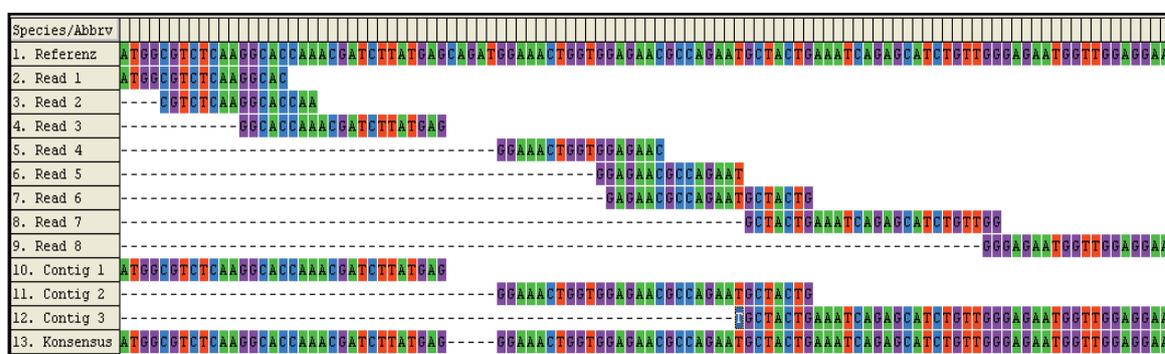


Abb. 46: Schematische Darstellung der Reads-Auswertung und Contig-Zusammensetzung durch die Bildung von Alignments ausgehend von einer Referenzsequenz

Durch die Generierung von Tausenden bis Millionen von Reads bietet die Illumina-Methode eine hohe statistische Absicherung der ermittelten Sequenz. Während mit dem *cycle sequencing*-Verfahren jede Base 1 bis 4mal elektrophoretisch nachgewiesen wurde, konnte über die Illumina-Sequenzierung eine Base bis zu 35.000mal detektiert werden. Im Laufe der Analyse wurden auch Bereiche mit einer niedrigen statistischen Unterstützung detektiert. Wie oft eine Base ermittelt werden kann, hängt stark von der Qualität und Quantität der Reads ab.

Neben den *mappable reads* wurden auch die nichtviruspezifischen Sequenzen bezüglich ihrer Verteilung und Identität untersucht. So konnten 50-99,5 % der *assigned reads* nicht dem Referenzgenom zugeordnet werden (*nonmappable reads*) (Tab. 16). Im Laufe der drei Sequenzierungen war eine Verringerung der *nonmappable reads* um 21 % möglich (Lauf 2: 94,2 %; Lauf 4: 73,1 %). In Abbildung 47 ist die Verteilung *assigned reads* sowie die der *mappable* und *nonmappable reads* zusammengefasst. Die Graphik zeigt, dass sowohl die absolute Zahl der Reads als auch die relative Zahl steigt.

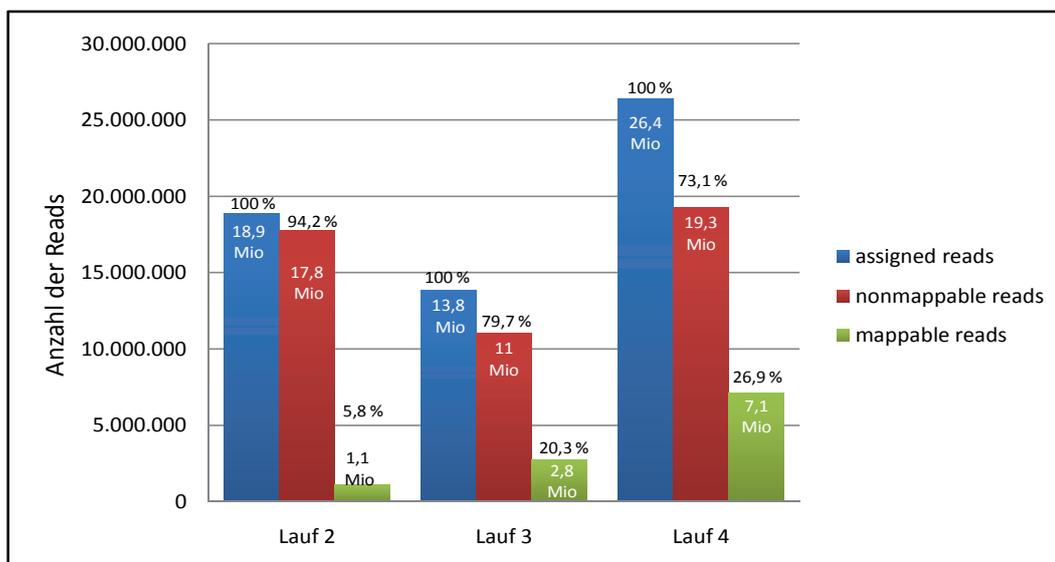


Abb. 47: Zusammenfassung der generierten Reads der Sequenzierläufe 2, 3 und 4; blaue Balken: *assigned reads*; rote Balken: *nonmappable reads* (nicht viruspezifisch); grüne Balken: *mappable reads* (viruspezifisch)

Um Strategien zur Reduzierung der *nonmappable reads* zu entwickeln, wurde zunächst die Identifizierung solcher Reads mittels einer Blast-Analyse durchgeführt. Zu 39 % konnten Sequenzähnlichkeiten zu *Canis familiaris* – dem Haushund detektiert werden. Dieser Befund könnte mit den MDCK-Zellen, welche für die Virusvermehrung herangezogen wurden, erklärt werden. Desweiteren konnten Sequenzähnlichkeiten zu *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Odocoileus virginianus*, *Bos taurus* und *Schistosoma japonicum* ermittelt werden. Diese Befunde sind nicht mit einer Kontamination der Probe

gleichzusetzen. Die Sequenzähnlichkeiten kommen vermutlich durch die geringe Größe der untersuchten Contigs zustande und sind somit nicht als eine 100 % Identifizierung der DNA-Abschnitte zu deuten. Franchini et al. (2011) führten ebenfalls eine Blast-Analyse der generierten Contigs mittels der Protein-Datenbank durch. Bei 16,8 % der Contigs konnten Homologien zur Meeresschnecke festgestellt werden, die restlichen 83,2 % wurden unter anderem dem Lanzettfischchen, der Honigbiene, der Gelbfiebermücke, dem Süßwasserpolyphen sowie der Menschenlaus zugeordnet (Franchini et al., 2011). In der Studie von Wang et al. (2010) konnten 83,8 % der Contigs nicht als Tabakmottenschildlaus-spezifisch identifiziert werden. Die Blast-Analyse ergab Sequenzähnlichkeiten zur Erbsenlaus, zum Reismehlkäfer und zur Honigbiene (Wang et al., 2010).

Bei der Unterscheidung der *nonmappable reads* bezüglich der Art der genetischen Information wurden neben ribosomalen DNAs rRNA, mRNA und cDNA identifiziert. Diese Daten zeigen, dass während der Ultrazentrifugation die virale RNA nicht optimal von der ribosomalen RNA/DNA getrennt werden konnte. Um eine höhere Reinheit der Virus-RNA zu erreichen, ist eine Optimierung der Zentrifugationsparameter nötig. Aufgrund eines ähnlichen Sedimentationsverhaltens ist eine absolute Trennung zwischen Viren und Ribosomen über Ultrazentrifugation nicht möglich. Desweiteren sollte der Einsatz von Lösungsmitteln diskutiert werden. In der Pflanzenvirologie wird durch die Zugabe von Chloroform oder Butanol die Aggregation der Zellbestandteile induziert. Ähnliche Effekte werden durch pH-Wertänderungen, durch Erhitzen sowie mehrmaliges Einfrieren erreicht. Die Aggregate können anschließend über niedrigtourige Zentrifugation von den Viruspartikeln getrennt werden. Die im Überstand verbliebenen Viren werden anschließend mit Polymeren ausgefällt. Möglich ist auch der Einsatz der Dichtegradienten-Zentrifugation, bei der die Viren aufgrund von Lichtbrechung als scharfe opaleszente Bande zu erkennen sind. Voraussetzung für dieses Verfahren ist eine hohe Konzentration an Viruspartikeln (Drews et al., 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Genome porziner Influenzaviren mittels zwei verschiedener Sequenzierverfahren entschlüsselt. Neben der auf Kapillarelektrophorese-basierenden Sequenzierung sollte die Illumina-Technologie getestet werden. Obwohl letzteres Verfahren noch in der Testphase ist, konnte bereits ein deutlicher Zeitgewinn festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, dauert die genetische Charakterisierung von 10-15 Viren mittels der *cycle sequencing*-Methode 9-10 Monate. Neben der Virusvermehrung, RNA-Präparation und cDNA-Synthese nimmt die Amplifikation der Fragmente sowie deren Aufreinigung viel Zeit in Anspruch. Für die Generierung von 8 Elektropherogrammen müssen 3 h eingeplant werden. Die Auswertung der Rohdaten ist ebenfalls sehr aufwendig, da jede Base im Elektropherogramm überprüft wird. Mittels der

Illumina-Technologie ist die Sequenzierung von 12 Viren innerhalb von ~ 3 Monaten möglich. Innerhalb dieser Zeitspanne erfolgten Plaqueaufreinigung (3 Wochen), Plaquevermehrung und RNA-Präparation (4 Wochen), Herstellung der Banken (2 Wochen), Sequenzierung (1 Woche) sowie die Auswertung der Daten (1 Woche). Die Anzahl an zu sequenzierenden Viren kann durch die Verwendung der Illumina-Methode mindestens verdreifacht werden.

Die Illumina-Technik wird nicht die letzte Sequenziermethode zur Charakterisierung von Influenzagenomen sein. Schon jetzt wird die NGS modifiziert und weiterentwickelt. In den nächsten Jahren werden die Next-Next-(3rd) Generation-Verfahren zur Marktreife gelangen. Die zukünftigen Methoden werden Abschied von der Klonierung und PCR nehmen und sich auf die Einzelmolekül-Sequenzierung konzentrieren (Hankeln et al., 2009). So wird bei der *nanopore sequencing*-Methode eine gentechnisch modifizierte Hämolyisin-Pore verwendet. Durch die Messung des Kaliumionenstromes, welcher der DNA/RNA beim Porendurchtritt entgegenfließt, lassen sich die vier Nukleotide durch ihren charakteristischen Stromfluss voneinander unterscheiden (Hankeln et al., 2009). Die Einzelmolekül-Sequenzierung von Helios (Ozsolak et al., 2009) ermöglicht eine direkte Sequenzierung von RNA-Molekülen ohne vorherige Transkription in cDNA. Fragmentierte 3'-polyadenylierte RNA-Moleküle binden im ersten Schritt an die Poly(dT)-Oligos einer *flow cell*. Anschließend wird analog der Illumina-Technologie die RNA über die Synthese des Gegenstranges sequenziert (*sequencing by synthesis*). Dieses Verfahren bietet eine schnelle und einfache Probenaufbereitung, Schritte der cDNA-Generierung sowie der Fragmentamplifikation fallen weg. Desweiteren ist die Methode auf sehr geringe Ausgangsmengen ausgelegt. Dadurch können auch Patientenstämme, welche sich nicht in Zellkultur anzüchten lassen, genotypisch charakterisiert werden.

5.2. Evolution der europäischen Schweineinfluenzaviren

In der vorliegenden Arbeit stand die phylogenetische Analyse von europäisch porzinen Influenzaviren im Vordergrund. Um die Verwandtschaftsverhältnisse unter den Viren besser beurteilen zu können, wurden Vertreter der bisher bekannten Genotypen in die Analyse einbezogen. Über die Alignments erfolgte ein Vergleich der Sequenzdaten bezüglich potentieller Virulenzfaktoren, Trunkierungen, Glykosylierungssequons und Resistenzmutationen. Darüber hinaus wurden die Stammbäume auf Hinweise nach Transspeziesinfektionen und Reassortierungen hin untersucht.

Im Folgenden ist die Entstehung der in Europa zirkulierenden porzinen Influenzavirussubtypen kurz erläutert und in Abbildung 48 zusammengefasst.

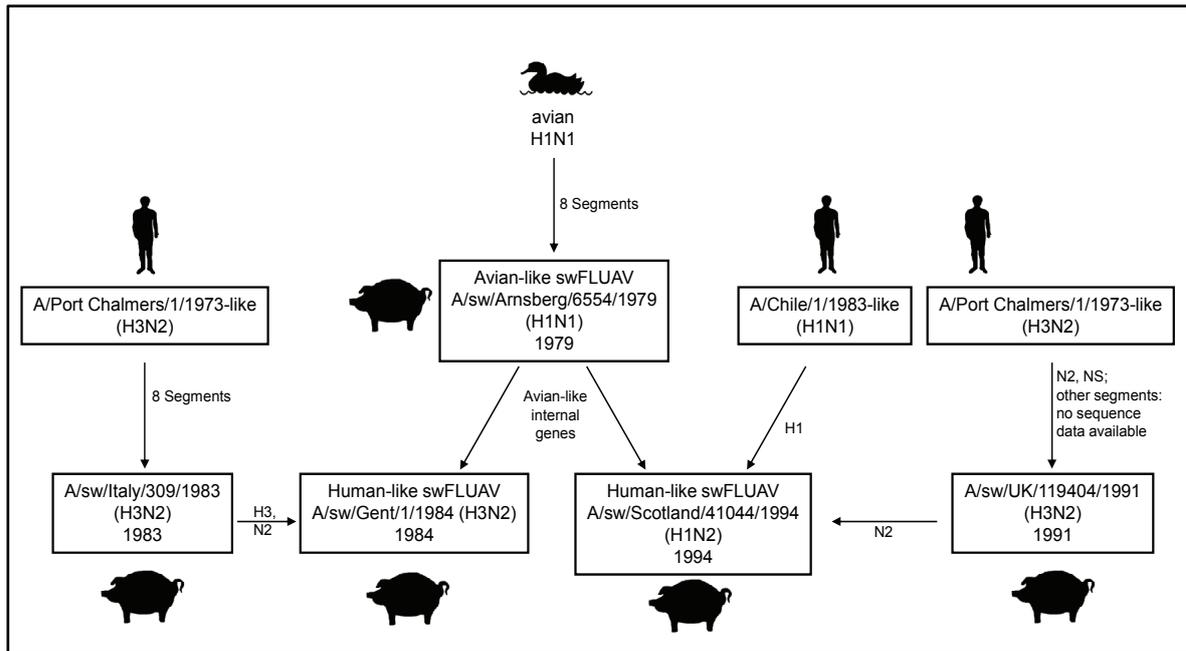


Abb. 48: Transspeziesinfektionen und Reassortierungsereignisse, die zur Entstehung der europäischen porzinen H1N1-Viren (*avian-like*) sowie der europäischen porzinen H3N2- und H1N2-Viren (*human-like*) geführt haben

5.2.1. Entstehung des porzinen *avian-like* H1N1-Subtypes

1979 wurden aus infizierten Schweinen Influenza-A-Viren isoliert, die keine Ähnlichkeit zu den bis dato bekannten *classical swine*-Viren besaßen. Die Ergebnisse durchgeführter Hämagglutinationshemmteste wiesen auf eine enge Verwandtschaft zu aviären Viren aus Deutschland und Nordamerika hin (Pensaert et al., 1981). Aufgrund der hohen genetischen Distanz dieser Viren zu den vorwiegend in Nordamerika zirkulierenden *classical swine*-Viren wurde die Einführung einer neuen Linie vorgeschlagen (Scholtissek et al., 1983). Durch spätere Analysen bestätigt, sind die als *avian-like* bezeichneten H1N1-Viren aviären Ursprungs (Abb. 48, Campitelli et al., 1997; Brown et al., 1997). In den Stammbäumen dieser Arbeit wird der „Ursprung“ dieser Linie durch die Arnsberger-Isolate dargestellt (Abb. 48). In allen acht Segmenten weisen diese Viren enge Verwandtschaft zu den eurasischen Vogelviren auf. Die porzinen *avian-like* H1N1-Viren sind weiterhin in der europäischen Schweinepopulation nachzuweisen, was auf eine effektive und kontinuierliche Infektionskette hindeutet.

5.2.2. Entstehung der porzinen *human-like* H3N2-Linie

In den 1970er und 1980er Jahren zirkulierten in Italien porzine Viren, deren gesamtes Genom humanen Ursprungs war (Castrucci et al., 1993). Desweiteren wurden sowohl in Italien als auch in Frankreich und Belgien Viren isoliert, welche Segmente der *avian-like*

H1N1-Linie (interne Segmente) sowie die der humanen H3N2-Viren (HA und NA) in sich trugen (Castrucci et al., 1993; Madec et al., 1984; Haesebrouck et al., 1985). Diese durch Reassortierung entstandene Viruslinie wird als *human-like* H3N2 bezeichnet. Das Isolat A/sw/Gent/1/84 wird bei phylogenetischen Analysen oft als Referenz für diese Ereignis angegeben (Kuntz-Simon und Madec, 2009). Auch die in dieser Studie sequenzierten H3N2-Isolate gehen auf dieses Ereignis zurück. Wie den Abbildungen 21, 25 und 28 zu entnehmen ist, clustern die internen Segmente von A/sw/Gent/1/84 mit denen europäisch porziner H1N1-Viren. HA und NA weisen dagegen genetische Ähnlichkeiten zu humanen H3N2-Viren (A/Port Chalmers/1/73-like) auf (Abb. 24 und 27). Die gleiche Konstellation konnte auch bei folgenden drei H3N2-Viren ermittelt werden: A/sw/Potsdam/35/82, A/sw/Leipzig/145/92 und A/sw/Karrenzien/2/96. Die Sequenzen des Hämagglutinins und der Neuraminidase clustern mit den Sequenzen humaner H3N2-Stämme (Abb. 24 und 27), die der internen Segmente mit *avian-like* H1N1-Viren der Jahre 1981 bis 1999 (Abb. 21, 22, 25, und 28). Im Gegensatz zu dem Isolat A/sw/Gent/1/84 sind die Sequenzen der Oberflächenproteine der drei Viren innerhalb der humanen H3N2-Linie zu finden. Diese Ergebnisse zusammen mit der fehlenden Monophylie zu den porzinen H3N2-Viren sprechen für mehrere unabhängige Reassortierungsereignisse. Damit kann das Isolat A/sw/Potsdam/35/82 als möglicher Ursprung für die *human-like* H3N2-Linie ausgeschlossen werden, auch wenn es der älteste Stamm mit dieser genetischen Konstellation ist.

5.2.3. Entstehung der *human-like* H1N2-Linie

Parallel zum Auftreten der H3N2-Linie wurden 1987 in französischen Schweinen Viren des Subtyps H1N2 nachgewiesen (Gourreau et al., 1994). Bis auf das NA stammten alle Segmente von den *avian-like* H1N1-Viren ab. Die Sequenz der Neuraminidase wurde als *human-like* H3N2 identifiziert. Eine Zirkulation dieser Viren konnte in den folgenden Jahren nicht mehr beobachtet werden. Man schließt daraus, dass sich keine stabile Infektkette ausbildete und diese Linie deshalb ausgestorben ist. Sieben Jahre später (1994) wurde abermals der Subtyp H1N2 nachgewiesen. Die in Großbritannien isolierten Viren wiesen ein HA humaner H1N1-Viren auf. Das NA-Segment stammte von humanen H3N2-Viren ab. Die internen Segmente wurden als *avian-like* H1N1 identifiziert (Brown et al., 1998). Dieser neue Virustyp der *human-like* H1N2-Linie breitete sich schnell innerhalb europäischer Schweinepopulationen aus (Van Reeth et al., 2000; Marozin et al., 2002; Schrader und Suss 2003; Maldonado et al., 2006).

5.2.4. Hinweise auf Transspeziesinfektionen

Für die Entstehung neuer Linien und Subtypen ist oft eine speziesübergreifende Infektion verantwortlich. Transspeziesinfektionen werden immer wieder beobachtet, wobei bestimmte Spezieswechsel häufiger vorkommen als andere. Seit dem Auftreten der Vogelgrippe werden regelmäßig H5N1-Infektionen beim Menschen nachgewiesen (WHO; Brooks et al., 2009; Abdel-Ghafar et al., 2008). Beispielhaft sei das Isolat A/Indonesia/CDC759/06 (H5N1) erwähnt (Abb. 20). Auch die Übertragungen von porzinen Viren auf den Menschen sind nicht selten (Claas et al., 1994; de Jong et al., 1986; Gregory et al., 2003). Die Infektionen verlaufen jedoch in den meisten Fällen subklinisch und daher gibt es nur wenige Isolate. Der Nachweis erfolgt dann meist über serologische Methoden. Hinweise auf eine Schwein→Mensch-Infektion liefern die Sequenzdaten der Viren A/Thailand/271/1005 (H1N1), A/Philippines/344/2004 (H1N2) und A/HongKong/1774/99 (H3N2) (Abb. 21-24, 26-30). Eine zoonotische Übertragung von Mensch→Schwein konnte bei humanen H1N1- und H3N2-Viren jedoch nicht bei H2N2 beobachtet werden (Shope, 1938; Katsuda et al., 1995; Nerome et al., 1982; Castrucci et al., 1993; Ottis et al., 1982). In dieser Studie stellt das Isolat A/sw/Finisterre/127/99 (H3N2), welches von einem humanen H3N2 Virus abstammt, einen Vertreter der Mensch→Schwein-Infektion dar (Abb. 25). Virusübertragungen zwischen Schweinen und Vögeln sind ebenfalls möglich. So geht die Entstehung der *avian-like* H1N1-Linie auf eine Vogel→Schwein-Infektion zurück. Weitere Nachweise solcher Infektionen liefern Studien aus Nordamerika, Afrika und Asien (Guan et al., 1996; El-Sayed et al., 2010; Karasin et al., 2000; Lee et al., 2009). Die Übertragung von Schweineviren auf Vögel wurde zuletzt in den 80er und 90er Jahren beobachtet (Ludwig et al., 1994; Wood et al., 1997). Die M-Sequenz von A/turkey/Germany/3/91 (H1N1) innerhalb der europäisch porzinen Viren weist auf eine Wiedereinführung des *avian-like* H1N1-Virus in Vögeln (Truthahn) hin (Abb. 28, Ludwig et al., 1994). In die phylogenetischen Analysen wurden auch die Sequenzen eines Wildschweinvirus einbezogen. Im Rahmen von serologischen Studien konnten Antikörper gegen porzine Viren der *avian-like* H1N1- und *human-like* H3N2-Linie im Wildschwein nachgewiesen werden (Kaden et al., 2008). Die hier verwendeten Wildschwein-Sequenzen von 2006 sind aufgrund folgender Beobachtungen jedoch kritisch zu betrachten. Die verfügbaren HA-, NP-, NA-, M- und NS-Sequenzen sind nahezu identisch zum porzinen Virusisolat A/sw/Bakum/909/93 (H3N2), welches 13 Jahre früher isoliert wurde (Abb. 28). Desweiteren zeigen die Stammbäume, dass kein Influenzavirus über einen so langen Zeitraum diese hohe genetische Stabilität bewahren kann. Die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Influenzaviren ($0,6 \times 10^{-6}$ Mutationen/Nukleotid) stützt diese Beobachtungen (Nobusawa und Sato, 2006).

5.2.5. Nachweis von Reassortierungen

Neben den bereits beschriebenen Reassortanten A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2), A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2) und A/sw/Karrenzien/2/96 (H3N2) konnten weitere Hinweise auf Reassortierungen detektiert werden. Erwähnenswert sind die H1N2-Isolate A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 und A/sw/Doetlingen/IDT4735/05. Anhand der Phylogramme ist erkennbar, dass sowohl das HA als auch die internen Segmente mit den europäisch porcinen Viren clustern. Das Neuraminidase-Gen hingegen weist *human-like* H3N2-Sequenzen auf und gruppiert folglich bei den europäisch porcinen H3N2-Viren (Abb. 27C). Das Virus A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 vom Subtyp H3N2 stellt eine Reassortante aus *human-like* H3N2- und H1N2-Stämmen dar. Die Virusisolate A/sw/Germany/SEK1178/00 (H1N2) und A/sw/Italy/66945/06 (H3N1) sind hinsichtlich ihrer HA-Segmente reassortiert (Abb. 23 und 24). In Tabelle 28 sind ausgewählte Beispiele für Reassortierungen aufgelistet. Bisher wurden Beispiele, die die Oberflächenproteine HA und NA betreffen, beschrieben. Dass auch interne Segmente ausgetauscht werden können, belegen folgende Beispiele: das PA des H3N2-Isolates A/sw/Bondelum/IDT5959/07 clustert im Gegensatz zu den restlichen Segmenten mit dem PA von H1N1-Stämmen. Bei den H1N1-Viren A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06 und A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 ist das NP-Segment betroffen, welches mit den NP-Sequenzen europäisch porciner H3N2-Viren clustert. Beispiele für M- und NS-Reassortierungen finden sich in den Sequenzen der Viren A/sw/Stadtlohn/IDT3853/06 (H1N2) und A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2) (Tab. 28). Das NS von A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) weist mindestens zwei Genvarianten auf. Die über Plaquetest aufgereinigten Viren zeigten unterschiedliche NS-Sequenzen, welche nach der phylogenetischen Analyse in verschiedenen Clustern zu finden waren. Ob es sich dabei um ein Laborartefakt handelt, oder ob die aus dem Schwein isolierte Probe tatsächlich zwei im NS-verschiedene Virusisolate enthielt, bleibt unklar. Die Beispiele zeigen, dass für eine phylogenetische Untersuchung alle acht Segmente von Bedeutung sind. Je mehr Sequenzdaten zur Verfügung stehen, desto deutlicher treten Reassortierungen hervor, welche eine entscheidende Rolle in der Weitergabe von Resistenzmutationen und der Entstehung neuer Linien spielen. Die Fülle derartiger Ereignisse weist auch auf ein reges Geschehen innerhalb der europäisch porcinen Viren hin. Die Erstellung einer Genotypformel reicht für den Nachweis von Reassortierungen meist nicht aus. Die eben genannten Beispiele betreffen Segmente, die einem gemeinsamen Genotyp zugeordnet waren. Nur durch den Vergleich der Stammbäume untereinander konnten diese Reassortierungen ermittelt werden.

Tab. 28: Hinweise auf Reassortierungen ausgewählter Beispiele europäisch porziner Influenzaviren

Virusstamm (Subtyp)	Segment							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
DT7 A/sw/Dötlingen/IDT4735/05 (H1N2)	H1N2	H1N1/H3N2?	H1N1/H3N2?	H1N2	H3N2	H3N2	H1N2	H3N2
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2)	H1N2	H1N1/H3N2?	H1N1/H3N2?	H1N2	H3N2	H3N2	H1N2	H3N2
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1)	H3N2	H1N1/H3N2?	H3N2	H1N1	H1N1	H1N1	H1N1	H1N1
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2)	H3N2	H1N2	?	H3N2	H3N2	H1N2	H3N2	?
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2)	H1N1	H1N1	H1N1	H1N2	H1N1	H1N2	H1N1	H1N1
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1)	H3N2	?	H3N2	H1N1	?	H1N1	H1N1	H1N1
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2)	H3N2	H3N2	H3N2	H3N2	H1N1	H3N2	H3N2	H1N1
DT60 A/sw/Stadthorn/IDT3853/05 (H1N2)	H1N2	H1N2	H1N2	H1N2	H1N2	H1N2	H3N2	H1N1
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2)	H1N1	H3N2	H1N1	H3N2	H1N1?	H3N2	H1N1	H1N1
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2)	H3N2	H3N2	H1N1	H3N2	H3N2	H3N2	H3N2	H3N2
DT86 A/sw/Borgentreich/ IDT4858/06 (H3N2)	H1N1	H3N2?	H1N1/H1N2?	H3N2	H1N1	H3N2	H1N1	H1N1/H3N2?
DT92 A/sw/Daseburg/ IDT5022/06 (H3N2)	H1N1	H3N2?	H1N1/H1N2?	H3N2	H1N1	H3N2	H1N1	H1N1/H3N2?
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1)	H1N2?	H3N2	H3N2	H1N1	H1N1	H1N1	H1N1	H1N1
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)	H3N2	H3N2?	H3N2	H3N2	H3N2	H3N2	H1N1	H1N2
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1)	H1N2	H1N1	H1N2	H1N1	H1N2	H1N1	H1N2	H1N1/H1N2?
DT127 A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06 (H1N1)	H1N1	H1N1?	H1N1	H1N1	H3N2	H1N1	H1N1	H1N1
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1)	H1N1	H1N1?	H1N1	H1N1	H3N2	H1N1	H1N1	H1N1
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2)	H1N1	H1N1	H1N2	H1N2	H1N1?	H1N2	H1N2	H1N1/H1N2?

Farbkodierung: grün: avian-like H1N1 Linie; blau: human-like H1N2 Linie; rot: human-like H3N2 Linie; weiß hinterlegt: Zuordnung nicht sicher;

?: Eingruppierung nicht sicher möglich

5.2.6. Segmentspezifische Auswertung

Neben den phylogenetischen Analysen wurden die Sequenzen der jeweiligen Segmente untereinander verglichen und auf Gemeinsamkeiten, Virulenzmarker, Trunkierungen und Glykosylierungssequenzen hin untersucht.

I. PB2

Die basische Polymerase stellt eine der Hauptdeterminanten in der Kontrolle der Pathogenität dar. Als Virulenz-beeinflussend wurden die Mutationen E158G, E627K, D701N sowie S714R beschrieben (Labadie et al., 2007; Naffakh et al., 2000; Gabriel et al., 2005, 2006; Zhou et al., 2011). Sowohl die aktuell veröffentlichte AS-Substitution E158G, welche mit erhöhter Mortalität und Morbidität assoziiert wird, als auch die Mutation S714R konnten bei den 191 untersuchten PB2-Sequenzen nicht nachgewiesen werden. Der AS-Austausch E627K bewirkt eine Steigerung der Polymeraseaktivität sowie die Adaption aviärer Viren an Säugetierzellen (Labadie et al., 2007; Naffakh et al., 2000). In der aktuellen Studie war diese Mutation innerhalb der eurasisch porzinen Viren des Genotyps F nicht detektierbar. Lediglich die Genotyp A und B vertretenden Stämme wiesen diese Substitution auf. Es ist also fraglich, ob die E627K-Mutation generell zu einer Erhöhung der Polymeraseaktivität führt. Schließlich ist eine Adaption des aviären H1N1 in den porzinen Zellen eine Voraussetzung für eine effiziente Replikation. Eine gesteigerte Virulenz sowie eine verbesserte Interaktion des PB2 mit Importin α wurde bei der Mutation D701N beobachtet (Gabriel et al., 2005, 2008). 120 Viren der eurasisch porzinen Linie wiesen diese AS-Substitution auf. Ob diese Mutation in den porzinen Virusstämmen die gleichen Effekte auslösen, die in den Studien beschrieben werden, ist nicht bekannt.

Bei der Auswertung des Stammbaumes sowie dem Vergleich der Sequenzen konnten die folgenden Aminosäuren Clustern zugeordnet werden: A105, A178, Y127 und S453. Innerhalb des A105-Zweiges fiel auf, dass das älteste Isolat vom Subtyp H3N2 (2005) ist, gefolgt von H1N1 (2006) und H1N2 (2006/07). Weitere Sequenzdaten sind nötig, um einen genaueren Einblick über den Ursprung dieser Mutation zu erhalten.

II. PB1-F2

Das als Virulenzfaktor kontrovers diskutierte Protein PB1-F2 umfasst eine Länge von 79-90 Aminosäuren. Durch die Anreicherung des Proteins in den Mitochondrien wird - bedingt durch den Cytochrom C-Austritt - die Apoptose der Zelle induziert (Chen et al., 2001; Yamada et al., 2004; Zamarin et al., 2005). Dieser Prozess wurde vorwiegend in den Lymphozyten, Monozyten und Alveolarmakrophagen beobachtet (Modrow et al.,

2010). Desweiteren konnten Interaktionen zwischen PB1 und PB1-F2 ermittelt werden, welche in einer gesteigerten Polymeraseaktivität resultierten (Mazur et al., 2008; Modrow et al., 2010). Aktuelle Studien weisen auf ein Zelltyp- und Virusstamm-spezifisches Phänomen des PB1-F2 hin (McAuley et al., 2010; Hai et al., 2010). Während die meisten aviären Viren über ein funktionsfähiges PB1-F2-Protein verfügen, treten bei humanen und porzinen Viren durch den Einbau von Stopcodons verkürzte Formen des Proteins auf. In Abbildung 21 sind die Trunkierungen im PB1-F2 mit einem Stern markiert. Mittels der Sequenzdaten wurden Stopcodons nach der 8., 11., 18., 24., 34., 37. und 57. Aminosäure detektiert. Diese Trunkierungen betrafen humane Stämme, *classical swine*-Viren, die pandemischen A/H1N1v-Isolate sowie einige eurasisch porzine Viren. Innerhalb der letztgenannten Linie waren vor allem H1N1- und H3N2-Viren betroffen. Trunkierungen bei H1N2-Isolaten konnten hier nicht festgestellt werden, treten aber vereinzelt auf (A/sw/Cotes dAmor/2433/98 (H1N2), Daten nicht gezeigt). Desweiteren zirkulieren unter den porzinen Viren aus Eurasien Stämme, die über ein mutiertes Startcodon verfügen (M→T; A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2), A/sw/Spain/33601/01 (H3N2); A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)). Der Großteil der in dieser Arbeit analysierten Viren verfügt über ein 90 AS langes Protein. Weitere funktionsfähige PB1-F2-Varianten besitzen eine Länge von 79, 81 und 87 Aminosäuren. Erstmals konnte in vier deutschen H1N1-Isolaten ein 101 AS langes Protein nachgewiesen werden (A/sw/Friesoythe/IDT5549/06, A/sw/Kassel/IDT5550/06, A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 und A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06). Ob sich die Verlängerung des Proteins um 11 AS auf dessen Funktion positiv oder sogar negativ auswirkt, müsste in weiterführenden Studien geklärt werden. Weitere Sequenzdaten werden zeigen, ob es sich um ein einmaliges Ereignis handelt, oder ob sich diese Variante durchzusetzen vermag.

Die Aminosäure 66 des PB1-F2 wurde ebenfalls als Virulenzfaktor identifiziert: der Austausch N→S verursachte in infizierten Mäusen eine Steigerung der Morbiditäts- und Mortalitätsrate (Conenello et al., 2007). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Mutation die frühe Interferon-Antwort *in vivo* inhibiert (Conenello et al., 2011). Eine Rückmutation (S→N) hingegen führt zur Bildung attenuierter Viren (Modrow et al., 2010). Innerhalb der eurasisch porzinen Viren dieser Studie konnte die Mutation N66S bei folgenden 5 Isolaten nachgewiesen werden: A/sw/Chonburi/NIAH589/05 (H1N1), A/sw/Chachoengsao/NIAH587/05 (H1N1) sowie die europäischen Schweineviren A/sw/England/WVL7/92 (H1N1), A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2) und A/sw/Müslingen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2). Eine Clusterung dieser Stämme wurde nicht verzeichnet. Zur Virulenz dieser Viren liegen keine Angaben vor. Ob die Mutation in den eben genannten Viren die gleichen Effekte erzielt, bleibt zunächst ungeklärt.

III. PA

Das auf Segment 3 kodierte PA-Protein ist für die virale Transkription und Translation sowie für eine effiziente Kernakkumulation der PB1-Proteine von essentieller Bedeutung. Desweiteren fungiert das PA als Helikase und Protease. Folgende im PA von A/WSN/33 eingeführte Virulenz-bestimmende Mutationen waren innerhalb der hier untersuchten Sequenzen (n=201) nicht nachweisbar: K102A, D108A, K134A und H510A. Die für diese Substitutionen beschriebenen Effekte sind der Tabelle 2a (Seite 22) zu entnehmen. Die Mutation S224P, welche mit erhöhter Virulenz und Replikation in Verbindung gebracht wird (Song et al., 2011), wurde nur im pandemischen A/H1N1v-Isolat A/California/4/09 detektiert. Eine gesteigerte Polymeraseaktivität in Entenzellen ermöglicht der Austausch von N→D an Position 383 (Song et al., 2011). Diese Substitution konnte in 198 von 201 Stämmen nachgewiesen werden. Ausnahmen bilden die humanen H3N2-Viren A/Port Chalmers//73, A/Moscow/10/99 und A/Wellington/1/04. Die Mutation T97I wurde nach Vermehrung aviärer Viren auf Säugetierzellen identifiziert (Song et al., 2009). Isoleucin an jener Position konnte für die H1N1-Viren A/sw/Belzig/2/01 und A/sw/Laer/IDT3893/05 bestätigt werden. Bei dieser Substitution scheint es sich um zwei unabhängige Ereignisse zu handeln, da die Viren in verschiedenen Clustern zu finden sind. Desweiteren konnte sich die Mutation innerhalb der eurasisch porzinen Linie nicht etablieren. Analog zu dem PB2- und PB1-Segment können keine Aussagen über den Einfluss der vorwiegend in aviären Viren identifizierten Virulenzmarker getroffen werden.

Innerhalb der eurasischen Linie fällt ein Cluster mit 15 H1N2-Stämmen auf. Diese unterscheiden sich anhand der Aminosäuren T330, K615, T438 und L441 von den restlichen Viren des Genotyps I. Auch in den anderen Segmenten weisen diese Viren aus den Jahren 2003-2005 eine hohe genetische Identität untereinander auf. Eventuell handelt es sich um eine eigenständige Linie innerhalb der eurasisch porzinen Viren. Die letzt genannte Aminosäure kann mit drei weiteren Clustern in Verbindung gebracht werden. Die I441-, R441- und V441-Zweige enthalten stets porzine H3N2-Viren. Ob dieser Beobachtung eine signifikante Bedeutung zu kommt, könnten weitere Sequenzdaten zeigen.

IV. HA

Neben der phylogenetischen Analyse der 132 Schweineinfluenzaviren wurden die Sequenzen entsprechend des HA-Subtyps hinsichtlich ihrer Rezeptorbindungsstellen und Glykosylierungssequenzen sowie auf zweigbildende Mutationen hin untersucht. Die Ergebnisse der Analysen können den Tabellen A4 bis A7 des Anhangs sowie den Abbildungen 24 und 25 entnommen werden.

HAH1

Die Aminosäurepositionen 108, 150, 167, 197, 208, 240 und 242 des HAH1s wurden als Rezeptorbindestellen identifiziert (Nobusawa et al. 1991). Bis auf die Positionen 150 und 208 sind diese in allen hier untersuchten Viren hochkonserviert. Die AS T150 ist innerhalb der porzinen *avian-like* H1N1- und der *human-like* H1N2-Viruslinie stabil (Ausnahme: A/sw/England/690421/95 (H1N2): S150). Lediglich die humanen Viren A/New Caledonia/20/99 (H1N1) und A/Michigan/2/2003 (H1N2) sowie die zu diesen Viren clusternden porzinen H1N2-Stämme A/sw/Oklahoma/032726/08, A/sw/Minnesota/SG-00239/07 und A/sw/Ontario/5538/04 kodieren anstelle eines Threonins für die AS Serin. Die zweite Rezeptorbindestelle, die durch ihre Variabilität aufgefallen ist, liegt an Position 208. Die Vogelviren der Genotypen 1C und 1D sowie die porzinen *avian-like* H1N1-Viren mit Ausnahme von A/sw/Greven/IDT2889/04 (I208) und A/sw/Wohlerst/IDT4039/05 (I208) kodieren für die AS Leucin. Im Vergleich dazu besitzen die humanen Stämme A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) und A/Singapore/6/96 (H1N1) sowie die Viren der porzinen *human-like* H1N2-Linie ein Isoleucin an Position 208. Sonderfälle sind in den Isolaten A/sw/England/690421/95 und A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 der *human-like* H1N2-Linie zu finden, bei denen die Aminosäuren Threonin bzw. Methionin nachzuweisen waren. Eine weitere rezeptorbindungsspezifische Position betrifft die AS 204 (entspricht AS 190 im HAH3). Glutaminsäure an dieser Position wird mit einer verbesserten Bindung an aviäre Rezeptoren assoziiert, Asparaginsäure mit humanen Rezeptoren (Glaser et al., 2005; Matrosovich et al., 2000). Innerhalb der 139 Sequenzen kodieren wie zu erwarten die aviären Isolate sowie der Virusstamm A/sw/Netherlands/3/80 (H1N1) für Glutaminsäure. Die meisten europäischen Schweineinfluzaviren der *human-like* H1N2- aber auch der *avian-like* H1N1-Linie verfügen über Asparaginsäure und zeigen somit eher eine Spezifität zu humanen Rezeptoren. Die Substitution E204D stellt damit eine Adaption von $\alpha(2,3)$ - an $\alpha(2,6)$ -Rezeptoren dar. In zwei Fällen (A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1) und A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1)) wurde ein Asparagin an Position 204 identifiziert. Desweiteren war auch die AS Valin in zehn Stämmen der *avian-like* H1N1-Linie nachweisbar. Eine Clusterung konnte jedoch nicht verzeichnet werden. Welche Rolle das Valin und Asparagin, die durch einen einzelnen Nukleotidaustausch aus Asparaginsäure entstehen können, bezüglich der Rezeptorspezifität haben, bleibt vorerst unbeantwortet. Die Aminosäuren Q240 und G242 (= AS 226 und 228 im HAH3) sprechen für eine hohe Bindungsaffinität an $\alpha(2,3)$ -glykosidisch verknüpften Sialinsäuren und damit für aviäre Rezeptoren. Wie zu erwarten, kodieren die Vogelviren und die porzinen *avian-like* H1N1-Viren für Glutamin und Glycin an den Positionen 240 und 242. Aber auch die humanen Viren und die *human-like* H1N2-Schweineviren verfügen über diese Kombination. Die Ergebnisse zusammen mit den Befunden der AS 204 zeigen, dass die hier untersuchten Schweineviren Rezeptorspezifitäten sowohl für humane als auch für

aviäre Rezeptoren verfügen. Dies geht mit der Tatsache einher, dass im Schwein Rezeptoren für humane und aviäre Inflenzaviren exprimiert werden.

Die an den Rezeptorbindestellen angrenzenden AS zeichnen sich durch eine hohe Variabilität aus. Erwähnenswert ist die Position 106, welche entweder für die AS Alanin, Threonin oder Isoleucin kodiert. Während letztgenannte Aminosäure ausschließlich bei den porzinen *human-like* H1N2-Viren (Genotyp 1B) nachzuweisen war, kodieren die *avian-like* H1N1-Viren (Genotyp 1C) für die Aminosäuren Threonin und Alanin (Abb. 24). Der Übergang von T→A fand laut dieser Untersuchung 1999 statt. Die Verteilung der Ile- bzw. Thr/Ala-tragenden Viren zeigt, dass die AS 208 einen Hinweis auf den Ursprung und den Genotyp des eurasisch porzinen Virusstammes geben kann. Zu den angrenzenden AS zählt auch die Position 147. Diese fällt durch das Vorhandensein einer Deletion bei 19 porzinen H1N2-Viren sowie drei humanen H1N1-Stämmen des Genotyps 1B auf (Abb. 24; Tab. A4). Das HA der porzinen H1N2-Viren hat seinen Ursprung in den humanen Viren des Subtyps H1N1. Durch solch ein Reassortierungsereignis könnte auch die Deletion in die *human-like* H1N2-Linie eingebracht worden sein. Das in dieser Analyse älteste Isolat (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) stammt aus dem Jahre 1934, gefolgt von A/sw/Italy/1521/98 (H1N2). Zwölf der 16 europäischen Schweineviren (2003 bis 2005) bilden ein Cluster und könnten eine eigene genetische Linie darstellen. Die H1N2-Viren A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05, A/sw/Doettingen/IDT4735/05, A/sw/Gent/7625/99 und A/sw/Italy1521/98 liegen außerhalb des eben beschriebenen Clusters. Die Deletion ist vermutlich mehrfach unabhängig entstanden. Weitere Sequenzdaten werden darüber Aufschluss geben können.

Erwähnenswert ist auch das Glykosylierungssequon an Position 177 (entspricht AS 163 im HAH3), welche für humane Stämme charakteristisch ist. Ein Verlust dieser Glykosylierungsstelle führt zu einer verminderten Wirkung von Neuraminidaseinhibitoren (Mishin et al., 2005). Wie zu erwarten, weisen die *human-like* H1N2-Stämme dieser Studie das Glykosylierungssequon auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den *avian-like* H1N1-Viren kein entsprechendes Sequon detektiert werden. Aufgrund des Verlustes der Glykosylierungsstelle 177 hätten die porzinen *avian-like* Viren gegenüber den *human-like* Viren einen Selektionsvorteil bei der Behandlung mit NA-Inhibitoren.

HAH3

Innerhalb der 96 untersuchten europäischen Schweineinflenzaviren zeigen die Aminosäuren der Rezeptorbindungsstellen Y98, G134, S136, W153, H183, Y195 und R224 keine Veränderungen. Die Positionen 135, 137, 155, 190 und 226 der Rezeptorbindungsregion sind durch den Einbezug der Referenzen als variabel identifiziert. Innerhalb der europäischen porzinen Linie weisen die Positionen jedoch eine hohe Stabilität auf. (Tab. A6). Die AS 137 bildet eine Ausnahme. Bei sechs europäisch

porzinen Isolaten wurde anstelle von Serin ein Asparagin detektiert. Bei den H3N2-Viren A/sw/Potsdam/35/82 und A/sw/Leipzig/145/92 handelt es sich um die bereits erwähnten Reassortanten, welche innerhalb der humanen Linie clustern (Abb. 24). Die Isolate A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2) und A/sw/Muesleringen-Stolzenau/IDT4236/05 (H3N2) sind neben A/sw/Gent/1/84 (H3N2) und A/sw/Ukkel/1/84 (H3N2) die einzigen Schweineviren aus Europa die für Asparagin kodieren. Neben den eben genannten europäischen Schweineviren verfügen folgende Typ-3A-Viren ebenfalls über Asparagin an Position 137: A/duck/Chabarovsk/1610/72 (H3N8), die humanen H3N2-Viren A/Port Chalmers/73, A/HongKong/1/68 und A/HongKong/1774/99 sowie vier in Hongkong isolierte Schweineviren aus den Jahren 1999-2002. Daraus läßt sich schließen, dass die ältesten porzinen H3N2-Viren, welche als *Port Chalmers-like* bezeichnet werden, für Asparagin kodierten. Nach 1984 trat in Europa die Substitution S137N auf. Parallel dazu gelangten porzine *Port Chalmers-like* Viren nach Asien und zirkulierten dort bis 2002. Die Isolate Hertzen und Muesleringen-Stolzenau sind eventuell altertümlich erhalten geblieben und erst 2005 isoliert worden.

Die AS-Position 190 kodiert bei allen porzinen *avian-like* und *human-like* Viren für Glutaminsäure, welche auf eine hohe Affinität zu aviären Rezeptoren ($\alpha(2,3)$ -glykosidische Bindung) der Viren hinweist. Für eine bevorzugte Bindung an humane Rezeptoren ($\alpha(2,6)$ -glykosidisch) sprechen die Aminosäuren Leucin und Serin an den Positionen 226 und 228 (Suzuki et al., 2000), welche in allen hier untersuchten europäisch porzinen H1N1- und H1N2-Viren nachzuweisen waren. Somit verfügen die HAH3- analog den HAH1-Viren über Bindungsmöglichkeiten an aviäre und humane Rezeptoren. Die Daten verdeutlichen, warum den Schweinen in der Evolution und bei der Entstehung neuer potentiell gefährlicher Virustypen eine so bedeutende Rolle zu kommt und warum eine Surveillance der Viren nötig ist.

Bei der Auswertung des HAH3-Stammbaumes fiel die Drei- bzw. Zweiteilung des Phylogramms über die Aminosäuren 219 bzw. 364 auf. Der Austausch von T219I konnte jedoch nur innerhalb der europäischen Schweinelinie festgestellt werden und trat erstmals 1993 auf. Die Daten deuten somit auf zwei parallel zirkulierende Linien hin. Die Substitution T/I219M betrifft vier Stämme aus dem Jahr 2006. Drei davon stammen aus einer Schweinepopulation in Herzlake, das vierte Isolate aus dem 22,5 km entfernten Hamstrup. Die Daten deuten eher auf ein Cluster hin. Weitere Sequenzdaten europäischer H3N2-Viren werden zeigen, ob sich eine weitere Linie etabliert. Die Zweiteilung des Stammbaumes wird durch die Substitution D364N determiniert. Über Asparaginsäure verfügen die Viren der Genotypen 3B, 3C, 3D und 3F sowie 32 Virusisolate vom Typ 3A. Letzteres beinhaltet die nordamerikanischen porzinen Tripel-Reassortanten und humane H3N2-Viren sowie eurasisch porzine Viren der Jahre 1984-2005 (Abb. 24). Das älteste Isolat (A/sw/Jena/5/96 (H3N2)) mit Asparagin an Position 364

stammt aus dem Jahre 1996. Analog der AS 219 könnte die AS 364 zwei parallel zirkulierende genetische Linien determinieren.

V. NP

Das Nukleoprotein bildet die Hauptproteinkomponente der Nukleokapside und dient unter anderem als Shuttle-Protein für den Transport viraler RNA. Die AS-Substitution A184K, welche in allen 201 untersuchten NP-Segmenten nachzuweisen war, verursachte in - mit einem rekombinanten hochpathogenen H5N1-Virus - infizierten Hühnern eine frühere Mortalität und bewirkte eine Erhöhung der NO-Konzentration (Wasilenko et al., 2009). Der Austausch N→K an Position 319 wurde in Maus-adaptierten Vogelviren nachgewiesen und bewirkt eine verbesserte Interaktion mit Importin α (Gabriel et al., 2008). Bei der Analyse der Sequenzdaten wurde diese Mutation nur im Pferdeisolat A/equine/Berlin/1/1989 detektiert. Da es sich, wie gesagt, um ein Maus-adaptiertes Vogelvirus handelt, spielt die Substitution N319K in Schweinen höchstwahrscheinlich keine Rolle. Über die von Tada et al. (2011) postulierte AS V105 verfügen sowohl 6 europäische Viren als auch humane und aviäre Virusstämme (Abb. 25). Eine auf diese AS-beruhende Pathogenitätssteigerung konnte bisher nur im H5N1 nachgewiesen werden. Der Einfluss auf porcine und humane Stämme ist unklar.

Die AS 48 nimmt in dieser Studie eine besondere Stellung ein. Während alle Referenzstämme sowie 16 Viren der eurasisch porcinen Linie aus den Jahren 1979-1992 ein Lysin aufweisen, verfügen die restlichen Viren über ein Glutamin. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutation L48Q 1989 erstmalig in der eurasisch porcinen Linie auftrat und nach 1992 eine monophyletische Entwicklung aufweist – vergleichbar mit der AS-Substitution S31N des M2.

VI. NA

Analog dem HA wurde das NA der 132 Schweineinfluenzaviren bezüglich ihrer Rezeptorbindungsstellen und Glykosylierungssequenzen sowie auf zweigbildende Mutationen hin untersucht. Die Ergebnisse der Analysen können den Tabellen A9 bis A12 des Anhangs sowie den Abbildungen 26 und 27 entnommen werden.

NAN1

Das aktive Zentrum sowie die benachbarten AS des NAN1 sind hoch konserviert. Die in dieser Studie einbezogenen Sequenzen weisen keine Unterschiede untereinander auf (Tab. A9). Zur Resistenz gegenüber dem Neuraminidase-Inhibitor Oseltamivir führt die AS-Substitution H→Y an Position 275. Bis auf das Isolat A/England/494/06 (H1N1) konnte diese Mutation innerhalb der hier untersuchten Influenza-A-Viren nicht detektiert werden.

Erst kürzlich wurden durch Stoner et al. (2010) weitere Substitutionen identifiziert, die mit einer reduzierten Oseltamivir-Empfindlichkeit aviärer N1-Viren korrelieren und als Marker dienen könnten: V267I, N307D und V321I. In einer aktuellen Studie zur Suszeptibilität deutscher Schweineviren gegen NA-Inhibitoren wurden unter anderem 80 H1N1-Viren analysiert (Bauer et al., 2011). All diese Virusisolate wurden als Oseltamivir empfindlich getestet, darunter auch die V321I-tragenden Stämme A/sw/Potsdam/15/81 und A/sw/Schwerin/103/89. Das Isolat A/sw/Bakum/5/95 kodiert zusätzlich zu V321I für die Substitution V267I. Die Ergebnisse zeigen, dass die Empfindlichkeit gegenüber Oseltamivir nicht auf einzelne AS-Positionen beschränkt ist und die in Vogelviren detektierten Substitutionen auf Schweineviren nicht übertragen werden können. Mit einer Steigerung der NA-Aktivität wird die Substitution D344N assoziiert (Collins et al., 2009). Dieser Austausch konnte bei den Stämmen des Genotyps 1B, den humanen H1N1-Isolaten A/Berlin/1/08 und A/WSN/33 sowie den Viren des Genotyps 1F beobachtet werden. Eine Ausnahme bilden 9 europäische Schweineviren der Jahre 1979-1992, die anstelle von Asparaginsäure bzw. Asparagin für die AS Tyrosin kodieren (Abb. 26). Collins et al. (2009) vermuten, dass es sich bei der D344N-Substitution in humanen Viren um einen epidemiologischen Vorteil handelt.

Eine Zerteilung der Genotyp 1F-Viren konnte über die Aminosäuren 9 und 210 erfolgen. Isoleucin (AS9) bzw. Asparaginsäure (AS210) -tragende Viren wurden in den Jahren 2003-2006 isoliert. Threonin und Glycin an den Positionen 9 und 210 besitzen Viren aus dem Zeitraum 1979-2004 sowie die 2009 isolierten pandemischen A/H1N1v-Viren. Der NAN1-Stammbaum (Seite 83) weist deutlich auf eine monophyletische Entwicklung der europäisch porzinen Viren hin.

NAN2

Das aktive Zentrum der NAN2-Viren ist hoch konserviert (Tab. A11). Lediglich die AS-Position 372 weist AS-Substitutionen auf. Die humanen H3N2-Viren vor 2008 sowie die porzinen *human-like* H1N2-Viren kodieren mit Ausnahmen von vier Isolaten (vergl. Abb. 27, Seite 85) für die Aminosäure Serin. Gleiches konnte für die nordamerikanischen Tripel-Reassortanten und den davon abgeleiteten Stämmen sowie für die aviären Viren (außer A/quail/Dubai/301/00 (H9N2)) dieser Studie festgestellt werden. Innerhalb der porzinen *human-like* H3N2-Linie ist ein Übergang von Serin zu Leucin zu beobachten. Die ältesten Isolate stammen aus dem Jahre 1992. Die AS Serin konnte nach 2002 in den europäischen H3N2-Viren nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten auf zwei genetische Linien hin, wobei die Leucin-Linie aktuell dominant zu sein scheint. Außerhalb der *human-like* H3N2-Linie kodieren auch die humanen H3N2-Stämme von 2008 und 2009 sowie die H1N2-Isolate A/sw/Morbihan/0028/01,

A/sw/Saraburi/NIAH13021/05, A/sw/Cotes dAmor/0040/07 und A/sw/Cotes dAmor/0111/07, welche innerhalb der *human-like* H1N2-Linie clustern, für L372.

Die Glykosylierungsmuster der NAN2-Sequenzen sind in der Tabelle A11 aufgeführt. Eine Zusammenfassung, aufgeschlüsselt nach Genotypen, bietet Tabelle 23. Der Verlust der Glykosylierungsstelle 146 wird mit einer Steigerung der Virulenz assoziiert (Goto und Kawaoka, 1998). Alle 136 Viren unterschiedlichen Ursprungs und Genotyps verfügen jedoch über ein Glykosylierungssequon und weisen somit auf keine gesteigerte Virulenz hin. Im Gegensatz dazu ließen sich Mutationen an den Positionen 72, 88 und 236 detektieren, welche zu einem Verlust der Glykosylierungsstelle führten. Bis auf zwei Ausnahmen befinden sich die Viren in je einem Cluster (vergl. Abb. 27). Welche Auswirkung der Verlust dieser Glykosylierungssequons hat, bleibt vorerst ungeklärt. Über das in dieser Studie generierte porcine 8-Plasmid-System wäre eine Überprüfung dieser Beobachtungen möglich.

Die in Tabelle 2c aufgeführten Substitutionen Y40H und E199K, welche die Virus-Wirt-Interaktionen beeinflussen, sind auch in dieser Studie nachweisbar. Erstgenannte Substitution betrifft die Reassortanten A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2) und A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2), die humanen H2N2-Stämme A/Singapore/1/57 und A/Leningrad134/57 sowie das nordamerikanische Isolat A/sw/Oklahoma/053259/08 (H1N2) und das Vogelisolat A/mallard/Potsdam/178-4/83 (H2N2). Über die Mutation E→K an Position 199 verfügen sowohl die *human-like* H1N2- als auch die *human-like* H3N2-Viren. Einzige Ausnahme unter den europäisch porcinen Viren bildet die Reassortante A/sw/Potsdam/35/82. Die Daten weisen auf eine mögliche verbesserte Interaktion der Viren mit dem Schwein als Wirt hin. Eine Resistenz gegenüber Neuraminidase-Inhibitoren verursachen die AS-Substitutionen E119V/D, H274Y und R292K. Keine der eben genannten Mutationen konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Somit liegen keine Hinweise auf Resistenzen gegenüber NA-Inhibitoren in Verbindung mit den Positionen 119, 274 und 292 vor.

VII. M

Die Sequenzen des M2-Proteins wurden auf potentielle Amantadin-Resistenzmutationen geprüft. Dazu gehören die AS-Substitutionen L26F, V27A, A30T, S31N und G34E (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005). Der M-Stammbaum enthält unter anderem 132 europäisch porcine Viren aus den Jahren 1979 bis 2007. Die M-Sequenzen dieser Viren weisen eine monophyletische Entwicklung auf. Anhand der AS S31N können die Stämme in zwei Cluster eingeteilt werden. Das erste enthält die für Serin-kodierenden Viren der Jahre 1979 bis 1987. Ab 1987 kodieren die Viren für die Substitution S31N. Dieses Cluster wird als Amantadin-resistent angesehen. Über Plaquereduktionsteste mit porcinen

Influenzaviren konnte die Resistenz bestätigt werden (Schmidtke et al., 2006; Krumbholz et al., 2009). Seit der Entstehung der N31-Viren ist die S31-Virusvariante nicht mehr nachweisbar. Diese Beobachtung lässt auf ein einmaliges Ereignis schließen. Die ersten bekannten Stämme mit der S31N-Substitution wurden 1987 isoliert (Bsp.: A/sw/Italy/670/1987 (H1N1)). Der Übergang der Mutation von den frühen porzinen H1N1-Viren auf die Subtypen H3N2 und H1N2 erfolgte vermutlich über Reassortierung. Die Entstehung resistenzvermittelnder Mutationen durch die Behandlung mit Amantadin wurde im Rahmen dieser Studie nachgestellt (vergl. Kapitel 4.3.). Jedoch ist das Erscheinen der S31N-Substitution innerhalb der natürlich zirkulierenden porzinen Viren nicht über eine Therapie mit Amantadin zu erklären, da dieser Wirkstoff bei infizierten Schweinen keine Verwendung fand. Wahrscheinlicher ist eine spontane Mutation, die sich als vorteilhaft herausgestellt hat. Parallel zur S31N-Mutation tritt die Substitution R77Q auf (Tab. A12). Die Koinzidenz der Aminosäure 77 in Kombination mit S31N und Amantadin wurde mittels revers-genetischer Studien im Rahmen dieser Arbeit geklärt (siehe Kapitel 4.3.3. und 5.3.4.).

Über den Vergleich der 132 deutschen und belgischen Isolate konnte neben der S31N-Mutation bei 46 Viren die resistenzvermittelnde Substitution V27A identifiziert werden. Bis auf drei Isolate (A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1), A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) und A/sw/Spain/39139/02 (H3N2)) befinden sich die Viren in einem Cluster (Abb. 28). Im Gegensatz dazu wies keines der 132 Stämme Veränderungen in den AS-Positionen A30 und G34 auf. Die Substitution L26F wurde ebenfalls nicht detektiert, aber der Austausch von L→I. Diese Mutation betrifft alle drei Subtypen und bewirkt eine monophyletische Entwicklung innerhalb des Genotyps F (Abb. 28). Die Rolle der Aminosäure Isoleucin an Position 26 bezüglich der Amantadinempfindlichkeit wird im Abschnitt 5.3.3. genauer erläutert.

VIII. NS

Das virale Nichtstrukturprotein 1 (NS1) gilt allgemein als multifunktionaler Virulenzfaktor, der es Influenzaviren ermöglicht die Immunantwort des Wirtes zu antagonisieren (Garcia-Sastre et al., 1998; Kochs et al., 2007). Die Analyse der NS-Sequenzen bezüglich des Pathogenitätsfaktors D92E ergab zwei Treffer: A/sw/Chachoengsao/NIAH587/05 und A/sw/Chonburi/NIAH598/05. Diese Mutation wurde beim Vergleich von niedrig- mit hochpathogenen aviären Viren detektiert und wird mit der Zytokinresistenz in Verbindung gebracht (Seo et al., 2004). Analog dem PB1-F2 entstehen durch Mutationen Stopcodons, die in einer Trunkierung des NS1-Proteins resultieren. Diese Verkürzungen wurden erstmals in nordamerikanisch aviären Isolaten aus den Jahren 1983 nachgewiesen (Suarez und Perdue, 1998). Seit 2000 sind Viren mit einem 217 AS langen NS1 innerhalb der europäisch porzinen Linie nachweisbar. All diese Viren sind in einem Cluster zu

finden. Die restlichen deutschen und belgischen Isolate weisen ein 230 AS-langes Protein auf.

Der Nachweis von virulenzbestimmenden Mutationen auf der Basis von Sequenzvergleichen, wie er im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurde, ist kritisch zu hinterfragen und dient mehr als Anhaltspunkt für weiterführende Experimente. Der Großteil der erwähnten Mutationen wurde bei der Infektion aviären Viren in verschiedenen Vogelspezies oder im Maus-Modell detektiert. Daher sind die Ergebnisse sowohl Experiment- als auch Virusstamm-spezifisch zu betrachten und nicht als generell anzusehen. Die Aussagen, dass die Mutation zu einer Virulenzsteigerung oder –senkung in den untersuchten Schweineviren führt, sind rein hypothetisch und erfordern eine experimentelle Bestätigung. Dazu zählen auch Mutationen, die eine Adaption aviärer Viren an Säugetierzellen bewirken. Erwartungsgemäß sollten diese Mutationen bei den *avian-like* H1N1-Viren nachzuweisen sein, da es sich hier um einen natürlichen Adaptionsprozess der Vogelviren an das Schwein handelt. Diese Vermutung bestätigte sich jedoch nicht und so sind auch diese Mutationen Virusstamm- und Wirtszell-spezifisch zu betrachten.

5.3. Anwendung der reversen Genetik zur Identifizierung Resistenz-verursachender Mutationen

Die reverse Genetik ist aus der Influenza-Forschung nicht mehr wegzudenken. Sie beruht - aufgrund des segmentierten Genoms der Viren - auf der Herstellung von 8-Plasmid-Systemen. Nachdem die genetische Information in Plasmide kloniert wurde, kann diese beliebig verändert werden. Mittels Transfektion werden anschließend replikationsfähige Viren generiert, die daraufhin entsprechend der Fragestellung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* analysiert werden können. Die reverse Genetik findet unter anderem Einsatz in der Grundlagenforschung, der Identifizierung von Virulenzfaktoren (Conzelmann, 2004) sowie der Entwicklung alternativ potentieller Lebendimpfstoffe (Garcia-Sastre et al., 1998). Desweiteren ermöglicht diese Technik die Rekonstruktion vergangener Virusstämme. Ein bekanntes Beispiel ist der Versuch, das pandemische Virus der „Spanischen Grippe“ von 1918/19 „wiederzubeleben“. Seit den 1950er Jahren versuchen Forscher das Virus aus den Lungen von Grippeopfern zu gewinnen (Lawrence, 1999). Über 40 Jahre später gelang es Taubenberger et al. (1997), intakte virale RNA-Fragmente zu isolieren und zu sequenzieren. Durch gentechnische Rekonstruktion erfolgte die Synthese rekombinanter Viren, welche unter anderem das NS, HA und/oder NA bzw. alle acht Segmente des pandemischen Virus enthielten (Basler et al., 2001; Tumpey et al., 2002; Tumpey et al., 2005). Mit der Kombination HA und NA konnte im Mausmodell ein drastischer Anstieg der Mortalitätsrate verzeichnet werden (Tumpey et al., 2002). Das rekombinante NS-Virus mit

WSN-Hintergrund wies jedoch eine deutlich geringere LD₅₀ in Mäusen auf (Basler et al., 2001). Wurde das NS mit den rekonstruierten Segmenten HA, NA, M und NP kombiniert, entstanden Viren mit hochvirulentem Potential (Taubenberger, 2006). In einer neueren Studie wurde über die Generierung von Reassortanten das PB1 ebenfalls als möglicher Virulenzfaktor der „Spanischen Grippe“-Viren identifiziert (Pappas et al., 2008).

5.3.1. Herstellung und Etablierung eines porzinen revers-genetischen Systems

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Analyse europäischer Schweineinfluenzaviren zwei 8-Plasmid-Sätze, beruhend auf dem genetischen Material der Viren A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) und A/sw/Belzig/2/01 (H1N1), hergestellt. Die Klonierung der Segmente erfolgte in erster Linie über Restriktionsenzymverdaue. Desweiteren wurde die *target-primed plasmid amplification* (Stech et al., 2008) basierend auf der QuickChange-Reaktion von Geiser et al. (2001) angewandt. Beide Verfahren waren recht zeitaufwendig. Bei der erst genannten Strategie wurden die Segmente über die *BsmBI*-Schnittstelle der *mcs* des Vektors in den pHW2000 kloniert. Aufgrund interner *BsmBI*-Erkennungssequenzen erfolgte die Plasmidgenerierung der Segmente PB2, PB1, PA und NP über die Amplifikation von Subfragmenten mit anschließender Klonierung in Zwischenvektoren. Nach Verwendung der Insert-Plasmid-PCR sind (trotz Einsatz einer Polymerase mit *proof-reading*-Aktivität) mehrere AS-Substitutionen identifiziert worden, welche anschließend über Mutagenese oder durch Austausch von Restriktionsfragmenten korrigiert wurden. Mit dem Gebrauch einer geeigneteren Polymerase ist die *target-primed plasmid amplification* eine bessere und schnellere Methode zur Klonierung von Influenza-Gensegmenten. Zudem können die Segmente NP, NA, M und NS durch den Einsatz spezifischer Primerpaare in einer einzigen PCR-Reaktion hergestellt werden (Kreibich et al., 2009).

Die generierten Polymerase-Plasmide PB2, PB1, PA und NP wurden mittels eines GFP-Reportergens auf deren Funktionalität getestet. In Abbildung 36 ist der Aufbau des GFP-Plasmides sowie dessen Wirkungsweise im Zusammenhang mit der viralen Polymerase dargestellt. Bereits 48 h nach Transfektion der GMK-Zellen mit den Plasmiden PB2, PB1, PA, NP und GFP kann im Falle einer intakten viralen Polymerase die Expression des grün fluoreszierenden Proteins mittels ultraviolettem Licht im Zellkern der GMK-Zellen nachgewiesen werden. Plasmide, die in diesem Assay als funktionsfähig getestet wurden, sollten auch in der Lage sein, infektiöse Viren hervorzubringen. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre ein Einsatz des GFP-gestützten Assays in der antiviralen Testung von Wirkstoff-Kandidaten denkbar. So könnte die Wirkung von Substanzen auf die Aktivität der viralen Polymerase schnell überprüft werden. Auch der Einfluss von Deletionen, Insertionen und Substitutionen wäre anhand dieses Verfahrens analysierbar.

Der Austausch von Gensegmenten spielt in der Evolution der Influenza-A-Viren eine entscheidende Rolle. Anhand phylogenetischer Studien können dieser Reassortierungsereignisse nachvollzogen werden. Dieser Prozess ist dabei nicht auf einzelne Segmente oder Wirtsspezies beschränkt. Sobald die Voraussetzung einer Mehrfachinfektion einer Zelle mit humanen, aviären, porzinen oder equinen Viren gegeben ist, können Reassortierungen erfolgen. Nach diesem Prinzip entstand das pandemische Virus der „Asiatischen Grippe“, nachdem das HA, NA und PB1 eines aviären H2N2-Stammens in ein humanes H1N1-Virus integriert wurden. Mittels der reversen Genetik und des 8-Plasmid-Systems lassen sich solche Ereignisse im Labor nachstellen sowie neue Kombinationsmöglichkeiten und deren Auswirkungen testen. Dass derartige Reassortierungen nicht zu unterschätzen sind, belegen die Folgen der Pandemien von 1957, 1968 und 2009. Letztere wurde durch ein Virus verursacht, welches Segmente verschiedener genetischer Linien in sich trägt. Dieses A/H1N1v-Virus ist eine Reassortante aus einem europäischen Schweineinfluenzavirus (H1N1) und einer nordamerikanischen Tripelreassortante. Da erstere in Asien seit mindestens 10 Jahre zirkulieren und dort auch mit *classical swine*-Viren und Tripel-Reassortanten rekombinieren, ist ein Ursprung des Pandemievirus in Asien sehr wahrscheinlich, aber nicht nachweisbar. Unbekannt ist, wie dieses Virus nach Mexico gelangte. Für das M-Segment ist eine Verwandtschaft mit asiatischen Stämmen nachweisbar (Abb. 28). Für die Neuraminidase ist das aufgrund fehlender Sequenzdaten nicht möglich. Sowohl die Mortalitäts- und Morbiditätsraten als auch der Nachweis dieser Viren fast zwei Jahre später zeigen, wie effektiv das Virus in der humanen Population zu zirkulieren vermag (WHO). Inzwischen hat es das saisonale H1N1 praktisch verdrängt und ist Bestandteil des saisonalen Impfstoffes (WHO).

5.3.2. Alternative Serin-Codons der Aminosäure 31 im M2

Neben den phylogenetischen Analysen und der Etablierung eines porzinen 8-Plasmid-Systems wurden verschiedene Substitutionen im Matrixprotein 2 untersucht. Das M2 entsteht durch Spleißen der M1-spezifischen mRNA und liegt als integrales Membranprotein vor (Modrow et al., 2010). Aufgrund seiner essentiellen Bedeutung im Infektionszyklus der Viren stellt der M2-Ionenkanal einen geeigneten Angriffspunkt für den Einsatz antiviraler Wirkstoffe dar. Durch die Verwendung von Amantadin, welches mit den Aminosäuren des M2-Kanals in Wechselwirkung tritt und somit dessen Funktion inhibiert, wird das *Uncoating* der Viren unterbunden (Wang et al., 1993). Jedoch entwickelten sich durch Mutationen im M2, insbesondere in den Regionen des Kanaleinganges, sehr schnell klinisch resistente Virusstämme (Klimov et al., 1995; Shiraishi et al., 2003). Anhand von Sequenzvergleichen sensitiver und resistenter Virusstämme wurden folgende

AS-Substitutionen als Resistenz-vermittelnd identifiziert: L26F, V27A, A30T, S31N und G34E (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005).

Während der Durchführung der phylogenetischen Analysen und dem Vergleich der M2-Sequenzdaten bezüglich jener Substitutionen fiel auf, dass die S31-tragenden Stämme nur zwei von sechs möglichen Serin-Codons aufwiesen (AGT und AGC). Durch Substitution des mittleren Nukleotides entstand das seit 1987 nachweisbare Asn-Codon (AAT, AAC). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Virusmutanten untersucht, welche für folgende drei Serin-Tripletts kodierten: AGT, TCT und TCA. Das M-Segment der Reassortanten stammte von dem porzinen Isolat A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1), die restlichen Segmente von A/WSN/33 (H1N1). Im ersten Teil wurde das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtypvirus A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) untersucht. Die Vermehrungskinetiken der vier Viren zeigten einen ähnlichen Verlauf (Abb. 37). Das Wildtypvirus sowie die TCT-Mutante erreichten nach 24 h p.i. ihre maximalen Titer von $1-1,8 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50µl. Die Höchstkonzentration an nachweisbaren Viren der AGT-Rekombinante konnte erst 12 h später ermittelt werden ($2,2 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50µl). Das TCA-Virus wies im Vergleich zu den anderen Viren eine niedrigere Replikationsrate auf (Titermaximum bei $1 \cdot 10^4$ TCID₅₀/50µl nach 36 h). Dass die Verbindung von humanen Segmenten mit dem porzinen M für eine effiziente Replikation nicht nachteilig ist, zeigen die Wachstumskinetiken der TCT- und AGT-Rekombinanten und kann als Ursache für die schlechtere Replikation des TCA-Virus ausgeschlossen werden. Da die Basensubstitutionen im Serin-Codon zu keinem AS-Austausch führten, sollte deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten eher geringfügig sein.

Ein möglicher Grund für die Nichtexistenz der TCT- und TCA-Serin-Codons könnte in deren Instabilität liegen. Um Aussagen darüber treffen zu können, wurden die Viren über 20 Passagen auf MDCK-Zellen vermehrt. Innerhalb dieser Kultivierungsphase veränderte sich der Phänotyp der Viren nicht. Nach der 5., 10. und 20. Passage erfolgte die RNA-Präparation mit anschließender Sequenzierung des M-Segmentes. Anhand der Sequenzdaten konnten keine Veränderungen innerhalb der Serin-Codons detektiert werden. Eine Reversion von TCT bzw. TCA zur ursprünglichen Basenabfolge AGT wäre in der kurzen Zeit relativ unwahrscheinlich, da zwei bzw. alle drei Basen des Triplets mutieren müssten. Desweiteren wurden Purin- gegen Pyrimidinbasen ausgetauscht. Transversionen treten im Allgemeinen jedoch weniger häufig als Transitionen auf. Bei einer Analyse des NS-Segmentes bezüglich der Häufigkeit dieser Mutationsformen konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Eigen, 1992). Auch zeigte sich, dass die dritte Position eher mutiert als die erste und zweite. Aufgrund der Stabilität der alternativen Serin-Codons ist ein natürliches Vorkommen nicht auszuschließen. Die detektierten AS-Substitutionen L117F (TCT-Mutante) und A125T (TCA-Mutante), welche

ab der 20. Passage nachweisbar waren, konnten bei den phylogenetisch analysierten Stämmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Inwieweit die veränderten Serin-Codons die Entstehung resistenter Stämme beeinflusst, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu erfolgte eine 20fache Passagierung der drei Amantadin-sensitiven Serin-Varianten AGT, TCT und TCA unter Substanzdruck. Bereits ab der 3. Passage konnten bei dem AGT-Virus folgende AS-Substitutionen detektiert werden: V27A, S31N und G34E. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen der Studien von Hay et al. (1985) und Abed et al. (2005). Auffällig war die Dominanz der G34E-Mutation, welche in 84 % der untersuchten Sequenzen nachzuweisen war. Nach Erhöhung der Amantadinkonzentration auf 2 µg/ml (14. Passage) wurden weitere AS-Substitutionen identifiziert (M248I (M1) bzw. C19Y (M2)). Diese stehen jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit der Ausprägung der Resistenz, könnten sich aber im Vergleich zu anderen Viren als vorteilhaft erweisen. Das unausgeglichene Verhältnis zwischen den V27A-, S31N- und G34E-Mutationen könnte durch die geringe Probenanzahl zu erklären sein. Erst durch die Analyse mehrerer paralleler Ansätze wäre eine statistische Aussage über die Häufigkeit der Mutationen möglich. Obwohl die Substitutionen bereits als Ursache für die Resistenzentstehung beschrieben wurden (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005), erfolgte deren Überprüfung mittels Plaquereduktionstest. Wie zu erwarten, wiesen die Plaquiviren 1 (G34E), 2 (V27A) und 3 (S31N) von WSN-[M p8-AGT] der 3. Passage IC₅₀-Werte über 22,5 µg/ml Amantadin auf (Abb. 39; Tab. 26). Damit kann der Versuch als Bestätigung der bereits veröffentlichten Publikationen angesehen werden.

Bei der Auswertung der Sequenzdaten der unter Substanzdruck passagierten TCT- und TCA-Mutanten konnten die eben besprochenen Substitutionen nicht nachgewiesen werden. Im Falle der S31N-Mutation ist diese Beobachtung nicht sehr verwunderlich, da ein Austausch von zwei bis drei Basen erforderlich ist. Im Gegensatz dazu wären die Substitutionen V27A und G34E durchaus denkbar. Stattdessen wurde der Austausch Cytidin→Thymidin an der 2. Position des Serin (31)-Codons der TCT-Mutante detektiert. Diese Transition führte zum Austausch der polaren AS Serin zur hydrophoben AS Phenylalanin. Im Plaquereduktionstest wurde die Resistenz gegenüber dem Ionenkanalblocker (IC₅₀-Wert: > 22,5 µg/ml) bestätigt. Im Gegensatz zu den AGT- und TCA-Viren konnte eine Resistenz-vermittelnde Mutation (S31F) erst ab der 7. Passage festgestellt werden. Die Substitution S31F wurde in der Literatur noch nicht beschrieben.

Bei der TCA-Mutante wurden ab der 3. Passage zwei Basensubstitutionen der AS 30 detektiert, zum einen die Transition G→A an erster Stelle des Codons, zum anderen die Transversion C→A an 2. Position. In beiden Fällen bewirken die Mutationen einen AS-Austausch: A30T und A30E. Die Substitution A30T ist bereits als Resistenz-vermittelnde

Mutation publiziert (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005). Der Austausch Alanin zu Glutamat wurde in diesem Zusammenhang noch nicht beschrieben. Analog zu den bereits besprochenen AS-Substitutionen erfolgte auch hier die Überprüfung der Amantadinempfindlichkeit über den Plaquereduktionstest. In beiden Fällen wurden IC_{50} -Werte über 22,5 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Neben den bereits beschriebenen Mutationen konnten sowohl bei der TCT- als auch bei der TCA-Variante AS-Substitutionen im M1 identifiziert werden (A227T, R95K und S195A). Die Rolle dieser Mutationen bleibt zunächst ungeklärt. Beim Vergleich der 189 M-Sequenzen wurde der AS-Austausch A227T (TCT-Virus) bei Viren der Genotypen A (2 Isolate), B (2), D (3), F (2) und G (1) nachgewiesen, die Substitution R95K (TCA-Virus) bei Typ-A- (6), -B- (3), -D- (3) und -F-Viren (8). Die Mutation S195A der TCA-Mutante taucht bei keiner der 189 M-Sequenzen auf. Dass die bekannten Substitutionen V27A und G34E in den beiden alternativen Serin-Mutanten nicht nachweisbar waren, könnte durch die geringe Probenanzahl erklärt werden. In 2 von 3 Fällen wurde eine Veränderung der AS 31 festgestellt, was auf eine bevorzugte Position in der Entstehung der Amantadin-Resistenz schließen lässt. Eines haben alle in dieser Studie detektierten AS-Substitutionen, gemeinsam und das ist ihre Lage innerhalb der transmembranen Domäne des M2. Ob die Mutationen die Resistenz durch verminderte Bindungsaffinität mit Amantadin hervorrufen oder durch allosterische Veränderungen der Helices, kann im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. In Abbildung 50 sind die detektierten Resistenz-vermittelnden Mutationen im M2-Ionenkanal zusammengefasst.

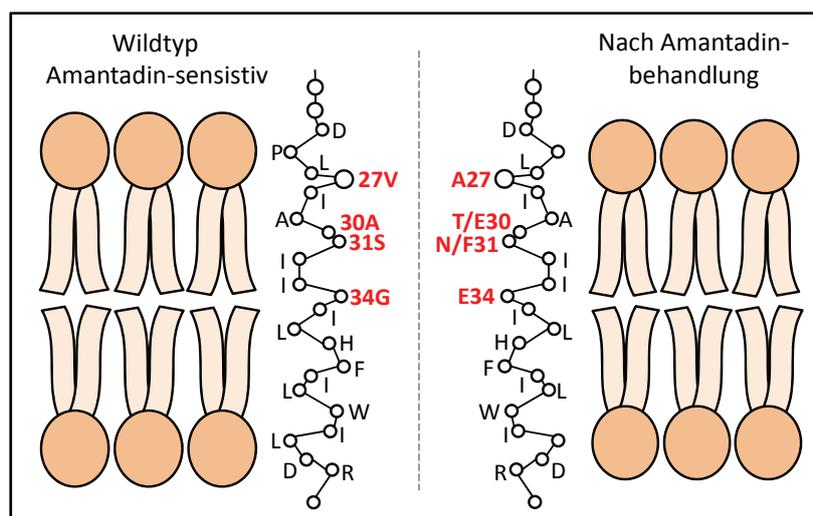


Abb. 50: Darstellung der durch Amantadin-Einfluss mutierten Aminosäuren sowie deren Position im M2-Ionenkanal (www.virology.ws/2009/05/06/release-of-influenza-viral-rnas-into-cells)

5.3.3. Einfluss der Aminosäure Isoleucin an Position 26 und 27 im M2 bei Amantadin-Behandlung

Weitere für Resistenzmutationen empfängliche Positionen betreffen die Aminosäuren 26 und 27. Folgende Substitutionen wurden als Resistenz-verursachend identifiziert: L26F, V27A, V27G und V27D (Hay et al., 1985; Abed et al., 2005). Innerhalb der 189 untersuchten M-Sequenzen wurde neben den AS Leucin (AS26), Valin (AS27) und Alanin (AS27) auch Isoleucin detektiert. Ob ein Austausch von L26I und V27I ebenfalls eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Amantadin spielt, wurde über die Generierung der entsprechenden Mutanten sowie anschließender Plaquereduktionstestung überprüft. Analog zu den Serin-Mutanten enthielten die Viren die genetische Information des porzinen M-Segmentes von A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) sowie die restlichen 7 Segmente von A/WSN/33 (H1N1). Während beim Wildtypvirus die Freisetzung neuer Viren bereits nach 6 h p.i. nachzuweisen war, konnte dieses Stadium bei den mutierten Viren erst 4 h später beobachtet werden (Abb. 43). Zudem wies das rekombinante Virus I27 eine deutlich schwächere Replikationsrate auf (Abb. 43). Ob die schlechtere Vermehrung mit der AS Isoleucin an Position 27 in Verbindung steht, bleibt unbeantwortet. Der Sequenzvergleich zeigt jedoch, dass kein europäisch porzines Virusisolat über I27 verfügt. Lediglich vier Stämme des Genotyps B sowie ein aviäres Isolat des Genotyps F weisen Isoleucin an Position 27 auf.

Die Bedeutung des Isoleucins bei der Resistenzentwicklung konnte anschließend über den Plaquereduktionstest geklärt werden. Beide Virusmutanten WSN-[M p8-I26] und WSN-[M p8-I27] wiesen bereits bei 0,08 bzw. 0,34 µg/ml Amantadin eine 50 %-ige Plaquereduktion auf. Diese Ergebnisse belegen, dass das Isoleucin an Position 26 und 27 des M2 keine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Amantadin spielt.

5.3.4. Bedeutung der Aminosäure 77 des M2 bei der Amantadin-Resistenzentstehung

Zum Abschluss wurde der Einfluss der AS 77 des M2 in Verbindung mit der Resistenz gegenüber dem Ionenkanalblocker untersucht. Aufgrund der verbreiteten Co-Existenz (S31/R77 bzw. N31/Q77) wird die AS 77 meist im Zusammenhang mit der resistenzvermittelnden AS 31 erwähnt. Anhand der reversen Genetik wurde die Rolle der AS 77 unabhängig von der Aminosäure 31 analysiert. Dazu erfolgte die Mutagenese der M-Segmente von A/sw/Potsdam/15/81 (S31/R77) und A/sw/Belzig/2/01 (N31/Q77) so, dass der sensitive Stamm für die AS 77 des resistenten Stammes kodierte und umgekehrt. Nach der Generierung der rekombinanten Viren mit A/WSN/33-Hintergrund wurden die Vermehrungskinetiken analysiert. Die Wildtypviren sowie das Virus WSN-[M p11-Q77R] zeigten fast identische Wachstumskurven (Abb. 43). Die Titermaxima der Viren lagen bei $\sim 3 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ TCID₅₀/50µl. Die rekombinante Variante WSN-[M p8-

R77Q] hingegen wies ein um 2-3 log-Stufen niedrigeres Titermaximum auf. Scheinbar verfügt die Kombination N31/R77 über einen Vorteil gegenüber der Variante S31/Q77. Beim Vergleich der IC₅₀-Werte (Tab. 26) zeigte sich, dass keine Veränderung der Suszeptibilität gegenüber Amantadin vorlag. Die Potsdam-Viren wurden beruhend auf den Ergebnissen des Plaquereduktionstestes als sensitiv (Ø IC₅₀-Wert: 0,37 µg/ml) eingestuft, die Belzig-Viren als resistent (IC₅₀-Wert: > 20 µg/ml). Damit konnte eindeutig bewiesen werden, dass die AS 77 keinen Einfluss auf die Resistenzentstehung ausübt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Passagierungsexperimente unter Substanzdruck bestätigt. Bei keinem der drei rekombinanten Serin-Viren konnte eine Substitution von R77Q nachgewiesen werden. Aufgrund der Lage dieser Aminosäure außerhalb der transmembranen Region des M2 ist eine Beteiligung an der Resistenzentwicklung auch eher unwahrscheinlich.

6. Literaturverzeichnis

- Abed Y, Goyette N, Boivin G.** 2005. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2):556-559
- Akarsu H, Iwatsuki-Horimoto K, Noda T, Kawakami E, Katsura H, Baudin F, Horimoto T, Kawaoka Y.** 2011. Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. *Virus Res*, 155(1):240-8
- Ansorge WJ.** 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*, 25(4):195-203
- Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchusak K, Louisirootchanakul S, Lerdsamran H, Pooruk P, Thitithanyanont A, Pittayawonganon C, Guo CT, Hiramatsu H, Jampangern W, Chunsutthiwat S, Puthavathana P.** 2007. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol*, 81(18):9950-5
- Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng HY, Salvatore M, Perdue ML, Swayne DE, García-Sastre A, Palese P, Taubenberger JK.** 2001. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *PNAS*, 98:2746-2751
- Bauer K, Dürrwald R, Schlegel M, Pfarr K, Topf D, Wiesener N, Dahse HM, Wutzler P, Schmidtke M.** 2011. Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2008. *Med Microbiol Immunol*, DOI 10.1007/s00430-011-0206-1
- Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, Gregory V, Cameron K, Lim W, Subbarao K.** 1999. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. *Virology*, 254(1):115-123
- Bentley DR und 193 andere Autoren.** 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218): 53-9
- Bergmann S.** 2008. Genetische Charakterisierung porziner Influenza-A-Viren des Subtypes H3N2 und Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen bei Influenza-A-Viren mit Hilfe des Hefe-3-Hybridsystems. Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Beveridge WI.** 1991. The chronicle of influenza epidemics. *Hist Philos Life Sci*, 13(2):223-235
- Birol I, Jackman SD, Nielsen CB, Qian JQ, Varhol R, Stazyk G, Morin RD, Zhao Y, Hirst M, Schein JE, Horsman DE, Connors JM, Gascoyne RD, Marra MA, Jones SJ.** 2009. De novo transcriptome assembly with ABySS. *Bioinformatics*, 25(21):2872-7
- Biswas SK, Nayak DP.** 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*, 68(3):1819-1826
- Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M.** 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol*, 80(19):9896-9898

- Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI.** 2006. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*, 295(8):891-4
- Brooks WA, Alamgir AS, Sultana R, Islam MS, Rahman M, Fry AM, Shu B, Lindstrom S, Nahar K, Goswami D, Haider MS, Nahar S, Butler E, Hancock K, Donis RO, Davis CT, Zaman RU, Luby SP, Uyeki TM, Rahman M.** 2009. Avian influenza virus A (H5N1), detected through routine surveillance, in child, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 15(8):1311-3
- Brown DA, Rose JK.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3):533-544
- Brown IH, Chakraverty P, Harris PA, Alexander DJ.** 1995. Disease out-breaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec* 136(13):328-329
- Brown IH, Harris PA, McCauley JW, Alexander DJ.** 1998. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol*, 79 (Pt 12):2947-2955
- Brown IH, Ludwig S, Olsen CW, Hannoun C, Scholtissek C, Hinshaw VS, Harris PA, McCauley JW, Strong I, Alexander DJ.** 1997. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. *J Gen Virol*, 78:553-562
- Bruce EA, Digard P, Stuart AD.** 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol*, 84(12):5848-5859
- Bui M, Whittaker G, Helenius A.** 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, 70(12):8391-401
- Cady SD, Schmidt-Rohr K, Wang J, Soto CS, Degrado WF, Hong M.** 2010. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 463(7281):689-92
- Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, Rosenthal PB.** 2010. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *PNAS*, 107(23):10685-10690
- Campitelli L, Donatelli I, Foni E, Castrucci MR, Fabiani C, Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG.** 1997. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. *Virology*, 232:310-318
- Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Caro V, Schuffenecker I, Sabatier M, Traversier A, Valette M, Lina B, Ferraris O, Escuret V.** 2010. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res*, 87(2):242-8
- Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG.** 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, 193 (1):503-506
- Castrucci MR, Kawaoka Y.** 1995. Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxyl-terminal residue of M2 protein. *J Virol*, 69(5):2725-2728
- Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb RA.** 2008. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol*, 82(20):10059-10070

- Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA.** 2007. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol*, 81(13):7111-7123
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 7 (12):1306-1312
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 7(12):1306-1312
- Cheung TK, Poon LL.** 2007. Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci*, 1102:1-25
- Choppin PW, Murphy JS, Tamm I.** 1960. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits. *J Exp Med*, 112:945-952
- Chu CM, Dawson IM, Elford WJ.** 1949. Filamentous forms associated with newly isolates influenza virus. *Lancet*, 1(6554):602
- Chu CM, Shao C, Hou CC.** 1957. Studies of strains of influenza virus isolated during the epidemics in 1957 in Changchun. *Vopr Virusol*, 2(5):278-281
- Cipriano RC.** 2002. Infectious Salmon Anemia Virus. *Fish Disease Leaflet # 85*
- Claas ECJ, Kawaoka Y, De Jong JC, Masurel N, Webster RG.** 1994. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology*, 204:453-457
- Clouthier SC, Rector T, Brown NEC, Anderson ED.** 2002. Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J Gen Virol*, 83(Pt 2):421-428
- Colacino JM, Chirgadze NY, Garman E, Murti KG, Loncharich RJ, Baxter AJ, Staschke KA, Laver WG.** 1997. A single sequence change destabilizes the influenza virus neuraminidase tetramer. *Virology*, 236(1):66-75
- Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, Martin SR, Daniels RS, Gregory V, Skehel JJ, Gamblin SJ, Hay AJ.** 2009. Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine*, 27(45):6317-23
- Colman PM.** 1994. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci*, 3(10):1687-96
- Conenello GM, Tisoncik JR, Rosenzweig E, Varga ZT, Palese P, Katze MG.** 2011. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol*, 85(2):652-662
- Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, 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):1414-1421
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC.** 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205(1):17-23
- Conzelmann KK.** 2004. Reverse genetics of mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol*, 283: 1-41

- Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P.** 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, 6(3):205-213
- de Jong JC, de Ronde-Verloop JM, Bangma PJ, van Kregten E, Kerckhaert J, Paccaud MF, Wicki F, Wunderli W.** 1986. Isolation of swine-influenza-like A (H1N1) viruses from man in Europe, 1986. *Lancet*, 328(8519):1329-1330
- de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Truong HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH, Farrar J.** 2005. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med*, 352(7):686-91
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha do Q, Guan Y, Peiris JS, Chinh NT, Hien TT, Farrar J.** 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 12(10):1203-1207
- de la Luna S, Martinez C, Ortin J.** 1989. Molecular cloning and sequencing of influenza virus A/Victoria/3/75 polymerase genes: sequence evolution and prediction of possible functional domains. *Virus Res*, 13(2):143-155
- Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchev AV, Brownlee GG, Fodor E.** 2006. Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol*, 80(24):11911-11919
- Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, Palese P.** 1980. The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, 8(3):315-328
- Digard P, Blok VC, Inglis SC.** 1989. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*, 171:162-169
- Dobson M.** 2009. Seuchen, die die Welt veränderten – von Cholera bis SARS. National Geographic Deutschland (G+J/RBA GmbH & Co. KG, Hamburg)
- Drews G, Adam G, Heinze C.** 2004. Molekulare Pflanzenvirologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Eierhoff T, Hrinčius ER, Rescher U, Ludwig S, Ehrhardt C.** 2010. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog*, 6(9). pii: e1001099
- Eigen M.** 1992. Virus-Quasispezies oder die Büchse der Pandora. *Spektrum der Wissenschaft*, www.wissenschaft-online.de/artikel/949036
- El-Sayed A, Awad W, Fayed A, Hamann HP, Zschöck M.** 2010. Avian influenza prevalence in pigs, Egypt. *Emerg Inf Dis* 16:726-727
- Enami M, Enami K.** 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol*, 70(10):6653-6657
- Englund JA.** 2002. Antiviral therapy of influenza. *Semin Pediatr Infect Dis*, 13 (2):120-128
- Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, Fechter P, Brownlee GG.** 2002. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol*, 76(18):8989-9001

- Fodor E, Smith M.** 2004. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol*, 78(17):9144-9153
- Fortes P, Beloso A, Ortin J.** 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J*, 13 (3):704-712
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD.** 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 79(5):2814-2822
- Fouchier RA, Osterhaus AD, Brown IH.** 2003. Animal influenza virus surveillance. *Vaccine*, 21(16):1754-1757
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD.** 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (5):1356-1361
- Franchini P, van der Merwe M, Roodt-Wilding R.** 2011. Transcriptome characterization of the South African abalone *Haliotis midae* using sequencing-by-synthesis. *BMC Res Notes*, 11;4:59
- Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J.** 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *PNAS*, 102(51):18590-18595
- Gabriel G, Herwig A, Klenk HD.** 2008. Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin $\alpha 1$ Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog*, 4(2):e11
- Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A.** 2006. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology*, 344(2):432-8
- Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämmer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, García-Sastre A, Münz C.** 2009. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*, 6(4):367-80
- Garcia-Sastre A, Egorov A, Matasov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T.** 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252:324-30
- Geiser M, Cèbe R, Drewello D, Schmitz R.** 2001. Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques*, 31(1):88-90. 92
- Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, Spiro DJ, Sitz J, Koo H, Bolotov P, Dernovoy D, Tatusova T, Bao Y, St George K, Taylor J, Lipman DJ, Fraser CM, Taubenberger JK, Salzberg SL.** 2005. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, 437(7062):1162-6

- Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, Garcia-Sastre A, Tumpey TM, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P.** 2005. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol*, 79(17):11533-11536
- Goto H, Kawaoka Y.** 1998. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17):10224-8
- Gourreau JM, Kaiser C, Valette M, Douglas AR, Labie J, Aymard M.** 1994. Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France. *Arch Virol*, 135:365-382
- Grantham ML, Wu WH, Lalime EN, Lorenzo ME, Klein SL, Pekosz A.** 2009. Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein is not required for virus replication in vitro but contributes to virus virulence. *J Virol*, 83(17):8655-61
- Greenspan D, Palese P, Krystal M.** 1988. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, 62(8):3020-3026
- Gregoriades A, Frangione B.** 1981. Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion. *J Virol*, 10(1):323-328
- Gregory V, Bennett M, Orkhan MH, Al Hajjar S, Varsano N, Mendelson E, Zambon M, Ellis J, Hay A, Lin YP.** 2002. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology*, 300(1):1-7
- Gregory V, Bennett M, Thomas Y, Kaiser L, Wunderli W, Matter H, Hay A, Lin YP.** 2003. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virol*, 148:793-802
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Li PH, Kawaoka Y, Webster RG.** 1996. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J Virol*, 70(11):8041-8046
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG.** 1999. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16):9363-9367
- Haesebrouck F, Biront P, Pensaert MB, Leunen J.** 1985. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res*, 46:1926-1928
- Hai R, Schmolke M, Varga ZT, Manicassamy B, Wang TT, Belser JA, Pearce MB, García-Sastre A, Tumpey TM, Palese P.** 2010. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol*, 84(9):4442-50
- Hankeln T, Zischler H, Schmidt ER.** 2009. Technologierevolution in der Genomforschung. *Forschungsmagazin* <http://molgen.biologie.uni-mainz.de/Downloads/PDFs/molevol/Hankeln-NaturundGeist.pdf>
- Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG.** 2006. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol*, 80(16):7789-98
- Hatada E, Fukuda R.** 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*, 73(Pt 12):3325-3329

- Hatada E, Takizawa T, Fukuda R.** 1992. Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol*, 73(Pt 1):17-25
- Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann, and Y. Kawaoka.** 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840-2
- Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH.** 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*, 4(11):3021-3024
- Hay AJ.** 1992. The action of amantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Seminars in Virology* 3:21-30
- Hayden FG, Hay AJ.** 1992. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol*, 176:119-30
- Hinshaw VS, Air GM, Gibbs AJ, Graves L, Prescott B, Karunakaran D.** 1982. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *J Virol*, 42(3):865-872
- Hinshaw VS, Webster RG, Rodriguez RJ.** 1981. Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. *Arch Virol*, 67(3):191-201
- Hinshaw VS, Wood JM, Webster RG, Deibel R, Turner B.** 1985. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull World Health Organ*, 63(4):711-719
- Hoffmann E, Mahmood K, Yang CF, Webster RG, Greenberg HB, Kemble G.** 2002. Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17):11411-6
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG.** 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (11):6108-6113
- Horimoto T, Kawaoka Y.** 1994. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol*, 68(5):3120-3128
- Horimoto T, Kawaoka Y.** 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev*, 14(1):129-149
<http://phil.cdc.gov/Phil/home.asp>
- Huang TS, Palese P, Krystal M.** 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, 64(11):5669-5673
- Huet S, Avilov SV, Ferbitz L, Daigle N, Cusack S, Ellenberg J.** 2010. Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J Virol* 84(3):1254-64
- Hulse-Post DJ, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen HL, Webby RJ, Walker D, Nguyen TD, Webster RG.** 2007. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol*, 81(16):8515-24

- Ilyushina NA, Govorkova EA, Russell CJ, Hoffmann E, Webster RG.** 2007. Contribution of H7 haemagglutinin to amantadine resistance and infectivity of influenza virus. *J Gen Virol*, 88(Pt 4):1266-74
- International Committee on Taxonomy of Viruses;** <http://www.ictvdb.org/ictv/index.html>
- Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y.** 2009. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*, 460(7258):1021-1025
- Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H.** 2008. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol*, 82(3):1146-54
- Kaden V, Lange E, Starick E, Brue W, Krakowski W, Klopries M.** 2008. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Vet Microbiol*, 131:123-132
- Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W.** 2006. Influenza report 2006. www.influenzareport.com
- Karasin AI, Brown IH, Carman S, Olsen CW.** 2000a. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol*, 74:9322-9327
- Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G, Olsen CW.** 2002. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol*, 40(3):1073-1079
- Karasin AI, Schutten MM, Cooper LA, Smith CB, Subbarao K, Anderson GA, Carman S, Olsen CW.** 2000. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* 68:71-85
- Katsuda K, Sato S, Shirahata T, Lindstrom S, Nerome R, Ishida M, Nerome K, Goto H.** 1995. Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. *J Gen Virol*, 76:1247-1249
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG.** 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*, 63(11):4603-8
- Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG.** 1984. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology*, 139(2):303-316
- Kawaoka Y, Yamnikova S, Chambers TM, Lvov DK, Webster RG.** 1990. Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus. *Virology*, 179(2):759-767

- Keleta L, Ibricevic A, Bovin NV, Brody SL, Brown EG.** 2008. Experimental evolution of human influenza virus H3 hemagglutinin in the mouse lung identifies adaptive regions in HA1 and HA2. *J Virol*, 82(23):11599-608
- Kendal AP, Klenk HD.** 1991. Amantadine inhibits an early, M2 protein-dependent event in the replication cycle of avian influenza (H7) viruses. *Arch Virol*, 119(3-4):265-73
- Kilbourne ED, Murphy JS.** 1960. Genetic studies of influenza viruses. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid in ovo adaptation of early passage Asian strain isolates by combination with PR8. *J Exp Med*, 111:387-406
- Kiso M, Ozawa M, Le MT, Imai H, Takahashi K, Kakugawa S, Noda T, Horimoto T, Kawaoka Y.** 2011. Effect of an Asparagine-to-Serine Mutation at Position 294 in Neuraminidase on the Pathogenicity of Highly Pathogenic H5N1 Influenza A Virus. *J Virol*, 85(10):4667-72
- Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, Shult PA, Roumillat LF, Cox NJ.** 1995. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenzae A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J Infect Dis*, 172(5):1352-5
- Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L.** 2007. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 81(13):7011-21
- Körner I.** 210. Hämagglutinin und Polymerase als Virulenzfaktoren des Influenza-A-Virus. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
- Kreibich A, Stech J, Mettenleiter TC, Stech O.** 2009. Simultaneous one-tube full-length amplification of the NA, NP, M, and NS genes of influenza A viruses for reverse genetics. *J Virol Methods*, 159(2):308-10
- Krumbholz A, Schmidtke M, Bergmann S, Motzke S, Bauer K, Stech J, Durrwald R, Wutzler P, Zell R.** 2009. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol*, 90 (Pt 4):900-908
- Kulshreshtha V, Kibenge M, Salonius K, Simard N, Riveroll A, Kibenge F.** 2010. Identification of the 3' and 5' terminal sequences of the 8 rna genome segments of european and north american genotypes of infectious salmon anemia virus (an orthomyxovirus) and evidence for quasispecies based on the non-coding sequences of transcripts. *Virol J*, 7:338
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K.** 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 9(4):299-306
- Kuntz-Simon G, Madec F.** 2009. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses Public Health*, 56:310-325
- Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N.** 2007. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*, 362(2):271-282
- Lange W, Vogel G.** 2004. Influenza – Klinik, Virologie, Epidemiologie, Therapie und Prophylaxe. 2. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin

- Lawrence E.** 1999. Spanish 'flu keeps its secrets. (www.nature.com/news/1999/990304/full/news990304-5.html)
- Lee JH, Pascua PN, Song MS, Baek YH, Kim CJ, Choi HW, Sung MH, Webby RJ, Webster RG, Poo H, Choi YK.** 2009. Isolation and genetic characterization of H5N2 influenza viruses from pigs in Korea. *J Virol*, 83(9):4205-4215
- Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z, Chen H.** 2006. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*, 80(22):11115-23
- Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM.** 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol*, 69(2):1099-1106
- Liu T, Muller J, Ye Z.** 2002. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology. *Virology*, 304(1):89-96
- Lu G, Rowley T, Garten R, Donis RO.** 2007. FluGenome: a web tool for genotyping influenza A virus. *FluGenome: a web tool for genotyping influenza A virus. Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue):W275-9
- Lu Y, Qian XY, Krug RM.** 1994. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, 8(15):1817-1828
- Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM.** 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*, 214(1):222-228
- Ludwig S, Hausteiner A, Kaleta EF, Scholtissek C.** 1994. Recent influenza A (H1N1) infections of pigs and turkeys in Northern Europe. *Virology*, 202:281-286
- Ma W, Gramer M, Rossow K, Yoon KJ.** 2006. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. *J Virol*, 80(10):5092-5096
- Madec F, Gourreau JM, Kaiser C, Aymard M.** 1984. Apparition de manifestations grippales chez les porcs en association avec un virus A/H3N2. *Bull Acad Vet Fr*, 57:513-522
- Madec F, Kaiser C, Gourreau JM, Martinat-Botte F.** 1989. [Pathologic consequences of a severe influenza outbreak (swine virus A/H1N1) under natural conditions in the nonimmune sow at the beginning of pregnancy]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 12(1-2):17-27
- Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitja M, Saubi N, Espuna E, Artigas C.** 2006. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J*, 172(2):377-381
- Marión RM, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J.** 1997. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol*, 78(Pt 10):2447-2451
- Marjuki H, Scholtissek C, Franks J, Negovetich NJ, Aldridge JR, Salomon R, Finkelstein D, Webster RG.** 2010. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks. *Arch Virol*, 155(6):925-34

- Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, Foni E, Barigazzi G, Lin Y, Hay A.** 2002. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol*, 83:735-745
- Martin K, Helenius A.** 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol*, 65 (1):232-244
- Martin P, Martin-Granel E.** 2006. 2,500-year Evolution of the Term Epidemic. *Emerg Infect Dis*, 12(6):976-980
- Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, Donatelli I, Kawaoka Y.** 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 74(18):8502-12
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, 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):1146-1155
- Maxam AM, Gilbert W.** 1977. A new method for sequencing DNA. *Biotechnology*, 24:99-103
- Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S.** 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol*, 10(5):1140-1152
- McAuley JL, Zhang K, McCullers JA.** 2010. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *J Virol* 84(1):558-64
- Mishin VP, Novikov D, Hayden FG, Gubareva LV.** 2005. Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol*, 79(19):12416-24
- Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, Kawaoka Y.** 2000. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*, 74(13):6015-20
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H.** 2010. *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Morozova O, Marra MA.** 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92(5):255-64
- Motzke S.** 2007. Genetische Charakterisierung porziner Influenzaviren der Subtypen H1N1 und H1N2. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Mukaigawa J und Nayak DP.** 1991. Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol*. 65(1):245–253
- Munier S, Larcher T, Cormier-Aline F, Soubieux D, Su B, Guigand L, Labrosse B, Cherel Y, Quéré P, Marc D, Naffakh N.** 2010. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. *J Virol*, 84(2):940-52

- Naffakh N, Massin P, Escriou N, Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S.** 2000. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol*,81(Pt 5):1283-1291
- Nakagawa Y, Oda K, Nakada S.** 1996. The PB1 Subunit Alone Can Catalyze cRNA Synthesis, and the PA Subunit in Addition to the PB1 Subunit Is Required for Viral RNA Synthesis in Replication of the Influenza Virus Genome. *J Virol*, 70(9):6390-6394
- Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T.** 2010. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn J Infect Dis*, 63(1):67-71
- Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y.** 2010. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog*, 6(9). pii: e1001121
- Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P.** 1978. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed B*, 25(10):853-857
- Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S.** 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*, 143(2):147-161
- Nemeroff ME, Qian XY, Krug RM.** 1995. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology*, 212(2):422-428
- Nerome K, Ishida M, Oya A, Kanai C, Suwicha K.** 1982. Isolation of an influenza H1N1 virus from a pig. *Virology*, 117:485-489
- Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y.** 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, 71(12):9690-9700
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y.** 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249):931-939
- Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS.** 2008. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol*,16(4):149-157
- Nieto A, de la Luna S, Barcena J, Portela A, Ortin J.** 1994. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol*, 75:29-36
- Nobusawa E, Sato K.** 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol*, 80(7):3675-3678
- Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K.** 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*, 182(2):475-85
- Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, van Reeth K.** 2006. Swine influenza. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, Hrsg. *Disease of Swine*. Aufl. Oxford: Blackwell Publishing, 469-482
- Olsen CW.** 2002. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 85:199-210

- Olson AC, Rosenblum E, Kuchta RD.** 2010. Regulation of influenza RNA polymerase activity and the switch between replication and transcription by the concentrations of the vRNA 5' end, the cap source, and the polymerase. *Biochemistry*, 49(47):10208-15
- Ottis K, Sidoli L, Bachmann PA, Webster RG, Kaplan MM.** 1982. Human influenza A viruses in pigs: Isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch Virol*, 73:103-108
- Oxford JS, Mann A, Lambkin R.** 2003. A designer drug against influenza: the NA inhibitor oseltamivir (Tamiflu). *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1(2):337-42
- Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifenberger JG, Sass LE, McInerney P, Thompson JF, Bowers J, Jarosz M, Milos PM.** 2009. Direct RNA sequencing. *Nature*, 461(7265):814-8
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW.** 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61(2):397-410
- Palese P.** 2004. Influenza: old and new threats. *Nat Med*, 10 (12 Suppl):S82-87
- Palese P. and Shaw ML.** 2006. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology* 5th edition
- Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, Solórzano A, Zeng H, Perrone LA, Palese P, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM.** 2008. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8):3064-3069
- Park EK, Castrucci MR, Portner A, Kawaoka Y.** 1998. The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions. *J Virol*, 72(3):2449-2455
- Peiris JS, de Jong MD, Guan Y.** 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*, 20(2):243-67
- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF.** 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 354 (9182):916-917
- Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA.** 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ*, 59 (1):75-78
- Perales B, de la Luna S, Palacios I, Ortín J.** 1996. Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit. *J Virol*, 70(3):1678-86
- Pielak RM, Chou JJ.** 2010a. Flu channel drug resistance: a tale of two sites. *Protein Cell*, 1(3):246-58
- Pielak RM und Chou JJ.** 2010b. Solution NMR structure of the V27A drug resistant mutant of influenza A M2 channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 401(1):58-63
- Pielak RM, Schnell JR, Chou JJ.** 2009. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(18):7379-84
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N.** 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, 8(12):3867-3874

- Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P.** 2004. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, 321(1):120-133
- Potter CW.** 2001. A history of influenza. *J Appl Microbiol*, 91(4):572-579
- Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindukulasuriya KA, Travassos da Rosa APA, Popov VL, Tesh RB, Virgin HW, Wang D.** 2009. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad Viruses Are Novel Members of the Family *Orthomyxoviridae*. *J Virol*, 83(22):11599-11606
- Qiu Y, Krug RM.** 1994. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol*, 68(4):2425-2432
- Reed ML, Bridges OA, Seiler P, Kim JK, Yen HL, Salomon R, Govorkova EA, Webster RG, Russell CJ.** 2010. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity and transmissibility in ducks. *J Virol*, 84(3):1527-35
- Roberts PC, Compans RW.** 1998. Host cell dependence of viral morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:5746-5751
- Rossmann JS, Jing X, Leser GP, Balannik V, Pinto LH, Lamb RA.** 2010. Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol*, 84(10):5078-5088
- Rossmann JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA.** 2010b. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 142(6):902-913
- Rossmann JS, Lamb RA.** 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2):229-236
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X.** 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol*, 11(6):567-573
- Saeed MF, Kolokoltsov AA, Albrecht T, Davey RA.** 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog*, 6(9). pii: e1001110
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M.** 1977b. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265(5596):687-95
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977a. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463-7
- Sansom MS, Kerr ID.** 1993. Influenza virus M2 protein: a molecular modelling study of the ion channel. *Protein Eng*, 6(1):65-74
- Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortin J, Nieto A.** 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol*, 69(4):2420-2426
- Schmidtke M, Zell R, Bauer K, Krumbholz A, Schrader C, Suess J, Wutzler P.** 2006. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology*, 49(5):286-293

- Scholtissek C, Burger H, Bachmann PA, Hannoun C.** 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*, 129 (2):521-523
- Scholtissek C, Hinshaw V, Olsen CW.** 1998. Influenza in pigs and their role as the intermediate host In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, Hrsg. Textbook of influenza. Aufl. Oxford: Blackwell Science 137-145
- Schrader C, Süß J.** 2003. Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in Germany. *Intervirology*, 46:66-70
- Schrauwen EJ, Bestebroer TM, Munster VJ, de Wit E, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA.** 2011. Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. *J Gen Virol*, 92(Pt 6):1410-5
- Schultz U, Fitch WM, Ludwig S, Mandler J, Scholtissek C.** 1991. Evolution of pig influenza viruses. 183:61-73
- Seo SH, Hoffmann E, Webster RG.** 2004. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res*, 103(1-2):107-113
- Shaw MW, Arden NH, Maassab HF.** 1992. New aspects of influenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, 5(1):74-92
- Shi L, Summers DF, Peng Q, Galarz JM.** 1995. Influenza A virus RNA polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme. *Virology*, 208(1):38-47
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y.** 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440(7083):435-6
- Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y.** 2003. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *J Infect Dis*, 188(1):57-61
- Shope RE.** 1931. The Etiology of Swine Influenza. *Science*, 73 (1886):214-215
- Shope RE.** 1938. Serological evidence for the occurrence of infection with human influenza virus in swine. *J Exp Med*, 67:739-748
- Sieczkarski SB, Whittaker GR.** 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 76(20):10455-10464
- Sieczkarski SB, Whittaker GR.** 2005. Characterization of the host cell entry of filamentous influenza virus. *Arch Virol*, 150(9):1783-1796
- Slatko BE.** 1996. Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Mol Biotechnol*, 6(3):311-22
- Song J, Feng H, Xu J, Zhao D, Shi J, Li Y, Deng G, Jiang Y, Li X, Zhu P, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H.** 2011. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. *J Virol*, 85(2): 2180-2188
- Song MS, Pascua PN, Lee JH, Baek YH, Lee OJ, Kim CJ, Kim H, Webby RJ, Webster RG, Choi YK.** 2009. The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *J Virol*, 83(23):12325-12335

- Stech J, Garn H, Wegmann M, Wagner R, Klenk HD.** 2005. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat Med* 11(6):683-689
- Stech J, Stech O, Herwig A, Altmeppen H, Hundt J, Gohrbandt S, Kreibich A, Weber S, Klenk HD, Mettenleiter TC.** 2008. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res*, 36(21):e139
- Steglich C.** 2010. Molekulargenetische Charakterisierung und Genotypisierung porziner Influenzaviren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, Wilson IA.** 2006. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 355(5):1143-1155
- Stewart SM, Wu WH, Lalime EN, Pekosz A.** 2010. The cholesterol recognition/interaction amino acid consensus motif of the influenza A virus M2 protein is not required for virus replication but contributes to virulence. *Virology*, 405(2):530-8
- Stoner TD, Krauss S, DuBois RM, Negovetich NJ, Stallknecht DE, Senne DA, Gramer MR, Swafford S, DeLiberto T, Govorkova EA, Webster RG.** 2010. Antiviral susceptibility of avian and swine influenza virus of the N1 neuraminidase subtype. *J Virol*, 84(19):9800-9
- Suarez DL, Perdue ML.** 1998. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res*, 54(1):59-69
- Subbarao EK, Kawaoka Y, Murphy BR.** 1993. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation. *J Virol*, 67(12):7223-8
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE Jr, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y.** 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*, 74(24):11825-32
- Tada T, Suzuki K, Sakurai Y, Kubo M, Okada H, Itoh T, Tsukamoto K.** 2011. NP body domain and PB2 contribute to increased virulence of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens. *J Virol*, 85(4):1834-1846
- Tai CY, Escarpe PA, Sidwell RW, Williams MA, Lew W, Wu H, Kim CU, Mendel DB.** 1998. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(12):3234-41
- Takahashi T, Kurebayashi Y, Ikeya K, Mizuno T, Fukushima K, Kawamoto H, Kawaoka Y, Suzuki Y, Suzuki T.** 2010. The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication. *PLoS One*, 5(12):e15556
- Takahashi T, Suzuki Y, Nishinaka D, Kawase N, Kobayashi Y, Hidari KI, Miyamoto D, Guo CT, Shortridge KF, Suzuki T.** 2001. Duck and human pandemic influenza A viruses retain sialidase activity under low pH conditions. *J Biochem*, 130(2):279-83
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24 (8):1596-1599

- Tang Y, Zaitseva F, Lamb RA, Pinto LH.** 2002. The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue. *J Biol Chem*, 277(42):39880-6
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ.** 2007. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, 14(3):229-33
- Tate MD, Job ER, Brooks AG, Reading PC.** 2011. Glycosylation of the hemagglutinin modulates the sensitivity of H3N2 influenza viruses to innate proteins in airway secretions and virulence in mice. *Virology*, 413(1):48-92
- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG.** 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*, 275(5307):1793-1796
- Taubenberger JK.** 2006. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc*, 150(1):86-112
- Toyoda T, Adyshev DM, Kobayashi M, Iwata A, Ishihama A.** 1996. Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol*, 77(9):2149-2157
- Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Mikulasova A, Taubenberger JK, Swayne DE, Palese P, Basler CF.** 2002. Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *PNAS* 99:13849-13854
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, García-Sastre A.** 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 310(5745):77-80
- Van Reeth K, Brown IH, Pensaert M.** 2000. Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium. *Vet Rec*, 146(20):588-9
- Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y.** 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol*, 72(9):7626-31
- Wang C, Lamb RA, Pinto LH.** 1995. Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophys J*, 69(4):1363-71
- Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA.** 1993. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol*, 67(9):5585-5594
- Wang XW, Luan JB, Li JM, Bao YY, Zhang CX, Liu SS.** 2010. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. *BMC Genomics*, 11:400
- Wasilenko JL, Sarmiento L, Pantin-Jackwood MJ.** 2009. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol*, 154(6):969-979
- Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG.** 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol*, 74(18):8243-8251
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y.** 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56(1):152-179

- Whittaker G, Bui M, Helenius A.** 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol*, 70(5):2743-2756
- WHO** – Weltgesundheitsorganisation; www.who.int
- Wood GW, Banks J, Brown IH, Strong I, Alexander DJ.** 1997. The nucleotide sequence of the HA1 of the haemagglutinin of an HI avian influenza virus isolate from turkeys in Germany provides additional evidence suggesting recent transmission from pigs. *Avian Pathol* 26:347-355
- Wright PF, Webster RG.** 2007. Orthomyxoviruses. *Fields Virology*. D. M. Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 5:1533-1579
- Wright PF, Webster RG.** 2007. Orthomyxoviruses. *Fields Virology*. Knipe D, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 5:1533-1579.
- Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus, Abdel-Ghaffar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, Naghdaliyev A, Peiris JS, Shindo N, Soerose S, Uyeki TM.** 2008. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med*, 358(3):261-73
- Wutzler P, Kossow KD, Lode H, Ruf BR, Scholz H, Vogel GE.** 2004. Antiviral treatment and prophylaxis of influenza in primary care: German recommendations. *J Clin Virol*, 31 (2):84-91
- www.flugenome.org/show_genomes.php
- www.historyofinfluenza.com
- www.illumina.com
- www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi?go=1
- www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/growth.html
- www.virology.ws/2009/05/06/release-of-influenza-viral-rnas-into-cells
- Xu L, Bao L, Lv Q, Deng W, Ma Y, Li F, Zhan L, Zhu H, Ma C, Qin C.** 2010. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A (H1N1) influenza viruses in vitro and in vivo. *Virol J*, 7:325
- Yamada H, Chounan R, Higashi Y, Kurihara N, Kido H.** 2004. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *Febs Letters*, 578(3):331-336
- Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y.** 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 444(7117):378-82
- Yi M, Cross TA, Zhou HX.** 2008. A secondary gate as a mechanism for inhibition of the M2 proton channel by amantadine. *J Phys Chem B*, 112(27):7977-9
- Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P.** 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, 1(1):e4

Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhuber KJ, Wutzler P. 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 88:536-546

Zhou B, Li Y, Halpin R, Hine E, Spiro DJ, Wentworth DE. 2011. PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice. *J Virol*, 85(1):357-65

Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon K, Krauss S, Webster RG. 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*, 73(10):8851-8856

7. Anhang

Tab. A1: porcine Influenzaviren (AG Zell)

Sequenzierung durch	Virusstamm	Subtyp
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Jena/5/96	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Karrenzien/2/87	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Bakum/8602/99	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Potsdam/35/82	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Lohne/1/97	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Leipzig/145/92	H3N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Potsdam/15/81	H1N1
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Schwerin/103/89	H1N1
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Bakum/5/95	H1N1
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Belzig/2/01	H1N1
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Bakum/1832/00	H1N2
K. Bauer; A. Krumbholz	A/sw/Bakum/1833/00	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Arnsberg/6554/1979	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Arnsberg/902/81	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Arnsberg/623/81	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Arnsberg/624/81	H1N1
S. Motzke	A/sw/Nordwalde/IDT2197/03	H1N2
S. Motzke	A/sw/Gudensberg/IDT2930/04	H1N2
S. Motzke	A/sw/Gudensberg/IDT2931/04	H1N2
S. Motzke	A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03	H1N2
S. Motzke	A/sw/Norden/IDT2308/03	H1N2
S. Motzke	A/sw/Dötlingen/IDT4735/05	H1N2
S. Motzke	A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05	H1N2
S. Motzke	A/sw/Potsdam/1/81	H1N1
S. Motzke	A/sw/Potsdam/268/81	H1N1
S. Motzke	A/sw/Geldern/IDT2888/04	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Vechta/2623/03	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Bakum/1769/03	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Bakum/909/93	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Belzig/54/01	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Berlin/1578/00	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Bissendorf/IDT1864/03	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Bakum/1362/98	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Gent/1/84	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Damme/IDT2890/04	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Hertzen/IDT4317/05	H3N2
S. Bergmann	A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05	H3N2
A. Krumbholz	A/sw/Haselünne/IDT2617/03	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/Herzlake/IDT5335/06	H3N2
A. Krumbholz	A/sw/Herzlake/IDT5336/06	H3N2
A. Krumbholz	A/sw/Herzlake/IDT5337/06	H3N2
A. Krumbholz	A/sw/England/17394/96	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Löningen/IDT2530/03	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Ehren/IDT2570/03	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/IVD/IDT2674/03	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Gescher/IDT2702/03	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Stolzenau/IDT3296/04	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Nortrup/IDT3685/04	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Dötlingen/IDT3780/05	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Visbek/IDT2869/03	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Granstedt/IDT3475/04	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Gent/7625/99	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Spenge/IDT3805/05	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Stadtlohn/IDT3853/05	H1N2
A. Krumbholz	A/sw/Netherlands/25/1980	H1N1
A. Krumbholz	A/sw/IDT/Gent/V220/92	H3N2
A. Krumbholz	A/sw/Gent/V229/92	H3N2
C. Steglich	A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Günne/IDT4847/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06	H1N1

Fortsetzung Tab. 1A: porzine Influenzaviren (AG Zell)

Sequenzierung durch	Virusstamm	Subtyp
C. Steglich	A/sw/Borgentreich/IDT4858/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Asendorf/IDT4966/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Melle/IDT5003/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Daseburg/IDT5022/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Lichtenau/IDT5045/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Hamstrub/IDT5445/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Raddestedt/IDT5483/06	H3N2
C. Steglich	A/sw/Südlohn/IDT5508/06	H1N1
C. Steglich	A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06	H1N2
C. Steglich	A/sw/Ramsberg/IDT5544/06	H1N1

Tab. A2: Primer zur Fragmentamplifikation und Sequenzierung

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung
PB2-5'-1	21 b	5'-CAGGAATCATCTCCATTATTC-3'
PB2-F1	22 b	5'-CAGTCTCGCACTCGCGAGATAC-3'
PB2-R1	23 b	5'-CTTTCCAYCATGTATGCCACCAT-3'
PB2-F2	22 b	5'-GCACAAGATGTTATCATGGAGG-3'
PB2-R2	24 b	5'-CTGTTTCGTCTCTYCCACTTACTAT-3'
PB2-F3	24 b	5'-CACTTTCAAAGAACAAGYGGATC-3'
PB2-R3	22 b	5'-TTGATCTCCCACATCATTGATG-3'
PB2-F4	26 b	5'-CGAATATTCCAGYACTGAGAGAGTGG-3'
PB2-R4	24 b	5'-CAAGATTACTCAGTTCATTGATGC-3'
PB2-3'-1	23 b	5'-AAGGCTAACAGTCTCGGAAAGG-3'
PB1-5'-1	24 b	5'-TGCCAGTCATAGGTCTGACGACC-3'
PB1-F1	22 b	5'-GRGGAARATGGACAACAACAC-3'
PB1-R1	24 b	5'-TAAAGGAGAGCTCTGTATCTTGTG-3'
PB1-F2	21 b	5'-TGAGAACTTGAGCAATCTGG-3'
PB1-R2	24 b	5'-TTGATTCCCTCATGATTAGGTGC-3'
PB1-F3	24 b	5'-GAATCTTGGGCAAAGAGATACAC-3'
PB1-R3	30 b	5'-CCGGATATTGTATAGATTTGGTCCCTCCATC-3'
PB1-F4	23 b	5'-ACATAYCGGTGCCACAGAGGTGA-3'
PB1-R4	21 b	5'-CCATGGCCTCCACCATGCTGG-3'
PB1-3'-1	24 b	5'-TCCATTCTCAATACCAGCCAAAGG-3'
PA-5'-2	24 b	5'-CCAGGCCATTGTGCGATCCCTTCC-3'
PA-F1	21 b	5'-GGAAGTCTGTTTCATGTATTC-3'
PA-R1	21 b	5'-TTCAAGGCTGGAGAAGTTCGG-3'
PA-F2	17 b	5'-TCCTTTCGTCAAGTCCGA-3'
PA-R2	23 b	5'-TCTTTGCAATCTTCAAATCCAC-3'
PA-F3	25 b	5'-GCTACAGGACATTGAAAATGAGGAG-3'
PA-R3a	24 b	5'-AAACCCAGGGATCATAATCAGGC-3'
PA-3'-1	26 b	5'-GAAGGCTCCATYGGGAAAGTATGCAG-3'
HAH1-5'-1	24 b	5'-CTGGGTTGCCAAGGATCCATCCTG-3'
HAH1-F3	24 b	5'-GAAAGCTGACCCATYTGTTAGG-3'
HAH1-R3	25 b	5'-TGGGATGTACGTTCTGAAAAGGAAG-3'
HAH1-F4	24 b	5'-AGCCACTGGGAACTTAATAGCACC-3'
HAH1-R4a	24 b	5'-GAACACATCCAGAAGCTGATTGCC-3'
HAH1-3'-1	24 b	5'-GGCGATCTACTCCACAGTCGCCAG-3'
H3-5'-1	24 b	5'-TCTGGACCAGTTCAGTAGCATTAG-3'
swH3-F1	24 b	5'-AACGCTGTGCCTGGGACATCATGC-3'
swH3-R1	22 b	5'-CCATTTGGAGTAATGCATTAG-3'
swH3-F2	21 b	5'-AGRGGTCTGTCTAGTAGAATA-3'
swH3-R2	22 b	5'-ATATGGCAAAGGAAATCCACAG-3'
H3-3'-1	27 b	5'-AGTCAATCAGAAATGGAAACTTACGAC-3'
NP-5'-1	24 b	5'-CTTACCATTGTTTGCTTGGCGCC-3'
NP-F1	24 b	5'-AGATGGAACTGGTGGAGAACGCC-3'
NP-R1	24 b	5'-GATGAGATCTTCAATCTCAGCATT-3'
NP-F2	24 b	5'-ATGATAAAGCGGGAAATCAATGAT-3'
NP-R2	24 b	5'-TTACTCATGTCAAAGGAAGGCACG-3'
NP-3'-1	25 b	5'-GCAAATATTGGGCTATAAGAACCAG-3'
NAN1-5'-1	23 b	5'-ATTRTCTTTACTGTATATAGCCC-3'
NAN1-F1	23 b	5'-TTGGAAACATAATCTCAATATGG-3'

Fortsetzung Tab. A2: Primer zur Fragmentamplifikation und Sequenzierung

Name	Größe	Primersequenz in 5'→3'-Richtung
NAN1-R1	23 b	5'-GCCCATTACTIONTGGTCCATCGGTC-3'
NAN1-F2	24 b	5'-ATACAATGGCATAATAACAGACAC-3'
NAN1-R2	23 b	5'-GCACCGTCTGGCCAAGACCAACC-3'
NAN1-3'-1	22 b	5'-GGGAGTTTTGTTCCAGCATCCAG-3'
NAN2-5'-1	24 b	5'-TGGGGTATATTTCTCTCTCCATGG-3'
N2-1F	23 b	5'-GGCTCTGTTTCTCTCTCCATTGC-3'
N2-1R	24 b	5'-CTAGTATCAGCTTTTCTGAAGCA-3'
N2-2F	27 b	5'-TAAAAATGCAACTGCTAGCTTCATTTA-3'
N2-2R	24 b	5'-CAACAATACTGTTGAGGTCCACC-3'
N-2-3'-1	24 b	5'-TTCTCTGTGAAGGCAAAGCTGC-3'
M-5'-1	21 b	5'-TACGCTGCAGTCTCGTCCAC-3'
MF	23 b	5'-GGAATGGCTAAAGACAAGACCAA-3'
MR	21 b	5'-AAATGACYRTCCTCGTCARCAC-3'
M-3'-2	24 b	5'-TCTTGCACCTGATATTGTGGATTCC-3'
por-NS-5'-2	24 b	5'-TGCTTGGGCATGAGCATGAACCAG-3'
swNS-3'-1	18 b	5'-AATGGCGAGAACAATTGG-3'

Tab. A3: Größe und Funktionalität des PB1-F2-Proteins der in dieser Studie untersuchten Influenza-A-Viren

Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]	mutierter Start	Funktionalität
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2)	90		positiv
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2)	90		positiv
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2)	-	M→T	Protein nicht exprimiert
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2)	90		positiv
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2)	90		positiv
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2)	90		positiv
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	90		positiv
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1)	90		positiv
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1)	90		positiv
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)	-	M→T	Protein nicht exprimiert
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2)	79		positiv
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N2)	79		positiv
AR-1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1)	90		positiv
AR-2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1)	90		positiv
AR-3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1)	90		positiv
AR-4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1)	90		positiv
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2)	90		positiv
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2)	79		positiv
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2)	79		positiv
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2)	90		positiv
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2)	90		positiv
DT7 A/sw/Dötlingen/IDT4735/05 (H1N2)	90		positiv
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2)	90		positiv
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1)	90		positiv
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1)	90		positiv
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1)	90		positiv
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1)	90		positiv
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2)	18		negativ
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2)	90		positiv
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2)	34		negativ
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2)	90		positiv
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2)	37		negativ
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2)	79		positiv
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2)	-	M→T	Protein nicht exprimiert
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2)	57		negativ
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2)	90		positiv
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2)	90		positiv
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4 263/05 (H3N2)	90		positiv
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1)	90		positiv
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1)	90		positiv
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2)	90		positiv
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2)	90		positiv
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2)	90		positiv
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2)	90		positiv
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2)	90		positiv
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2)	90		positiv
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2)	90		positiv
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2)	90		positiv
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2)	90		positiv
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2)	90		positiv

Fortsetzung Tab. 3A: Größe und Funktionalität des PB1-F2-Proteins

Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]	mutierter Start	Funktionalität
DT45 A/sw/Dötlingen/IDT3780/05 (H1N2)	90		positiv
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2)	90		positiv
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1)	90		positiv
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2)	90		positiv
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1)	90		positiv
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2)	90		positiv
DT52 A/sw/Voglam/IDT4096/05 (H1N1)	90		positiv
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1)	90		positiv
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1)	90		positiv
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1)	90		positiv
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2)	90		positiv
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2)	90		positiv
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2)	90		positiv
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2)	90		positiv
DT60 A/sw/Stadtlonn/IDT3853/05 (H1N2)	90		positiv
DT61 A/sw/Egglham/IDT5250/05 (H3N2)	81		positiv
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2)	81		positiv
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2)	79		positiv
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2)	90		positiv
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1)	90		positiv
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1)	90		positiv
DT67 A/sw/Damme/IDT5673/2006 (H3N2)	90		positiv
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2)	90		positiv
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2)	90		positiv
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1)	90		positiv
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2)	90		positiv
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2)	79		positiv
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2)	90		positiv
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2)	90		positiv
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2)	90		positiv
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2)	90		positiv
DT83 A/sw/Brakel-Gehreden/IDT4806/06 (H1N1)	90		positiv
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1)	90		positiv
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1)	90		positiv
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2)	8		negativ
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2)	90		positiv
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1)	90		positiv
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2)	90		positiv
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1)	90		positiv
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2)	8		negativ
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1)	90		positiv
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006 (H1N1)	90		positiv
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1)	11		negativ
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2)	79		positiv
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1)	11		negativ
DT98 A/sw/Hilten/IDT5143/06 (H3N2)	90		positiv
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1)	90		positiv
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2)	90		positiv
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2)	90		positiv
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2)	90		positiv
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2)	90		positiv
DT104 A/sw/Salzkotten/IDT5275/06 (H3N2)	90		positiv
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2)	90		positiv
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2)	90		positiv
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2)	90		positiv
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)	79		positiv
DT110 A/sw/Raddstedt/IDT5483/06 (H3N2)	90		positiv
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1)	90		positiv
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2)	90		positiv
DT113 A/sw/Bochoit-Barlo/IDT5533/06 (H1N1)	90		positiv
DT114 A/sw/Rothalmünster/IDT5536/06 (H1N2)	90		positiv
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1)	90		positiv
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1)	79		positiv
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1)	101		positiv
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1)	101		positiv
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1)	101		positiv
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1)	101		positiv
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2)	90		positiv
DT122 A/sw/Stadtlonn/IDT5570/06 (H3N2)	90		positiv
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1)	90		positiv
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1)	90		positiv
DT127 A/sw/Rothalmünster/IDT5616/06 (H1N1)	90		positiv
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1)	90		positiv
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2)	87		positiv

Fortsetzung Tab. 3A: Größe und Funktionalität des PB1-F2-Proteins

Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]	mutierter Start	Funktionalität
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1)	90		positiv
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1)	90		positiv
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2)	90		positiv
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2)	90		positiv
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2)	90		positiv
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1)	90		positiv
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2)	90		positiv
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2)	90		positiv
A/swine/Saraburi/NAIH13021/2005 (H1N2)	90		positiv
A/swine/Hong Kong/1197/02 (H3N2)	90		positiv
A/swine/Chachoengsao/NAIH587/2005 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Chonburi/NAIH589/2005 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1)	11		negativ
A/swine/Hong Kong/9656/2001 (H1N1)	24		negativ
A/swine/Hong Kong/915/2004 (H1N2)	57		negativ
A/California/04/2009(H1N1)	11		negativ
A/Mexico/4108/2009(H1N1)	11		negativ
A/Hamburg/4/2009(H1N1)	11		negativ
A/Bayern/63/2009(H1N1)	11		negativ
A/Thailand/271/2005(H1N1)	57		negativ
A/blue-winged teal/Alberta/141/1992 (H1N1)	90		positiv
A/gadwall/Ohio/37/1999 (H6N2)	87		positiv
A/pintail/Alberta/84/2000 (H11N9)	90		positiv
A/Port Chalmers/73 (H3N2)	90		positiv
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1)	90		positiv
A/chicken/Jiangsu/cz1/2002 (H5N1)	87		positiv
A/mallard/Postdam/178-4/83 (H2N2)	90		positiv
A/Moscow/10/1999 (H3N2)	90		positiv
A/shorebird/Delaware/168/06 (H16N3)	90		positiv
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1)	90		positiv
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1)	79		positiv
A/Roma/1949 (H1N1)	57		negativ
A/swine/Cotes_dArmour/3633/84 (H3N2)	90		positiv
A/swine/Cotes_dArmor/790/97 (H1N2)	79		positiv
A/Moscow/10/1999(H3N2)	90		positiv
A/Wellington/01/2004 (H3N2)	90		positiv
A/equine/London/1416/1973 (H7N7)	90		positiv
A/swine/Tennessee/82/1977 (H1N1)	11		negativ
A/swine/Shanghai/1/2005 (H1N1)	11		negativ
A/swine/Ontario/55383/04 (H1N2)	90		positiv
A/swine/Nebraska/209/98 (H3N2)	90		positiv
A/swine/Manitoba/12707/2005 (H3N2)	90		positiv
A/red-necked stint/AUS/4500/1980 (H3N8)	90		positiv
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1)	79		positiv
A/swine/Arizona/148/1977 (H1N1)	11		negativ
A/swine/Finisterre/127/99 (H3N2)	90		positiv
A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1)	87		positiv
A/swine/Hungary/13509/2007 (H3N2)	90		positiv
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Italy/1523/98 (H3N2)	57		negativ
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2)	-	M→T	Protein nicht exprimiert
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2)	37		negativ
A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2)	37		negativ
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2)	-	M→T	Protein nicht exprimiert
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1)	79		positiv
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1)	90		positiv
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1)	90		positiv
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1)	90		positiv
A/swine/England/WVL12/1995 (H1N1)	90		positiv
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1)	90		positiv
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1)	90		positiv
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1)	90		positiv
A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	90		positiv
A/fowl/Dobson/1927 (H7N7)	90		positiv
A/Cottbus/1/1964 (H2N2)	57		negativ
A/Potsdam/2/1965 (H2N2)	90		positiv
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	90		positiv
A/blue goose/WI/711/1975 (H5N2)	90		positiv
A/fowl/Rostock/45/1934 (H7N1)	87		positiv
A/duck/NZL/41/1984 (H1N2)	90		positiv
A/Philippines/344/2004 (H1N2)	24		negativ

Tab. A4: Rezeptorbindestellen und benachbarte Aminosäuren im HAH1. *: Rezeptorbindestellen

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	103	106	108*	113	147	149	150*	151	155	159	167*	174	197*	204	207	208*	213	214	238	239	240*	242*
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	R	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1) – 1C	E	T	Y	T	K	T	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	D	A	N	G	Q	G
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	G	Q	G
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	D	Q	G
AR1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	L	D	A	R	E	Q	G
AR2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	H	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
AR3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
AR4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	D	Y	R	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	N	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	G	Q	G
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	M	T	A	R	G	Q	G
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT7 A/sw/Dötlingen/IDT4735/05 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	I	H	D	A	I	T	T	R	N	Q	G
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	I	H	D	A	I	T	T	R	N	Q	G
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	R	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	R	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	I	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	G	Q	G
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	N	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT45 A/sw/Dötlingen/IDT3780/05 (H1N2) – 1B	G	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	N	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	I	H	T	R	E	Q	G
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2) – 1B	K	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	G	Q	G
DT52 A/sw/Voglar/IDT4096/05 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	I	H	T	R	G	Q	G
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G

Fortsetzung Tab. A4: Rezeptorbindestellen und benachbarte Aminosäuren im HAH1. *: Rezeptorbindestellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	103	106	108*	113	147	149	150*	151	155	159	167*	174	197*	204	207	208*	213	214	238	239	240*	242*
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	V	T	A	N	L	W	S	H	D	S	L	D	T	R	G	Q	G
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT60 A/sw/Stadtlahn/IDT3853/05 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	N	L	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	V	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1) – 1C	K	T	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT83 A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	N	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	S	H	K	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	?	Q	G
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT113 A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1) – 1C	E	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	N	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT114 A/sw/Rothalmünster/IDT5536/06 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	Y	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	G	Q	G
DT127 A/sw/Rothalmünster/IDT5616/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G

Fortsetzung Tab. A4: Rezeptorbindestellen und benachbarte Aminosäuren im HAH1. *: Rezeptorbindestellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	103	106	108*	113	147	149	150*	151	155	159	167*	174	197*	204	207	208*	213	214	238	239	240*	242*
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2) – 1B	E	I	Y	F	K	V	T	A	H	S	W	T	H	D	A	I	T	A	R	N	Q	G
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	L	D	A	R	E	Q	G
A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	K	H	S	W	S	H	N	T	I	T	A	R	D	Q	G
A/swine/England/438207/94 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	T	A	R	G	Q	G
A/swine/England/690421/95 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	K	V	S	A	H	S	W	S	H	D	A	T	T	A	R	D	Q	G
A/swine/England/17394/96 (H1N2) – 1B	E	V	Y	S	K	V	T	V	H	S	W	S	H	N	A	I	T	A	R	D	Q	G
A/swine/Italy/1521/98 (H1N2) – 1B	E	I	Y	S	del	V	T	A	Q	S	W	S	H	N	A	I	T	A	R	D	Q	G
A/swine/England/191973/92 (H1N7) – 1B	E	T	Y	A	R	V	T	A	H	S	W	S	H	E	T	I	N	A	R	G	Q	G
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/swine/Hong Kong/8512/2001 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	E	T	L	D	A	R	G	Q	G
A/swine/Netherlands/12/85 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	I	T	A	Y	L	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/swine/Netherlands/3/80 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	E	S	L	D	A	R	E	Q	G
A/swine/Italy/1511/98 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	S	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	N	T	R	G	Q	G
A/swine/Italy/1498-2/97 (H1N1) – 1C	E	T	Y	S	K	V	T	A	H	H	W	S	H	D	T	L	N	A	R	G	Q	G
A/swine/Cotes_dArmor/1455/99 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	K	Q	G
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	I	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/swine/Belgium/WVL1/1979(H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	L	N	A	R	G	Q	G
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	K	A	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	K	S	T	A	H	P	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/England/WVL12/1995 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	K	A	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	L	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	R	T	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	H	T	R	G	Q	G
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	K	V	T	A	H	R	W	F	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	H	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	A	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1) – 1C	G	T	Y	A	K	V	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	D	Y	R	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1) – 1C	E	T	Y	T	K	A	T	A	H	S	W	S	H	D	P	L	L	T	R	G	Q	G
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	K	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/swine/Schleswig-H./1/93 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	V	T	A	H	R	W	S	H	D	S	L	Y	T	R	G	Q	G
A/swine/Parma/1997 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	H	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/swine/Chonburi/NIH589/05 (H1N1) – 1A	D	T	Y	T	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/Thailand/271/2005 (H1N1) – 1A	D	T	Y	T	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/swine/Chachoengsao/NIH587/05 (H1N1) – 1A	D	T	Y	T	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G

Fortsetzung Tab. A4: Rezeptorbindestellen und benachbarte Aminosäuren im HAH1. *: Rezeptorbindestellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	103	106	108*	113	147	149	150*	151	155	159	167*	174	197*	204	207	208*	213	214	238	239	240*	242*
A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1) – 1B	E	I	Y	I	del	V	T	A	H	S	W	S	H	E	N	I	N	A	R	D	Q	G
A/Singapore/6/1986 (H1N1) – 1B	E	T	Y	A	K	V	T	A	H	S	W	S	H	D	A	I	N	A	R	D	Q	G
A/swine/Oklahoma/032726/2008 (H1N2) – 1B	E	A	Y	A	del	V	S	A	H	R	W	L	H	N	T	L	N	A	R	D	Q	G
A/swine/Minnesota/SG-00239/07 H1N2) – 1B	E	A	Y	A	del	V	S	A	H	S	W	L	H	D	T	L	N	A	R	D	Q	G
A/New Caledonia/20/99 (H1N1) – 1B	E	T	Y	A	del	V	S	A	H	S	W	L	H	N	A	L	N	A	R	D	Q	G
A/swine/Ontario/55383/04 (H1N2) – 1B	E	A	Y	A	del	V	S	A	H	R	W	L	H	D	T	L	N	A	R	D	Q	G
A/Michigan/2/2003 (H1N2) – 1B	E	A	Y	A	del	V	S	A	H	S	W	L	H	D	T	L	N	A	R	D	Q	G
A/swine/Minnesota/00194/03 (H1N2) – 1A	D	A	Y	I	R	V	T	A	H	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	D	Q	G
A/swine/HongKong/1110/2006 (H1N2) – 1A	D	T	Y	I	R	V	T	A	H	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	D	Q	G
A/Hamburg/4/2009 (H1N1) – 1A	D	T	Y	I	K	V	T	A	H	K	W	S	H	D	S	L	D	A	R	D	Q	G
A/swine/Wisconsin/457/98 (H1N1) – 1A	D	T	Y	I	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/swine/Korea/CY02/02 (H1N2) – 1A	D	T	Y	I	K	V	T	A	H	N	W	S	H	D	A	L	D	A	R	D	Q	G
A/Philippines/344/2004 (H1N2) – 1A	D	T	Y	I	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	D	Q	G
A/swine/Iowa/1/1976 (H1N1) – 1A	D	T	Y	I	R	V	T	A	Y	N	W	S	H	D	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/swine/Saskatchewan/18789/02 (H1N1) – 1D	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	I	D	A	R	G	Q	G
A/swine/Germany/SEK1178/2000 (H1N2) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	V	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/Switzerland/8808/2002 (H1N1) – 1C	K	A	Y	A	R	T	T	V	H	N	W	S	H	D	T	L	H	T	R	E	Q	G
A/swine/Netherlands/386/1986 (H1N1) – 1C	E	T	Y	A	K	T	T	A	H	H	W	S	H	D	S	L	D	A	K	G	Q	G
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1) – 1A	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	D	S	L	D	A	R	D	Q	G
A/common teal/Netherlands/10/2000 (H1N1) – 1C	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	E	T	L	D	A	R	G	Q	G
A/black duck/Ohio/95/1993 (H1N1) – 1D	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	E	S	L	D	A	R	G	Q	G
A/mallard duck/ALB/322/1988 (H1N1) – 1D	E	T	Y	I	K	V	T	A	Y	S	W	S	H	E	S	L	D	A	R	G	Q	G

Tab. A5: HAH1-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	27	28	40	104	142	158	172	177	212	286	291	304	498	502	557
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
AR1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
AR2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
AR3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
AR4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Fortsetzung Tab. A5: HAH1-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	27	28	40	104	142	158	172	177	212	286	291	304	498	502	557
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT7 A/sw/Döttingen/IDT4735/05 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT45 A/sw/Döttingen/IDT3780/05 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT52 A/sw/Voglar/IDT4096/05 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT60 A/sw/Stadthohn/IDT3853/05 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Fortsetzung Tab. A5: HAH1-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	27	28	40	104	142	158	172	177	212	286	291	304	498	502	557
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
DT83 A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT113 A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT114 A/sw/Rotthalmünster/IDT5536/06 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
DT127 A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
A/swine/England/438207/94 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
A/swine/England/690421/95 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
A/swine/England/17394/96 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
A/swine/Italy/1521/98 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	gap
A/swine/England/191973/92 (H1N7) – 1B	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Fortsetzung Tab. A5: HAH1-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	27	28	40	104	142	158	172	177	212	286	291	304	498	502	557
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/swine/Hong Kong/8512/2001 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Netherlands/12/85 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Netherlands/3/80 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Italy/1511/98 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Italy/1498-2/97 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Cotes_dArmor/1455/99 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Belgium/WVL1/1979(H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/England/WVL12/1995 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Schleswig-H./1/93 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
A/swine/Parma/1997 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Germany/SEK1178/2000 (H1N2) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
A/Switzerland/8808/2002 (H1N1) – 1C	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	gap	gap	gap
A/swine/Netherlands/386/1986 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	gap	gap	gap
A/Brevig_Mission/1/18 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/common teal/Netherlands/10/2000 (H1N1) – 1C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/black duck/Ohio/95/1993 (H1N1) – 1D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/mallard duck/ALB/322/1988 (H1N1) – 1D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Chonburi/NIH589/05 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/Thailand/271/2005 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Chachoengsao/NIH587/05 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1) – 1B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
A/Singapore/6/1986 (H1N1) – 1B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+

Fortsetzung Tab. A5: HAH1-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	27	28	40	104	142	158	172	177	212	286	291	304	498	502	557
A/swine/Oklahoma/032726/2008 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Minnesota/SG-00239/07 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
A/New Caledonia/20/99 (H1N1) – 1B	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Ontario/55383/04 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
A/Michigan/2/2003 (H1N2) – 1B	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Minnesota/00194/03 (H1N2) – 1A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/HongKong/1110/2006 (H1N2) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/Hamburg/4/2009 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Wisconsin/457/98 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/Swine/Korea/CY02/02 (H1N2) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/Philippines/344/2004 (H1N2) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Iowa/1/1976 (H1N1) – 1A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
A/swine/Saskatchewan/18789/02 (H1N1) – 1D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

Tab. A6: Rezeptorbindungsstellen und benachbarte Aminosäuren im HAH3. *: Rezeptorbindungsstellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	98*	134	135	136	137	138	153*	155*	183*	190*	194*	195*	224	225	226	227	228	229
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	I	Y	R	G	L	S	S	R
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R

Fortsetzung Tab: A6: Rezeptorbindungsstellen und benachbarte Aminosäuren im HAH3. *: Rezeptorbindungsstellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	98*	134	135	136	137	138	153*	155*	183*	190*	194*	195*	224	225	226	227	228	229
DT61 A/sw/Egglham/IDT5250/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT67 A/swine/Damme/IDT5673/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT98 A/sw/Hilten/IDT5143/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT104 A/sw/Salzkotten/IDT5275/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 H3N2 – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT110 A/sw/Raddestedt/IDT5483/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT122 A/sw/Stadtlahn/IDT5570/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/Port Chalmers/73 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Hungary/13509/2007 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Ukkel/1/1984 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/wild_boar/Germany/WS169/06 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/duck/Chabarovsk/1610/1972 (H3N8) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Italy/7680/2001 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Italy/50127/2007 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R

Fortsetzung Tab: A6: Rezeptorbindungsstellen und benachbarte Aminosäuren im HAH3. *: Rezeptorbindungsstellen

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	98*	134	135	136	137	138	153*	155*	183*	190*	194*	195*	224	225	226	227	228	229
A/swine/Italy/66945/2006 (H3N1) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Italy/297576/2004 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Italy/600/1999 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	S	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Hong Kong/1144/02 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	S	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/Hong Kong/1774/99 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Hong Kong/5200/99 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Hong Kong/7982/00 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/swine/Hong Kong/9745/01 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/Kansas/UR07-0110/2008 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	S	A	W	T	H	D	L	Y	R	N	I	P	S	R
A/Brisbane/10/2007 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	S	A	W	T	H	D	L	Y	R	N	I	P	S	R
A/Singapore/39/2009 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	S	A	W	T	H	D	L	Y	R	N	I	P	S	R
A/swine/Ontario/00130/97 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	Y	A	W	H	H	D	L	Y	R	G	I	S	S	R
A/New York/550/1998 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	Y	A	W	H	H	D	L	Y	R	G	V	S	S	R
A/Panama/2007/1999 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	S	A	W	H	H	D	I	Y	R	G	V	S	S	R
A/Beijing/32/1992 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	Y	A	W	H	H	D	L	Y	R	G	Q	S	S	R
A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	N	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2) – 3B	Y	G	G	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/swine/Iowa/H02AS8/2002 (H3N2) – 3A	Y	G	T	S	Y	S	W	H	H	D	L	Y	R	G	V	S	S	I
A/swine/Oklahoma/001142/09 (H3N2) – 3A	Y	G	A	S	Y	A	W	H	H	D	L	Y	R	G	V	S	S	I
A/swine/Quebec/4001/2005 (H3N2) – 3A	Y	G	S	S	Y	A	W	H	H	V	L	Y	R	G	V	S	S	I
A/swine/Alberta/14722/2005 (H3N2) – 3A	Y	G	S	S	Y	A	W	H	H	D	L	Y	R	G	V	S	S	I
A/swine/Nebraska/209/98 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	Y	S	W	H	H	E	L	Y	R	G	I	S	S	R
A/Nanjing/2/1982 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	Y	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/Hong Kong/4/1984 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	Y	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/Memphis/1/1986 (H3N2) – 3A	Y	G	G	S	Y	A	W	Y	H	E	L	Y	R	G	L	S	S	R
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3N8) – 3F	Y	G	R	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/canine/Colorado/8880/2006 (H3N8) – 3F	Y	G	R	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/mallard/Sweden/50/2002 (H3N8) – 3B	Y	G	G	S	N	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/mallard/Quebec/11121/2006 (H3N2) – 3C	Y	G	G	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/teal/Oregon/44336-130/2007 (H3N8) – 3C	Y	G	G	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/northern shoveler/California/HKWF979/2007 (H3N3) – 3C	Y	G	G	S	G	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/blue-winged teal/ALB/452/1983 (H3N1) – 3D	Y	G	G	S	S	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/American green-winged teal/Interior Alaska/3/07 (H3N8) – 3D	Y	G	G	S	N	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R
A/sanderling/NJ/1042/2005 (H3N6) – 3D	Y	G	E	S	N	A	W	T	H	E	L	Y	R	G	Q	S	G	R

Tab. A7: HAH3-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	8	22	38	45	63	81	122	126	133	144	165	246	285	483
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2) – 3A	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2) – 3A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2) – 3A	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT61 A/sw/Eggldam/IDT5250/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT67 A/swine/Damme/IDT5673/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	?	-	+	-	+	+	-	+	+
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT98 A/sw/Hiltten/IDT5143/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+

Fortsetzung Tab. A7: HAH3-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	8	22	38	45	63	81	122	126	133	144	165	246	285	483
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT104 A/sw/Salzkotten/IDT5275/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT110 A/sw/Raddestedt/IDT5483/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT122 A/sw/Stadtlonn/IDT5570/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/Port Chalmers/73 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
A/swine/Hungary/13509/2007 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Ukkel/1/1984 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
A/wild_boar/Germany/WS169/06 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/duck/Chabarovsk/1610/1972 (H3N8) – 3A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Italy/7680/2001 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Italy/50127/2007 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Italy/66945/2006 (H3N1) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Italy/297576/2004 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Italy/600/1999 (H3N2) – 3A	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
A/swine/Hong Kong/1144/02 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
A/Hong Kong/1774/99 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
A/swine/Hong Kong/5200/99 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
A/swine/Hong Kong/7982/00 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
A/swine/Hong Kong/9745/01 (H3N2) – 3A	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
A/Kansas/UR07-0110/2008 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A/Brisbane/10/2007 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A/Singapore/39/2009 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A/swine/Ontario/00130/97 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/New York/550/1998 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
A/Panama/2007/1999 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A/Beijing/32/1992 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+

Fortsetzung Tab. A7: HAH3-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	8	22	38	45	63	81	122	126	133	144	165	246	285	483
A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2) – 3B	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
A/swine/Iowa/H02AS8/2002 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/swine/Oklahoma/001142/09 (H3N2) – 3A	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/swine/Quebec/4001/2005 (H3N2) – 3A	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
A/swine/Alberta/14722/2005 (H3N2) – 3A	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/swine/Nebraska/209/98 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
A/Nanjing/2/1982 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/Hong Kong/4/1984 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/Memphis/1/1986 (H3N2) – 3A	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
A/equine/Fontainbleu/1/1979 (H3N8) – 3F	gap	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/canine/Colorado/8880/2006 (H3N8) – 3F	gap	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A/mallard/Sweden/50/2002 (H3N8) – 3B	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/mallard/Quebec/11121/2006 (H3N2) – 3C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/teal/Oregon/44336-130/2007 (H3N8) – 3C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/northern shoveler/California/HKWF979/2007 (H3N3) – 3C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/blue-winged teal/ALB/452/1983 (H3N1) – 3D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/American green-winged teal/Interior Alaska/3/2007 (H3N8) – 3D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A/sanderling/NJ/1042/2005 (H3N6) – 3D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

Tab. A8: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN1

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	118	119	151	152	156	179	180	199	223	225	228	277	278	293	295	368	402	425
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
AR1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
AR2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
AR3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	K	E	R	N	R	Y	E
AR4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT52 A/sw/Voglarn/IDT4096/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E

Fortsetzung Tab: A8: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN1

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	118	119	151	152	156	179	180	199	223	225	228	277	278	293	295	368	402	425
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT83 A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	?	E	R	N	R	Y	E
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT113 A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT127 A/sw/Rotthalmünster/IDT5616/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/blue-winged_teal/Alberta/141/1992 (H1N1) – 1E	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/California/04/2009 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/Mexico/4108/2009 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/Hamburg/4/2009 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/Bayern/63/2009 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/Thailand/271/2005 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Hong_Kong/9656/2001 (H1N1) – 1B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E

Fortsetzung Tab: A8: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN1

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	118	119	151	152	156	179	180	199	223	225	228	277	278	293	295	368	402	425
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1) – 1H	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/chicken/Jiangsu/cz1/2002 (H5N1) – 1J	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Chachoengsao/NIH587/2005 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Chonburi/NIH589/2005 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Hong_Kong/8512/2001 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Italy/66945/2006 (H3N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Italy/1509-6/97 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/1482/99 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Belgium/74/85 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/002007/06 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/016007/05 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/98574/01 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Italy/247578/2004 (H1N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/England/494/2006 (H1N1) – 1A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/Berlin/1/08 (H1N1) – 1A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/WSN/1933 (H1N1) – 1A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/FPV/Rostock/34 (H7N1) – 1C	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/herring_gull/DE/698/1988 (H2N1) – 1D	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Tennessee/82/1977 (H1N1) – 1B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Kyoto/3/1979 (H1N1) – 1B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Shanghai/1/2005 (H1N1) – 1B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/chicken/Scotland/1959 (H5N1) – 1E	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Fujian/2001 (H5N1) – 1J	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E

Fortsetzung Tab: A8: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN1

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	118	119	151	152	156	179	180	199	223	225	228	277	278	293	295	368	402	425
A/chicken/Hong_Kong/17/1977 (H6N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/New Jersey/1976 (H1N1) – 1B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/ruddy turnstone/DE/2731/1987 (H9N1) – 1D	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/chicken/Hebei/718/2001 (H5N1) – 1F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/mallard/Netherlands/22/2007 (H7N1) – 1K	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/duck/Nanchang/1904/1992 (H7N1) – 1L	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/duck/Mongolia/867/2002 (H7N1) – 1H	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/IL/00685/2005 (H1N1) – 1A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/swine/Saskatchewan/18789/02 (H1N1) – 1E	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/chicken/Taiwan/0107/02 (H6N1)	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) – 1G	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/goose/Vietnam/3/05 (H5N1) – 1G	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E
A/turkey/England/50-92/91 (H5N1) – 1I	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	Y	E

Tab. A9: NAN1-Glykosylierungsmuster; +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht vorhanden

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	42	44	50	58	63	68	88	146	235	341	381	386	434	455
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	gap	-
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
AR1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
AR2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
AR3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
AR4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	gap	-
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT52 A/sw/Voglar/IDT4096/05 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-

Fortsetzung Tab. A9: NAN1-Glykosylierungsmuster; +: Glykosylierungssequon vorhanden; -: Glykosylierungssequon nicht vorhanden

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	42	44	50	58	63	68	88	146	235	341	381	386	434	455
DT83 A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1) – 1F	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1) – 1F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT113 A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1) – 1F	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1) – 1F	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1) – 1F	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1) – 1F	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT127 A/sw/Rothalmünster/IDT5616/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1) – 1F	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/blue-winged teal/Alberta/141/1992 (H1N1) – 1E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/California/04/2009 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/Mexico/4108/2009 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/Hamburg/4/2009 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/Bayern/63/2009 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/Thailand/271/2005 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Hong Kong/9656/2001 (H1N1) – 1B	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1) – 1H	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/chicken/Jiangsu/cz1/2002 (H5N1) – 1J	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Chachoengsao/NIAH587/2005 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Chonburi/NIAH589/2005 (H1N1) – 1F	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-

Fortsetzung Tab. A9: NAN1-Glykosylierungsmuster; +: Glykosylierungssequon vorhanden; -: Glykosylierungssequon nicht vorhanden

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	42	44	50	58	63	68	88	146	235	341	381	386	434	455
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Hong_Kong/8512/2001 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	gap	-
A/swine/Italy/66945/2006 (H3N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Italy/1509-6/97 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Cotes_dArmor/1482/99 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Belgium/74/85 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Cotes_dArmor/002007/06 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Cotes_dArmor/016007/05 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Cotes_dArmor/98574/01 (H1N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/swine/Italy/247578/2004 (H1N1) – 1F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	gap	-
A/England/494/2006 (H1N1) – 1A	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
A/Berlin/1/08 (H1N1) – 1A	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
A/WSN/1933 (H1N1) – 1A	-	+	-	gap	gap	gap	+	-	+	-	-	-	gap	-
A/FPV/Rostock/34 (H7N1) – 1C	-	-	+	gap	gap	gap	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/herring_gull/DE/698/1988 (H2N1) – 1D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Tennessee/82/1977 (H1N1) – 1B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Kyoto/3/1979 (H1N1) – 1B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Shanghai/1/2005 (H1N1) – 1B	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/chicken/Scotland/1959 (H5N1) – 1E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Fujian/2001 (H5N1) – 1J	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/chicken/Hong_Kong/17/1977 (H6N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/New Jersey/1976 (H1N1) – 1B	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/ruddy turnstone/DE/2731/1987 (H9N1) – 1D	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/chicken/Hebei/718/2001 (H5N1) – 1F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	gap	-
A/mallard/Netherlands/22/2007 (H7N1) – 1K	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/duck/Nanchang/1904/1992 (H7N1) – 1L	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/duck/Mongolia/867/2002 (H7N1) – 1H	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/IL/00685/2005 (H1N1) – 1A	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+

Fortsetzung Tab. A9: NAN1-Glykosylierungsmuster; +: Glykosylierungssequon vorhanden; -: Glykosylierungssequon nicht vorhanden

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	42	44	50	58	63	68	88	146	235	341	381	386	434	455
A/chicken/Taiwan/0107/02 (H6N1) -	gap	gap	gap	+	+	gap	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/swine/Saskatchewan/18789/02 (H1N1) - 1E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	gap	-
A/goose/Vietnam/3/05 (H5N1) - 1G	-	-	+	gap	gap	gap	+	+	-	-	-	-	gap	-
A/turkey/England/50-92/91 (H5N1) - 1I	gap	gap	gap	gap	gap	gap	+	+	+	-	-	-	gap	-

Tab. A10: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN2

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	118	119	151	152	156	178	179	198	222	224	227	276	277	292	294	371	372	406	425
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT7 A/sw/Dötlingen/IDT4735/05 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT28 A/sw/Herzen/IDT4317/05 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2) - 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E

Fortsetzung Tab. A10: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN2

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	118	119	151	152	156	178	179	198	222	224	227	276	277	292	294	371	372	406	425
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT45 A/sw/Dötlingen/IDT3780/05 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT60 A/sw/Stadtlohn/IDT3853/05 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT61 A/sw/Eggelham/IDT5250/05 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT67 A/sw/Damme/IDT5673/2006 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT98 A/sw/Hiltten/IDT5143/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT104 A/sw/Salzhausen/IDT5275/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E

Fortsetzung Tab. A10: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN2

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	118	119	151	152	156	178	179	198	222	224	227	276	277	292	294	371	372	406	425
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT110 A/sw/Raddestedt/IDT5483/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT114 A/sw/Rotthalmünster/IDT5536/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT122 A/sw/Stadthohn/IDT5570/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Saraburi/NIAH13021/2005 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Hong Kong/1197/02 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Hong Kong/1774/99 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Korea/C13/2008 (H5N2) – 2D	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Port Chalmers/73 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/mallard/Postdam/178-4/83 (H2N2) – 2C	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Hong Kong/5212/99 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Hungary/13509/07 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Italy/636/87 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Italy/1461/96 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Belgium/220/92 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Italy/2064/99 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/UnitedKingdom/119404/91 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/604/99 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/790/97 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Morbihan/0028/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Italy/1475/96 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/wild_boar/Germany/WS169/2006 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/0040/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Cotes_dArmor/0111/2007 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/sw/Flanders/1/98 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/sw/Gent/1/84 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/sw/Gent/108/01 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E

Fortsetzung Tab. A10: Aktives Zentrum und angrenzende Aminosäuren im NAN2

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	118	119	151	152	156	178	179	198	222	224	227	276	277	292	294	371	372	406	425
A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/Singapore/1/1957 (H2N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Leningrad/134/1957 (H2N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Turkey/California/189/66 (H9N2) – 2F	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Bangkok/1/1979 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Johannesburg/33/94 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Swine/Iowa/930/01 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Minnesota/55551/00 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/HongKong/1110/06 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Sydney/5/1997 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Finistere/127/99 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Oklahoma/053259/2008 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/swine/Manitoba/12707/2005 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/swine/Ontario/48235/04 (H1N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Wellington/01/2004 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/Singapore/39/2009 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/Kansas/UR07-0110/2008 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/Thuringen/2202/2008 (H3N2) – 2A	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	L	Y	E
A/chicken/Italy/312/1997 (H5N2) – 2D	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/duck/New York/445743/2006 (H5N2) – 2D	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/quail/Dubai/301/2000 (H9N2) – 2E	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	A	Y	E
A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) – 2E	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/duck/Shantou/1197/2001 (H6N2) – 2I	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/chicken/Taiwan/A703-1/2008 (H5N2) – 2G	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E
A/chicken/Shanghai/10/01 (H9N2) – 2B	R	E	D	R	R	W	S	D	I	R	E	E	E	R	N	R	S	Y	E

Tab. A11: NAN2-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT1 A/sw/Nordwaide/IDT2197/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Fortsetzung Tab. A11: NAN2-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT7 A/sw/Döttingen/IDT4735/05 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT45 A/sw/Döttingen/IDT3780/05 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT60 A/sw/Stadtlöhn/IDT3853/05 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT61 A/sw/Egglham/IDT5250/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT67 A/sw/Damme/IDT5673/2006 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Fortsetzung Tab. A11: NAN2-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT98 A/sw/Hiltten/IDT5143/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT104 A/sw/Salzkotten/IDT5275/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT110 A/sw/Raddestedt/IDT5483/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT114 A/sw/Rothalmünster/IDT5536/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT122 A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Saraburi/NIH13021/2005 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
A/swine/Hong Kong/1197/02 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
A/Hong Kong/1774/99 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Korea/C13/2008 (H5N2) – 2D	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Port Chalmers/73 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/mallard/Postdam/178-4/83 (H2N2) – 2C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Fortsetzung Tab. A11: NAN2-Glykosylierungsmuster. +: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) – Genotyp	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
A/Swine/Hong Kong/5212/99 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Hungary/13509/07 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A/swine/Italy/636/87 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A/swine/Italy/1461/96 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Belgium/220/92 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Italy/2064/99 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/UnitedKingdom/119404/91 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Cotes_dArmor/604/99 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Cotes_dArmor/790/97 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
A/swine/Morbihan/0028/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Italy/1475/96 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/wild_boar/Germany/WS169/2006 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Cotes_dArmor/0040/2007 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Cotes_dArmor/0111/2007 (H1N2) – 2A	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
A/sw/Flanders/1/98 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/sw/Gent/1/84 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/sw/Gent/108/01 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2) – 2A	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Singapore/1/1957 (H2N2) – 2A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Leningrad/134/1957 (H2N2) – 2A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Turkey/California/189/66 (H9N2) – 2F	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Bangkok/1/1979 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Johannesburg/33/94 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Iowa/930/01 (H1N2) – 2A	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A/swine/Minnesota/55551/00 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A/swine/HongKong/1110/06 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A/Sydney/5/1997 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Finistere/127/99 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Oklahoma/053259/2008 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
A/swine/Manitoba/12707/2005 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/swine/Ontario/48235/04 (H1N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Wellington/01/2004 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Singapore/39/2009 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Kansas/UR07-0110/2008 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Thueringen/2202/2008 (H3N2) – 2A	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/chicken/Italy/312/1997 (H5N2) – 2D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/duck/New York/445743/2006 (H5N2) – 2D	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Fortsetzung Tab. A11: NAN2-Glykosylierungsmuster

+: Glykosylierungssequon N-X-S/T vorhanden; -: Glykosylierungssequon N-X-S/T nicht nachweisbar

Virusstamm (Subtyp) - Genotyp	32	44	48	61	69	70	86	146	200	234	309	313	358	402	414
A/quail/Dubai/301/2000 (H9N2) – 2E	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) – 2E	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/duck/Shantou/1197/2001 (H6N2) – 2I	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A/chicken/Taiwan/A703-1/2008 (H5N2) – 2G	-	-	-	gap	gap	gap	+	+	+	-	-	-	-	+	+
A/chicken/Shanghai/10/01 (H9N2) – 2B	-	+	-	gap	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-

Tab. A12: M2-Polymorphismus der Aminosäuren 26, 27, 30, 31, 34 und 77

Virusstamm (Subtyp)	26	27	30	31	34	77
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1)	L	A	A	N	G	Q
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1)	L	A	A	N	G	Q
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2=)	L	V	A	N	G	Q
por13 A/sw/Bakum/1833/00 (H1N)	L	V	A	N	G	Q
AR-1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
AR-2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
AR-3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
AR-4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT7 A/sw/Döttingen/IDT4735/05 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2)	I	A	A	N	G	Q
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT29 A/sw/Müsleringen-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1)	I	T	A	N	G	Q
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT45 A/sw/Döttingen/IDT3780/05 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT52 A/sw/Voglar/IDT4096/05 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q

Fortsetzung Tab. A12: M2-Polymorphismus der Aminosäuren 26, 27, 30, 31, 34 und 77

Virusstamm (Subtyp)	26	27	30	31	34	77
DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT60 A/sw/Stadtlohn/IDT3853/05 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT61 A/sw/Eggldam/IDT5250/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT62 A/sw/Bad Griesbach/IDT4191/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
DT67 A/sw/Damme/IDT5673/2006 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/2007 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/2007 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/2006 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2)	I	A	A	N	G	Q
DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/2007 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT83 A/sw/Brakel-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT85 A/sw/Ense-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2)	I	A	A	N	G	Q
DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT88 A/sw/Meppen-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2)	I	A	A	N	G	Q
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1)	I	T	A	N	G	Q
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT98 A/sw/Hilten/IDT5143/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT99 A/sw/Ortensburg/IDT5144/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT100 A/sw/Bad Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT104 A/sw/Salzotten/IDT5275/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)	I	A	A	N	G	Q
DT110 A/sw/DDstedt/IDT5483/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT113 A/sw/Bocholt-Barlo/IDT5533/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT114 A/sw/Rothalmünster/IDT5536/06 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT122 A/sw/Stadtlohn/IDT5570/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
DT124 A/sw/Balve/IDT5603/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT127 A/sw/Rothalmünster/IDT5616/06 (H1N1)	I	T	A	N	G	Q
DT128 A/sw/Feldbach Austria/IDT5625/06 (H1N1)	I	T	A	N	G	Q

Fortsetzung Tab. A12: M2-Polymorphismus der Aminosäuren 26, 27, 30, 31, 34 und 77

Virusstamm (Subtyp)	26	27	30	31	34	77
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2)	I	A	A	N	G	Q
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Hong Kong/1197/02 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Chachoengsao/NIAH587/2005 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Chonburi/NIAH589/2005 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Saraburi/NIAH13021/2005 (H1N2)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Hong Kong/9656/2001 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/California/04/2009 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/Mexico/4108/2009 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/Hamburg/4/2009 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/Bayern/63/2009 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/blue-winged teal/Alberta/141/1992 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/gadwall/Ohio/37/1999 (H6N2)	L	V	A	S	G	R
A/pintail/Alberta/84/2000 (H11N9)	L	V	A	S	G	R
A/Thailand/271/2005 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/Beijing/262/1995 (H1N1)	L	T	A	N	G	R
A/Moscow/10/1999 (H3N2)	L	V	A	N	G	R
A/Wellington/01/2004 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
A/Port Chalmers/73 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
A/mallard/Postdam/178-4/83 (H2N2)	L	I	A	S	G	R
A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/chicken/Jiangsu/cz1/2002 (H5N1)	L	V	A	S	G	R
A/swine/Tennessee/82/1977 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/swine/Shanghai/1/2005 (H1N1)	L	I	A	S	G	R
A/swine/Nebraska/209/98 (H3N2)	L	I	A	S	G	R
A/swine/Manitoba/12707/2005 (H3N2)	L	I	A	S	G	R
A/herring gull/DE/12/88 (H16N3)	L	V	A	S	G	Q
A/red-necked stint/AUS/4500/1980 (H3N8)	L	V	A	S	G	R
A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Cotes_dArmor/790/97 (H1N2)	F	V	A	N	G	Q
A/swine/Cotes_dArmor/3633/84 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
A/swine/Italy/670/1987 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Spain/50047/2003 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2)	L	A	A	N	G	Q
A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1)	I	A	A	N	G	Q
A/swine/England/191973/92 (H1N7)	L	V	A	S	G	R
A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	L	V	A	S	G	R
A/shorebird/DE/68/2004 (H13N9)	L	V	A	S	G	Q
A/swine/Iowa/1/1985 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/Roma/1949 (H1N1)	L	V	A	S	G	R
A/swine/Czech Republic/1/1975 (H3N2)	L	V	A	S	G	R
A/turkey/Germany/3/91 (H1N1)	L	V	A	N	G	Q
A/wild boar/Germany/WS169/2006 (H3N2)	L	V	A	N	G	Q
A/equine/Argentina/1/1977 (H7N7)	L	V	A	S	G	R
A/equine/Kentucky/1a/1975 (H7N7)	L	V	A	S	G	R
A/swine/Korea/CY02/02 (H1N2)	L	I	A	S	G	R
A/swine/Wisconsin/194/80 (H3N2)	L	V	A	S	G	R

Tab. A13: Trunkierungen im NS1

Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]	Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]
por1 A/sw/Jena/5/96 (H3N2)	230	DT39 A/sw/Löningen/IDT2530/03 (H1N2)	230
por2 A/sw/Karrenzien/2/87 (H3N2)	230	DT40 A/sw/Ehren/IDT2570/03 (H1N2)	230
por3 A/sw/Bakum/8602/99 (H3N2)	230	DT41 A/sw/IVD/IDT2674/03 (H1N2)	230
por4 A/sw/Potsdam/35/82 (H3N2)	230	DT42 A/sw/Gescher/IDT2702/03 (H1N2)	230
por6 A/sw/Lohne/1/97 (H3N2)	230	DT43 A/sw/Stolzenau/IDT3296/04 (H1N2)	230
por7 A/sw/Leipzig/145/92 (H3N2)	230	DT44 A/sw/Nortrup/IDT3685/04 (H1N2)	230
por8 A/sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	230	DT45 A/sw/Dötlingen/IDT3780/05 (H1N2)	230
por9 A/sw/Schwerin/103/89 (H1N1)	230	DT47 A/sw/Visbek/IDT2869/03 (H1N2)	230
por10 A/sw/Bakum/5/95 (H1N1)	230	DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 H1N1	230
por11 A/sw/Belzig/2/01 (H1N1)	230	DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 Plaque 3	230
por12 A/sw/Bakum/1832/00 (H1N2)	230	DT48 A/sw/Greven/IDT2889/04 Plaque 4	230
por13 A/sw/Bakum/1833/00 H1N2	230	DT49 A/sw/Granstedt/IDT3475/04 (H1N2)	230
AR1 A/sw/Arnsberg/6554/1979 (H1N1)	230	DT50 A/sw/Laer/IDT3893/05 (H1N1)	230
AR2 A/sw/Arnsberg/902/81 (H1N1)	230	DT51 A/sw/Gent/7625/99 (H1N2)	230
AR3 A/sw/Arnsberg/623/81 (H1N1)	230	DT52 A/sw/Voglarn/IDT4096/05 (H1N1)	217
AR4 A/sw/Arnsberg/624/81 (H1N1)	230	DT53 A/sw/Wohlerst/IDT4093/05 (H1N1)	230
DT1 A/sw/Nordwalde/IDT2197/03 (H1N2)	230	DT54 A/sw/Kroge/IDT4192/05 (H1N1)	217
DT2 A/sw/Gudensberg/IDT2930/04 (H1N2)	230	DT55 A/sw/Wedel/IDT2965/04 (H1N1)	230
DT3 A/sw/Gudensberg/IDT2931/04 (H1N2)	230	DT56 A/sw/Seesen/IDT3055/04 (H3N2)	230
DT4 A/sw/Waltersdorf/IDT2527/03 (H1N2)	230	DT57 A/sw/Lohne/IDT3357/04 (H3N2)	217
DT5 A/sw/Norden/IDT2308/03 (H1N2)	230	DT58 A/sw/Osterhofen/IDT4004/05 (H3N2)	217
DT7 A/sw/Dötlingen/IDT4735/05 (H1N2)	217	DT59 A/sw/Spenge/IDT3805/05 (H1N2)	230
DT8 A/sw/Cloppenburg/IDT4777/05 (H1N2)	217	DT60 A/sw/Stadtlahn/IDT3853/05 (H1N2)	230
DT9 A/sw/Potsdam/1/81 (H1N1)	230	DT61 A/sw/Egglham/IDT5250/05 (H3N2)	217
DT10 A/sw/Potsdam/268/81 (H1N1)	230	DT62 A/sw/B. Griesbach/IDT4191/05 (H3N2)	217
DT12 A/sw/Geldern/IDT2888/04 (H1N1)	230	DT63 A/sw/Laer/IDT4126/05 (H3N2)	230
DT15 A/sw/Vechta/2623/03 (H1N1)	230	DT64 A/sw/Merzen/IDT4114/05 (H3N2)	217
DT17 A/sw/Bakum/1769/03 (H3N2)	217	DT65 A/sw/Harkenblek/IDT4097/05 (H1N1)	217
DT20 A/sw/Bakum/909/93 (H3N2)	230	DT66 A/sw/Gent/V230/92 (H1N1)	230
DT21 A/sw/Belzig/54/01 (H3N2)	217	DT67 A/sw/Damme/IDT5673/2006 (H3N2)	217
DT22 A/sw/Nordkirchen/IDT1993/03 (H3N2)	230	DT68 A/sw/Groitzsch/IDT6016-1/07 (H1N2)	230
DT23 A/sw/Berlin/1578/00 (H3N2)	217	DT69 A/sw/Groitzsch/IDT6016-2/07 (H1N2)	230
DT24 A/sw/Bissendorf/IDT1864/03 (H3N2)	217	DT70 A/sw/Ennigerloh/IDT5803/06 (H1N1)	217
DT25 A/sw/Bakum/1362/98 (H3N2)	230	DT71 A/sw/Melle/IDT5706/2006 (H3N2)	230
DT26 A/sw/Gent/1/84 (H3N2)	230	DT78 A/sw/Bondelum/IDT5959/07 (H3N2)	217
DT27 A/sw/Damme/IDT2890/04 (H3N2)	230	DT79 A/sw/Visbek/IDT3311/2004 (H1N2)	230
DT28 A/sw/Hertzen/IDT4317/05 (H3N2)	230	DT80 A/sw/Riege/IDT6014/2007 (H1N2)	230
DT29 A/sw/M.-Stolzenau/IDT4263/05 (H3N2)	230	DT81 A/sw/Dinklage/IDT6017/2007 (H1N2)	230
DT30 A/sw/Haselünne/IDT2617/03 (H1N1)	230	DT82 A/sw/Kitzen/IDT6142/2007 (H1N2)	230
DT33 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/06 (H1N1)	230	DT83 A/sw/B.-Gehrden/IDT4806/06 (H1N1)	230
DT34 A/sw/Herzlake/IDT5335/06 (H3N2)	217	DT84 A/sw/Günne/IDT4847/06 (H1N1)	217
DT35 A/sw/Herzlake/IDT5336/06 (H3N2)	217	DT85 A/sw/E.-Volbringen/IDT4848/06 (H1N1)	230
DT36 A/sw/Herzlake/IDT5337/06 (H3N2)	217	DT86 A/sw/Borgentreich/IDT4858/06 (H3N2)	217
DT38 A/sw/England/17394/96 (H1N2)	230	DT87 A/sw/Hilkenbrock/IDT4917/06 (H3N2)	217
DT88 A/sw/M.-Teglingen/IDT4919/06 (H1N1)	217	A/gadwall/Ohio/37/1999 (H6N2)	230
DT90 A/sw/Asendorf/IDT4966/06 (H3N2)	217	A/pintail/Alberta/84/2000 (H11N9)	230
DT91 A/sw/Melle/IDT5003/06 (H1N1)	230	A/Thailand/271/2005 (H1N1)	219
DT92 A/sw/Daseburg/IDT5022/06 (H3N2)	217	A/swine/Korea/C13/2008 (H5N2)	230
DT93 A/sw/Lichtenau/IDT5045/06 (H1N1)	217	A/Moscow/10/1999(H3N2)	230
DT94 A/sw/Nordkirchen/IDT5062/2006(H1N1)	217	A/Wellington/01/2004(H3N2)	230
DT95 A/sw/Holzheim/IDT5102/06 (H1N1)	217	A/Port Chalmers/73 (H3N2)	237
DT96 A/sw/Spenge/IDT5117/06 (H3N2)	230	A/goose/Italy/296426/2003 (H1N1)	230
DT97 A/sw/Steinhorst/IDT5129/06 (H1N1)	230	A/chicken/Jiangsu/cz1/2002 (H5N1)	230
DT98 A/sw/Hiltten/IDT5143/06 (H3N2)	217	A/mallard/Postdam/178-4/83 (H2N2)	230
DT99 A/sw/Ortenburg/IDT5144/06 (H1N1)	230	A/herring gull/DE/712/88 (H16N3)	230
DT100 A/sw/B. Rothenfelde/IDT5179/06 (H3N2)	217	A/shorebird/Delaware/168/06 (H16N3)	230
DT101 A/sw/Melle/IDT5190/06 (H3N2)	217	A/swine/Tennessee/82/1977 (H1N1)	219
DT102 A/sw/Gescher/IDT5194/06 (H3N2)	217	A/swine/Shanghai/1/2005 (H1N1)	219
DT103 A/sw/Nienburg/IDT5208/06 (H3N2)	217	A/Swine/Nebraska/209/98 (H3N2)	219

Fortsetzung Tab. A13: Trunkierungen im NS1

Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]	Virusstamm (Subtyp)	Größe [AS]
DT104 A/sw/Salzotten/IDT5275/06 (H3N2)	217	A/swine/Manitoba/12707/2005 (H3N2)	219
DT106 A/sw/Raffelsdor/IDT5418/06 (H3N2)	217	A/equine/Prague/1/1956 (H7N7)	230
DT107 A/sw/Büren/IDT5439/06 (H3N2)	217	A/swine/Iowa/15/1930 (H1N1)	230
DT108 A/sw/Hamstrub/IDT5445/06 (H3N2)	217	A/red-necked stint/AUS/4500/1980 (H3N8)	230
DT109 A/sw/Schmerlecke/IDT5477/06 (H3N2)	230	A/swine/Hong Kong/168/1993 (H1N1)	230
DT110 A/sw/Raddestedt/IDT5483/06 (H3N2)	217	A/swine/Ille_at_Villaine/1455/99 (H1N19)	230
DT111 A/sw/Südlohn/IDT5508/06 (H1N1)	217	A/swine/Finistere/127/99 (H3N2)	230
DT112 A/sw/Ostercappeln/IDT5518/06 (H1N2)	230	A/swine/Cotes_dArmor/1121/00 (H1N1)	230
DT113 A/sw/Bochoit-Barlo/IDT5533/06 (H1N1)	230	A/swine/Belgium/WVL5/1989 (H1N1)	230
DT114 A/sw/Rothalmünster/IDT5536/06 (H1N2)	230	A/swine/Denmark/WVL9/1993 (H1N2)	230
DT115 A/sw/Ramsberg/IDT5544/06 (H1N1)	230	A/swine/France/WVL4/1985 (H1N1)	230
DT116 A/sw/Friesoythe/IDT5548/06 (H1N1)	217	A/swine/France/WVL13/1995 (H1N1)	230
DT117 A/sw/Friesoythe/IDT5549/06 (H1N1)	217	A/swine/France/WVL8/1992 (H1N1)	230
DT118 A/sw/Kassel/IDT5550/06 (H1N1)	217	A/swine/Cotes_dArmor/3633/84 (H3N2)	230
DT119 A/sw/Altenaffeln/IDT5551/06 (H1N1)	217	A/swine/Cotes_dArmor/790/97 (H1N2)	230
DT120 A/sw/Ostercappeln/IDT5553/06 (H1N1)	217	A/wild_boar/Germany/WS169/06 (H3N2)	230
DT121 A/sw/Herbrunn/IDT5564/06 (H3N2)	217	A/swine/Hungary/13509/2007 (H3N2)	217
DT122 A/sw/Stadthorn/IDT5570/06 (H3N2)	217	A/swine/Hungary/19774/2006 (H1N1)	230
DT124 A/sw/Balve/5603/06 (H1N1)	230	A/swine/Italy/66945/2006 (H3N1)	230
DT126 A/sw/Gütersloh/IDT5610/06 (H1N1)	230	A/swine/Italy/670/1987 (H1N1)	230
DT127 A/sw/Rothalmünster/IDT5616/06 (H1N1)	230	A/swine/Italy/4320/2002 (H1N1)	230
DT128 A/sw/Feldb. Austria/IDT5625/06 (H1N1)	230	A/swine/Italy/1523/98 (H3N2)	237
DT129 A/sw/Geseke/IDT5638/06 (H1N2)	230	A/Swine/Spain/50047/2003 (H1N1)	230
DT130 A/sw/Schloss Holte/IDT5647/06 (H1N1)	217	A/swine/Spain/33601/2001 (H3N2)	230
DT131 A/sw/Nordhorn/IDT5657/06 (H1N1)	217	A/swine/Spain/39139/2002 (H3N2)	230
DT132 A/sw/Halern-Sythen/IDT5670/06 (H1N2)	230	A/swine/Spain/WVL6/1991 (H1N1)	230
DT135 A/sw/Velen/IDT5730/06 (H1N2)	230	A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2)	217
DT136 A/sw/Reken/IDT5731/06 (H3N2)	217	A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1)	230
AK1 A/sw/Netherlands/25/1980 (H1N1)	230	A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1)	217
MS-59 A/sw/IDT/Gent/V220/92 (H3N2)	230	A/swine/Spain/42386/2002 (H3N2)	217
MS-60 A/sw/Gent/V229/92 (H3N2)	230	A/swine/England/WVL15/1997 (H1N1)	230
A/turkey/Canada/1963 (H6N8)	230	A/swine/Scotland/WVL17/1999 (H1N1)	230
A/Hong Kong/1774/99 (H3N2)	230	A/swine/England/WVL10/1993 (H1N1)	230
A/swine/Hong Kong/1197/02 (H3N2)	230	A/swine/England/WVL11/1994 (H1N1)	230
A/swine/Zhejiang/1/2007 (H1N1)	230	A/swine/England/WVL12/1995 (H1N1)	230
A/swine/Chachoengsao/NIAH587/2005 (H1N1)	230	A/swine/England/WVL7/1992 (H1N1)	230
A/swine/Chonburi/NIAH589/2005 (H1N1)	230	A/swine/Scotland/410440/94 (H1N2)	230
A/swine/Saraburi/NIAH13021/2005 (H1N2)	219	A/Cottbus/1/1964 (H2N2)	237
A/swine/Hong Kong/9656/2001 (H1N1)	230	A/duck/Hong Kong/342/1978 (H5N2)	230
A/California/04/2009 (H1N1)	219	A/Roma/1949 (H1N1)	237
A/Mexico/4108/2009 (H1N1)	219	A/equine/Berlin/1/1989 (H3N8)	230
A/Hamburg/4/2009 (H1N1)	219	A/equine/Sao Paulo/4/1976 (H7N7)	230
A/Bayern/63/2009 (H1N1)	219	A/chicken/Germany/n/1949 (H10N7)	230
A/blue-winged teal/Alberta/14/1992 (H1N1)	230	A/northern shoveler/California/27820/07 (H7N3)	230
A/chicken/Nigeria/228-10/2006 (H5N1)	237	A/swine/Thailand/CU-SA412/2010 (H1N1)	219

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Folgende Personen haben mich unentgeltlich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt:

Prof. Dr. med. habil. Peter Wutzler
Prof. Dr. rer. nat. Roland Zell
PD Dr. med. Andi Krumbholz
PD Dr. rer. nat. Michaela Schmidtke
Dr. rer. nat. Michael Schacke
Dr. rer. nat. Eckhard Birch-Hirschfeld
Dr. med. vet. Ralf Dürrwald
Dr. med Jürgen Stech
Prof. Dr. rer. nat. Stefan Ludwig
Dr. rer. med. Marco Groth
Dipl.-Biochem. Jeannette Lange
Dipl.-Biol. Nadine Wiesener
Dipl.-Biol. Susann Motzke
Dipl.-Biol. Silke Bergmann
Dipl.-Biol. Constanze Steglich
Dipl.-Biol. Katja Bauer
TA Martina Müller
TA Ivonne Heinze

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen, des weiteren hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für die Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung noch als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, 31.08.2011

Anja Philipps

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Philipps
Geburtsdatum: 13.10.1981
Geburtsort: Gera
Familienstand: ledig

Ausbildung

1988-1989 Erich-Weinert-Oberschule, Gera
1989-1991 Eugen-Selbmann-Oberschule, Gera
1991-1992 4. Grundschule, Gera
1992-2000 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium, Gera
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000-2001 Freiwilliges Ökologisches Jahr
2001-2007 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
Diplomarbeit am Institut für Virologie und Antiviraler Therapie der FSU Jena: „*Molekulare Typisierung von Varizella-Zoster-Virus-Stämmen in Deutschland*“
Abschluss: Diplom-Biologin
2007-2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie und Antiviraler Therapie des Universitätsklinikums Jena

Veröffentlichungen

Publikationen:

Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. Krumbholz A, **Philipps A**, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. Med Microbiol Immunol. 2011 May; 200(2):69-75.

Monitoring prevalence of varicella-zoster virus clades in Germany. A. Sauerbrei, J. Stefanski, **A. Philipps**, A. Krumbholz, R. Zell, P. Wutzler. Med Microbiol Immunol. 2011 May; 200(2):99-107.

Genotypes of varicella-zoster virus wild-type strains in Germany. Sauerbrei A, Zell R, **Philipps A**, Wutzler P. J Med Virol. 2008 Jun; 80(6):1123-30.

Genotyping of varicella-zoster virus strains after serial passages in cell culture. Sauerbrei A, **Philipps A**, Zell R, Wutzler P. J Virol Methods. 2007 Oct; 145(1):80-3.

Tagungsbeiträge:

Vortrag

Genotyping of varicella-zoster virus wild-type strains from varicella and zoster in Germany. Philipps A, Hild R, Sauerbrei A, Zell R, Wutzler P. 2nd Workshop Clinical Virology, Schloss Zeilitzheim Würzburg, 2008

Poster

Application of Illumina next generation sequencing technology to genotyping of influenza A viruses. Philipps A, Groth M, Dürrwald R, Krumbholz A, Zell R. 2nd International Influenza Meeting, Münster, 2010

Genotyping of varicella-zoster virus wild-type strains in Germany using the scattered SNP method. Philipps A, Hild R, Sauerbrei A, Zell R, Wutzler P. 18th Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Uniklinikums Jena durchgeführt. Hierfür möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Wutzler bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Zell, für die Möglichkeit im Rahmen eines BMBF-Projektes diese Arbeit anfertigen zu können sowie für die exzellente Betreuung, fachliche Anleitung und Unterstützung.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei Dr. Ralf Dürrwald für die Bereitstellung der Virussuspensionen, bei Dr. Marco Groth und Ivonne Heinze für die Möglichkeit und Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Illumina-Sequenzierung sowie bei Dr. Jürgen Stech und Dr. Stefan Ludwig für die Bereitstellung der Plasmide. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Birch-Hirschfeld für die Synthetisierung zahlreicher Primer sowie bei Dr. Michael Schacke für die Bereitstellung der Zellkulturen bedanken.

Großer Dank gebührt Martina Müller, Dipl.-Biochem. Jeannette Lange, PD Andi Krumbholz und Dipl.-Biol. Nadine Wiesener für die sehr gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft bei den experimentellen Arbeiten sowie die harmonische Atmosphäre im Labor und darüber hinaus.

Schließlich möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung danken.