

**Analyse der genetischen Kompatibilität  
porciner, humaner und aviärer  
Influenza A-Viren und Charakterisierung  
generierter Influenzavirus-Reassortanten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dipl. Biol. Christian Holdack

aus Berlin

2017

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Dr. Brunhilde Schweiger, PD Dr. Thorsten Wolff und Dr. Barbara Biere im Nationalen Referenzzentrum für Influenza (FG17/ Influenzaviren und weitere Viren des Respirationstraktes) am Robert Koch-Institut angefertigt. Die wissenschaftlichen Experimente wurden mit einer pandemiebedingten Unterbrechung von mehreren Monaten im Zeitraum von Dezember 2008 bis Oktober 2012 durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Datum der Einreichung: 27. Januar 2017

Datum der Disputation: 16. Mai 2017

*für Jonas und Rike*

*Sollen sich auch alle schämen,  
die gedankenlos sich der Wunder der Wissenschaft und Technik bedienen,  
und nicht mehr davon geistig erfasst haben  
als die Kuh von der Botanik der Pflanzen, die sie mit Wohlbehagen frisst.*

*Albert Einstein*

*(August 1930)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Influenzaviren.....	5
1.2 Influenza A-Viren .....	6
1.2.1 Aufbau der Viruspartikel und Organisation des Genoms.	6
1.2.2 Virale Proteine .....	8
1.2.3 Replikationszyklus .....	15
1.2.4 Evolutionsmechanismen der Influenza A-Viren .....	17
1.3 Wirtsspektrum und Speziesbarriere .....	19
1.4 Epidemiologie .....	22
1.4.1 Epidemiologie humaner Influenza A-Viren .....	22
1.4.2 Epidemiologie porciner Influenza A-Viren .....	23
1.4.3 Epidemiologie aviärer Influenza A-Viren .....	24
1.5 Pandemien humaner Influenza A-Viren .....	27
1.6 Nicht-adaptive Immunantwort der Zelle auf eine Infektion mit Influenza A-Viren.....	29
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	30
<b>Material</b> .....	<b>32</b>
2.1 Virusstämme .....	32
2.2 Zelllinien .....	33
2.3 Bakterienstämme .....	33
2.4 Kulturmedien, Puffer, Suspensionen und Lösungen.....	33
2.5 Chemikalien und Reagenzien .....	35
2.6 Oligonukleotide.....	36
2.7 Plasmide .....	41
2.8 Enzyme und Kits .....	42
2.9 Kunststoffverbrauchsmaterialien .....	42
2.10 Laborgeräte.....	43
2.11 Software und Datenbanken .....	44
<b>Methoden</b> .....	<b>45</b>
3.1 Extraktion viraler RNA .....	45
3.2 cDNA-Synthese.....	45
3.3 DNA-Amplifikation mittels PCR.....	46
3.3.1 Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente .....	46
3.3.2 Kolonie-PCR.....	48
3.3.3 PCR für nachfolgende Pyrosequenzierung .....	49

3.4	Qualitative Agarosegelelektrophorese .....	49
3.5	Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden .....	50
3.5.1	Aufreinigung durch präparative Agarosegel-Elektrophorese.....	50
3.5.2	Aufreinigung durch DNA-bindende Membranen .....	50
3.6	DNA-Quantifizierung durch photometrische Bestimmung .....	51
3.7	DNA-Sequenzierung .....	51
3.7.1	DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	51
3.7.2	Pyrosequenzierung .....	52
3.8	Restriktionsenzymatischer Verdau von PCR-Produkten und Plasmiden .....	53
3.9	Klonierung von viralen cDNAs in den pHW2000-Vektor .....	54
3.10	Transformation von Bakterien .....	55
3.11	Kultivierung von Bakterien .....	56
3.12	Glycerinstocks transformierter Bakterien anlegen .....	56
3.13	Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen.....	56
3.14	Kultivierung von Zellen .....	56
3.15	Bestimmung der Zellkonzentration in Suspensionen ...	57
3.16	Virusanzucht.....	57
3.17	HA-Test .....	58
3.18	Virustitration mittels Plaque-Test .....	59
3.19	Plaquereinigung von Virusisolaten .....	60
3.20	Erzeugung rekombinanter Influenzaviren durch reverse Genetik .....	60
3.21	Minigenom-Luciferase-Reporterassay zur Bestimmung der Polymeraseaktivität .....	63
3.22	Replikationskinetik .....	64
3.22.1	Replikationskinetik in humanen A549-Zellen .....	64
3.22.2	Bewertung des cytopathischen Effekts nach Infektion .....	65
3.23	Messung der Interferonsekretion von humanen A549-Zellen nach Infektion .....	66
3.23.1	IFN- $\beta$ ELISA .....	67
3.23.2	IFN- $\lambda$ 2 ELISA .....	67
3.24	Statistische Analysen .....	68
	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
4.1	Charakteristika der Parentalviren .....	69
4.2	Erzeugung eines Expressionsplasmid-Satzes auf Basis des porcinen H1N1-Virus.....	73

4.3 Untersuchung der Kompatibilität der viralen genomischen Segmente durch Erzeugung von Reassortanten.....	74
4.4 Untersuchung der Kompatibilität der Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA sowie des NP-Proteins durch Analyse der Polymeraseaktivität .....	76
4.4.1 Austausch des PB1-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität .....	80
4.4.2 Austausch des PB2-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität .....	82
4.4.3 Austausch des PA-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität .....	85
4.4.4 Austausch des NP-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität .....	86
4.4.5 Vergleich der Polymeraseaktivität von generierten Viren .....	87
4.5 Vermehrungseigenschaften von humanen, porcinen und aviären Parentalviren und deren Reassortanten in humanen A549-Lungenzellen .....	90
4.5.1 Replikationsverhalten der Viren.....	90
4.5.2 Cytopathischer Effekt (CPE).....	104
4.6 Interferonsekretion von A549-Zellen nach Infektion mit Parentalviren und Reassortanten.....	107
4.6.1 Sekretion von IFN- $\beta$ .....	107
4.6.2 Sekretion von IFN- $\lambda$ 2.....	112
<b>Diskussion.....</b>	<b>118</b>
5.1 Genetische Kompatibilität humaner H1N1, porciner H1N1 und aviärer H5N1 Influenza A-Viren.....	118
5.1.1 Genetische Kompatibilität der Polymerase- und NP-Proteine .....	119
5.1.2 Genetische Kompatibilität der Parentalviren und Generierung von Reassortanten .....	129
5.2 Eigenschaften von humanen, porcinen und aviären Parentalviren und deren Reassortanten.....	134
5.2.1 Replikation in humanen A549-Zellen.....	134
5.2.2 Polymeraseaktivität generierter Viren .....	148
5.3 Angeborene Immunantwort der Wirtszelle nach Infektion mit Parentalviren und Reassortanten .....	149
5.4 Auswirkungen von Polymorphismen auf die Eigenschaften von Parentalviren und Reassortanten.....	159

5.5 Betrachtungen zum möglichen pandemischen Potential von Reassortanten zwischen humanen H1N1, porcinen H1N1 und aviären H5N1-Viren .....	161
<b>Ausblick .....</b>	<b>164</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>165</b>
<b>Summary.....</b>	<b>167</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>170</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>172</b>
<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>175</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>203</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>211</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>213</b>
<b>Tagungsbeiträge .....</b>	<b>215</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>216</b>

# Einleitung

## 1.1 Influenzaviren

Die Influenzaviren werden zusammen mit den Thogoto-, Isa- und Quaranjaviren der Familie der Orthomyxoviridae zugeordnet und weisen ein segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung auf. Sie werden in die drei Genera Influenzavirus A, Influenzavirus B und Influenzavirus C unterteilt, die auf Basis antigener Unterschiede der Nukleo- und Matrixproteine differenzierbar sind [1]. Die Influenza A-Viren werden zudem weiter aufgrund der Antigenität der Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA bzw. H) und Neuraminidase (NA bzw. N) in 18 HA- (H1-H18) und 11 NA-Subtypen (N1-N11) unterschieden [2-4]. Bei den Influenza B-Viren existieren seit vielen Jahren die zwei Linien „Victoria“ und „Yamagata“, die Influenza C-Viren werden bisher nicht weiter unterteilt.

Die Benennung der Influenzaviren erfolgt gemäß einer international gültigen Nomenklatur [5]. Demnach wird der Influenzavirus-Typ (A, B oder C), die Spezies, aus der das Virus isoliert wurde, der Ort der ersten Isolation, die Nummer des Isolates, das Jahr der Isolation und bei Influenza A-Viren der Subtyp angegeben, beispielsweise A/duck/Wien/1836/2006(H5N1). Bei den humanen Influenzaviren entfällt die Nennung der Spezies.

Influenzaviren werden meist über Aerosole übertragen und infizieren zunächst die Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut [6, 7]. Im weiteren Infektionsverlauf breitet sich die Infektion im oberen Respirationstrakt aus. Nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen treten Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen, Husten und Schüttelfrost auf. Besonders plötzlich auftretendes, hohes Fieber ist ein typisches Symptom einer Influenzainfektion. Bei schweren Krankheitsverläufen, die gehäuft bei Älteren, Immunsupprimierten oder Hochschwangeren auftreten, erfolgt die Ausbreitung der Viren auch bis in den unteren Respirationstrakt. Zusätzlich zu den Schädigungen der Lunge kommt es dann auch häufig zu Entzündungen des Herzmuskels oder zu einer Meningitis oder Enzephalitis. Die Vorschädigungen der Epithelien erleichtern zudem eine bakterielle Sekundärinfektion, wodurch

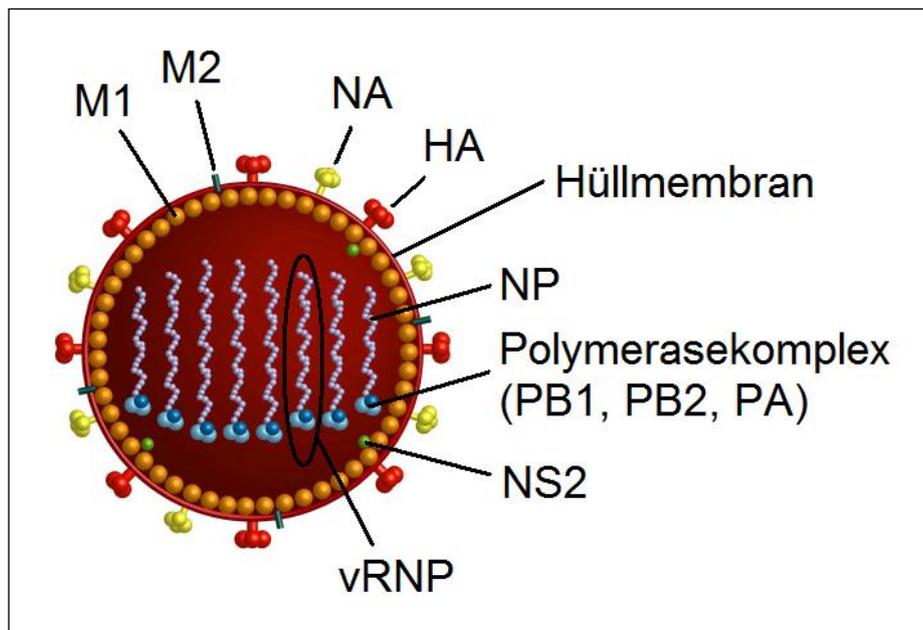
bakterielle Pneumonien oder andere bakterielle Entzündungen ausgelöst werden [8].

Die durch Influenzaviren ausgelöste akute respiratorische Erkrankung gilt als bedeutend für die humane Population und tritt in der Form periodisch wiederkehrender Epidemien oder globaler Pandemien auf.

## **1.2 Influenza A-Viren**

### **1.2.1 Aufbau der Viruspartikel und Organisation des Genoms**

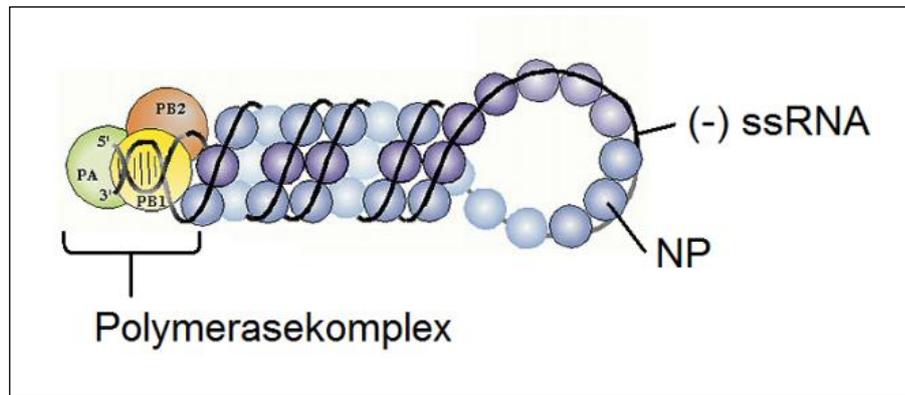
Die Partikel der Influenzaviren haben eine pleomorphe Gestalt: Neben den häufig auftretenden sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm sind auch filamentöse Formen elektronenmikroskopisch nachweisbar [9-11]. Die Viren weisen eine Lipidhülle auf, die von der Plasmamembran der Wirtszelle stammt, in der das Viruspartikel gebildet wurde [12]. In diese Hüllmembran sind das HA, das als Homotrimer die Rezeptorbindung und Membranfusion vermittelt, das NA, das als Homotetramer die Freisetzung der Viruspartikel ermöglicht, und das Ionenkanalprotein M2 eingelagert [13-16] (Abbildung 1). An die Innenseite der Virusmembran ist eine Schicht aus M1-Matrixproteinen angelagert, die die Form der Viruspartikel maßgeblich beeinflussen [17]. Die M1-Proteine sind zudem mit den Genomsegmenten, die als virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNPs) vorliegen, assoziiert [18]. Neben den genannten Proteinen konnte auch das Nichtstrukturprotein 2 (NS2) in den Virionen nachgewiesen werden [19]. Hingegen wird das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) und das von vielen Influenza A-Viren codierte PB1-F2 Protein nicht in den Viruspartikeln verpackt, sondern nur in infizierten Wirtszellen exprimiert [20].



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Influenza A-Virus**

M1: Matrixprotein 1; M2: Ionenkanalprotein M2;  
 NA: Neuraminidase; HA: Hämagglutinin; NP: Nukleoprotein;  
 NS2: NS2-Protein; Polymerasekomplex aus PB1-, PB2- und PA-  
 Protein; vRNP: virales Ribonukleoprotein;  
 verändert nach: Stech J, 2008 [21]

Das Genom der Influenza A-Viren ist etwa 13,6 kb groß. Es besteht aus acht Segmenten einzelsträngiger RNA mit negativer Orientierung mit einer jeweiligen Größe zwischen etwa 900 und 2400 Nukleotiden. Am 5'- und 3'-Ende eines jeden RNA-Moleküls finden sich kurze, nicht-codierende und zueinander komplementäre Sequenzwiederholungen [22]. Diese ermöglichen einerseits die Ausbildung einer helikalen doppelsträngigen RNA-Region und dienen andererseits als Promotor für die Transkription und Replikation durch die virale Polymerase [23, 24]. Der zwischen beiden Sequenzwiederholungen liegende codierende Bereich formt eine Loop-Struktur, so dass eine pfannenstielähnliche Form der Genomsegmente entsteht [25] (Abbildung 2). Die viralen Genomsegmente sind über ihre gesamte Länge mit NP-Proteinen komplexiert und mit mehreren aus den PB1-, PB2- und PA-Proteinen bestehenden Polymerasekomplexen assoziiert [26-28]. Die Genomsegmente werden in dieser Form als virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNPs) bezeichnet. Jedes der acht viralen Genomsegmente codiert für ein (PB2, PA, HA, NP, NA), zwei (M, NS) oder bis zu drei (PB1) Proteine [20, 29, 30].



**Abbildung 2: virales Ribonukleoprotein (vRNP)**

(-) ssRNA: virale einzelsträngige RNA in negativer Orientierung;  
 Polymerasekomplex aus PB1-, PB2- und PA-Protein;  
 NP: Nukleoprotein; verändert nach: Dalton et al., 2006 [31]

### 1.2.2 Virale Proteine

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase ist ein heterotrimerer Komplex aus den Proteinen PB1, PB2 und PA [32, 33]. Die drei Polymeraseproteine weisen nukleäre Lokalisationssequenzen auf [34-36]. PB1 und PA bilden ein Dimer und werden getrennt vom PB2-Protein in den Nukleus transportiert. Erst im Zellkern, wo die Transkription und Replikation des Virusgenoms erfolgt, werden die Proteine zum vollständigen Polymerasekomplex zusammengefügt [37, 38]. Nachdem auch die virale RNA in den Nukleus transportiert wurde, wird sie durch den Polymerasekomplex in virale mRNA transkribiert. Durch einen Prozess, der als *cap-snatching* bezeichnet wird, wird durch die Polymerase die methylierte 5'-Kappe von zellulären mRNAs auf die viralen mRNAs übertragen. Die Polyadenylierung erfolgt ebenfalls durch die virale Polymerase. Der Polymerasekomplex kann jedoch nicht nur vRNA-, sondern auch cRNA (*complementary RNA*)-Templates verwenden [39]. Dies ist notwendig, da für die Replikation des Virusgenoms die negativ-orientierte vRNA zunächst in eine positiv-orientierte cRNA umgeschrieben wird, bevor diese wiederum als Template für neu synthetisierte vRNA dient.

Das PB1-Protein interagiert über seinen C-terminus mit dem PB2- und über seinen N-terminus mit dem PA-Protein, so dass es zur Bildung des Polymerasekomplexes kommen kann [40, 41]. Darüber hinaus initiiert PB1 die Transkription und Replikation durch die Bindung an die virale RNA bzw. cRNA.

Das PB1-Protein trägt im Polymerasekomplex die eigentliche Polymerasefunktion für die Synthese der mRNA, cRNA und vRNA und ist in dieser Funktion auch für die Polyadenylierung der viralen mRNA mittels einer Poly-Uridin-Sequenz der vRNA verantwortlich [42].

Das PB2-Protein interagiert mit dem PB1-Protein, aber auch mit den Nukleoproteinen. Es bindet an die methylierten 5'-Kappen der prä-mRNA der Wirtszelle und transferiert die gebundenen RNAs an das PA-Protein im Polymerasekomplex [43-45].

Die Endonukleaseaktivität des PA-Proteins spaltet diese 5'-Kappen von der zellulären prä-mRNA ab und stellt sie für die virale Transkription zur Verfügung [46, 47]. Dieser Mechanismus wird auch als *cap-snatching* bezeichnet. Die proteolytischen Eigenschaften des PA erlauben die Bindung und Degradation der größten Untereinheit der zellulären RNA Polymerase II, wodurch die zelluläre mRNA-Synthese inhibiert wird [48]. Das PA-Protein bindet im Polymerasekomplex lediglich an das PB1-, nicht jedoch an das PB2-Protein [33].

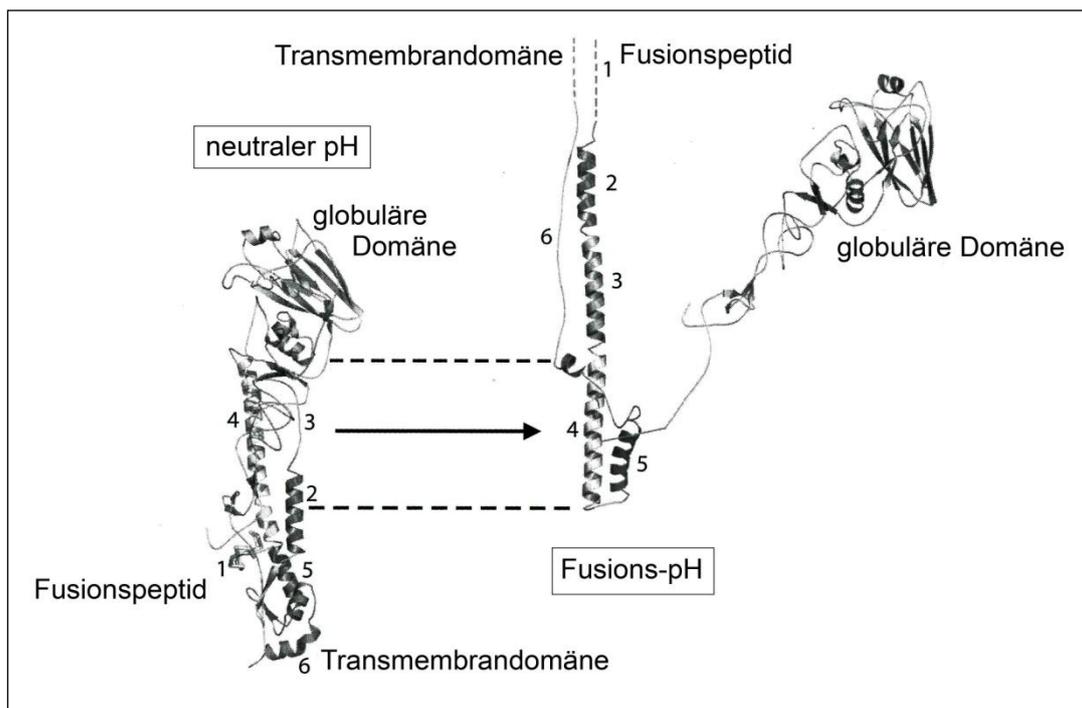
Das Protein PB1-F2 wird in einem alternativen (+1)-Leserahmen auf dem viralen PB1-Segment codiert [20]. Es ist nicht essentiell für den Erhalt der viralen Replikationskompetenz und wird nicht von allen Virusisolaten vollständig gebildet. In virusinfizierten Zellen konnte es in Mitochondrien nachgewiesen werden, wo es vor allem in lymphozytären Zellen das mitochondriale Membranpotential zerstört und auf diese Weise Apoptose auslösen kann [20, 49-51]. Das PB1-F2-Protein ist ein wichtiger Pathogenitäts- und Virulenzfaktor (s. Kap. 4.1, Anhang), der unter anderem die Immunantwort des Wirtes moduliert [51, 52]. Trotz eines fehlenden Einflusses von PB1-F2 auf die Virusreplikation in Zellkultur [20, 53] konnte bei PB1-F2-knockout-Viren *in vivo* eine verminderte Pathogenität beobachtet werden [53, 54]. Zusätzlich trägt das PB1-F2 selbst an der Aminosäureposition 66 einen Virulenzfaktor, der die Virusreplikation, Pathogenität und Immunantwort beeinflusst [55, 56].

Das PB1-N40-Protein ist ein N-terminal trunkiertes PB1-Protein ohne dessen Polymerasefunktion [30]. Es ist ebenso wie das PB1-F2 nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Replikationskompetenz. In Abhängigkeit vom

Vorhandensein des PB1-F2-Proteins ist jedoch ein Einfluss des PB1-N40 auf die Polymeraseaktivität, die Replikation *in vitro* und die Pathogenität beschrieben [30, 57].

Das Hämagglutinin (HA) ist für die Bindung des Viruspartikels an die Wirtszelloberfläche verantwortlich und vermittelt zu einem späteren Zeitpunkt im Replikationszyklus die Fusion der Endosomen- mit der Virusmembran (s. Kap. 1.2.3). Es wird als HA0-Vorläuferprotein am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, am ER und im Golgi-Apparat glykosyliert und polymerisiert zu Homo-Trimeren [3, 58]. Proteasen spalten das HA0-Vorläuferprotein in die Untereinheiten HA1 und HA2, die über eine Disulfid-Brücke verbunden bleiben. Die proteolytische Spaltung des HA0-Vorläuferproteins ist Voraussetzung für die Erlangung der vollen Funktionalität des Hämagglutinins [59, 60]. Die Art der Spaltstelle, die die zur Spaltung geeigneten Proteasen sowie den Ort der Spaltung bedingt, ist ein wichtiger Virulenzfaktor (s. Kap. 4.1, Anhang). Unterschieden wird dabei zwischen monobasischen und multibasischen Spaltstellen: Die monobasischen Spaltstellen sind durch das Vorhandensein einer basischen Aminosäure, meist Arginin, gekennzeichnet und kommen in den meisten humanen und porcinen Influenzaviren vor. Sie werden durch spezifische Proteasen, die ausschließlich im Respirationstrakt vorkommen, gespalten. Dadurch erfolgt die proteolytische Spaltung des HA0 erst nach der Freisetzung der Virionen aus der Wirtszelle im Respirationstrakt [61-64]. Die multibasischen Spaltstellen weisen mehrere basische Aminosäuren vor der HA0-Spaltstelle auf und sind vor allem bei hochpathogenen aviären Influenzaviren vorhanden. Sie können durch Proteasen, die im Golgi-Vesikel oder ubiquitär in vielen Gewebetypen vorkommen, gespalten werden. Daher ist das HA-Protein bereits bei der Freisetzung der Virionen prozessiert. Dies erlaubt eine systemische Ausbreitung im Wirt und trägt so zur hohen Pathogenität bei [64-68]. Das HA1/HA2-Protein ist über eine Transmembrandomäne im C-terminus des HA2 in der Virusmembran verankert (Abbildung 3). Der N-terminus des HA2 trägt die Fusions-Domäne für die Verschmelzung der Endosomen- mit der Virusmembran. Das HA1 am N-terminalen Bereich des HA1/HA2-Protein bildet eine globuläre Domäne aus, die der Rezeptorbindung dient [69] (Abbildung 3). Die Adsorption des Viruspartikels erfolgt über diese globuläre HA1-Domäne an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäuren), die sich als

Modifikationen von Membranproteinen auf der Oberfläche der Wirtszellen befinden [69]. Das HA von humanen, porcinen und aviären Influenzaviren differiert dabei in der Spezifität für  $\alpha 2,3$ - bzw.  $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren, wodurch das Wirtsspektrum maßgeblich festgelegt wird [70]. Für die zweite Funktion des HA-Proteins, die Fusion der Endosomen- mit der Virusmembran, wodurch die Freisetzung des Virusgenoms in das Cytoplasma erfolgt, ist eine Konformationsänderung des HA1/HA2-Proteins notwendig (Abbildung 3). Diese erfolgt durch die pH-Absenkung im Endosom nach Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle [71, 72]. Gegen das HA als wichtigstes Oberflächenantigen der Influenzaviren bildet das adaptive Immunsystem des Wirtes neutralisierende Antikörper. Diese verursachen einen Selektionsdruck, der zu stetigen antigenischen Veränderungen im HA führt, die als Antigendrift bezeichnet werden [29, 73] (s. Kap. 1.2.4).



**Abbildung 3: Hämagglutinin (HA) - Monomer**

Tertiärstruktur des HA-Monomers und Veränderungen bei niedrigem pH (Fusions-pH); Ziffern kennzeichnen einzelne Domänen des HA-Monomers und ihre Position nach der Strukturumlagerung; verändert nach: Palese and Shaw, 2007 [29]

Die Neuraminidase (NA) ist ein Glykoprotein, das Homo-Tetramere ausbildet und über eine Transmembranregion in der Virusmembran der Influenza A Viren verankert ist [74]. Das Protein entfernt Sialinsäuren von Membranproteinen der Zell- oder Virusmembran - eine Funktion, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Replikationszyklus essentiell ist. Beim Eindringen der Influenzaviren in den Respirationstrakt des Wirtes entfernt das Neuraminidase-Protein Sialinsäuren des Mucus, der Flimmerhärchen (Zilien) und der Glykokalyx. Damit verhindert das NA die frühzeitige Anheftung der Viruspartikel an diese Bestandteile des Respirationstraktes und ermöglicht die Bindung der Virionen an Rezeptoren auf der Oberfläche der eigentlichen Zielzellen [75, 76]. Während und nach dem Abknospen der neu gebildeten Viruspartikel von der Wirtszellmembran entfernt die Neuraminidase die Sialinsäuren auf der Wirtszellmembran und der Virusmembran und ermöglicht so die Ablösung der Virionen von der Wirtszelle. Gleichzeitig wird so auch die Aggregation von Viruspartikeln effektiv verhindert, so dass eine effektive Ausbreitung der Virionen im Respirationstrakt möglich ist [77]. Eine verminderte oder fehlende Neuraminidaseaktivität, die durch antivirale Substanzen (Neuraminidaseinhibitoren) erreicht werden kann, hat die Aggregation von vielen Viruspartikeln direkt auf der Wirtszelloberfläche zur Folge [78]. Die Neuraminidasen der Influenzaviren von verschiedenen Wirten unterscheiden sich meist in der pH-Sensitivität ihrer Neuraminidasefunktion. Diese ist für die Replikation im Gastrointestinaltrakt von aviären Wirten entscheidend, so dass auf diese Weise das NA auch einen Einfluss auf den Wirtstropismus hat [79]. Zudem unterscheiden Neuraminidasen ähnlich wie das HA-Protein zwischen  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren: Während aviäre NA-Proteine sehr stark bevorzugt  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren und kaum  $\alpha$ 2,6-verknüpfte spalten, werden durch humane NAs die  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren nur leicht bevorzugt und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte beinahe ebenso häufig gespalten. Die porcinen NA-Proteine befinden sich bezüglich ihrer Präferenz zwischen diesen beiden Extremen, so dass sie zwar deutlich bevorzugt  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren aber auch  $\alpha$ 2,6-verknüpfte spalten [80-83]. Aufgrund der entgegengesetzten Funktion des Hämagglutinins und der Neuraminidase – Bindung bzw. Spaltung von Sialinsäuren – und der damit zusammenhängenden Prozesse der Anheftung und Ablösung der Virionen ist hinsichtlich der Aktivität des HA und NA eine funktionelle Balance nötig. Ist

diese nicht vorhanden, weil eine Aktivität deutlich überwiegt, so ist das Virus häufig attenuiert [84, 85]. Nicht nur gegen das HA-Protein, auch gegen die Neuraminidase werden durch das adaptive Immunsystem des Wirtes Antikörper gebildet. Diese inhibieren zwar nicht die Bindung der Virionen an die Wirtszellen, können jedoch die Ausbreitung der Viren im Wirtsorganismus hemmen. Der dadurch entstehende Selektionsdruck führt wie schon beim HA zu antigenischen Veränderungen des NA [86]. Für die Hemmung der Neuraminidase sind antivirale Substanzen in therapeutischem Einsatz, jedoch kommt es auch hier durch Mutationen im NA zur Resistenzbildung.

Das Nukleoprotein (NP) ist ein RNA-bindendes Protein [87]. Mit Ausnahme der 5'- und 3'-Enden ist es über die gesamte Länge der viralen genomischen RNA-Segmente mit diesen komplexiert. Die Bindung an die virale RNA erfolgt dabei sequenzunspezifisch und mit hoher Affinität [28]. Damit ist das NP-Protein, das Homo-Oligomere bildet, ein wesentlicher Bestandteil des vRNP und für dessen Struktur entscheidend [88]. Neben der viralen RNA bindet das Nukleoprotein auch an die viralen PB1-, PB2- und M1-Proteine [89, 90] sowie an eine Reihe zellulärer Proteine, beispielsweise Aktin und einige Elemente des Kernimport- und Kernexportapparates [90-94]. In Bezug auf die letztgenannten Interaktionspartner sind mehrere Kernlokalisierungssignale des NP bekannt, die letztendlich den Transport der vRNP-Komplexe in den Zellkern vermitteln [95-99]. Aufgrund seiner vielfältigen Interaktionen mit anderen viralen und zellulären Proteinen sowie der viralen RNA ist das NP-Protein für die vollständige Transkription und Replikation des viralen Genoms essentiell [100].

Das Matrixprotein M1 kleidet die Virusmembran an der Innenseite aus und stabilisiert die Form der Viruspartikel auf diese Weise [17]. Es hat die Fähigkeit, an Lipidmembranen zu binden [101, 102] und formt an der Membraninnenseite des Virions ein Homo-Oligomer [103]. Das M1-Protein interagiert dabei mit den zytoplasmatischen Domänen der in der Virusmembran verankerten HA-, NA- und M2-Proteine sowie mit den NP-Proteinen der vRNP-Komplexe [18, 102, 104, 105]. Somit bildet es die Verbindung zwischen der Lipidhülle des Virions und den vRNPs im Inneren des Partikels. Das M1 ist darüber hinaus essentiell für den Export der vRNPs aus dem Zellkern [106]. Dazu bindet das an vRNP-Komplexe gebundene M1 an das

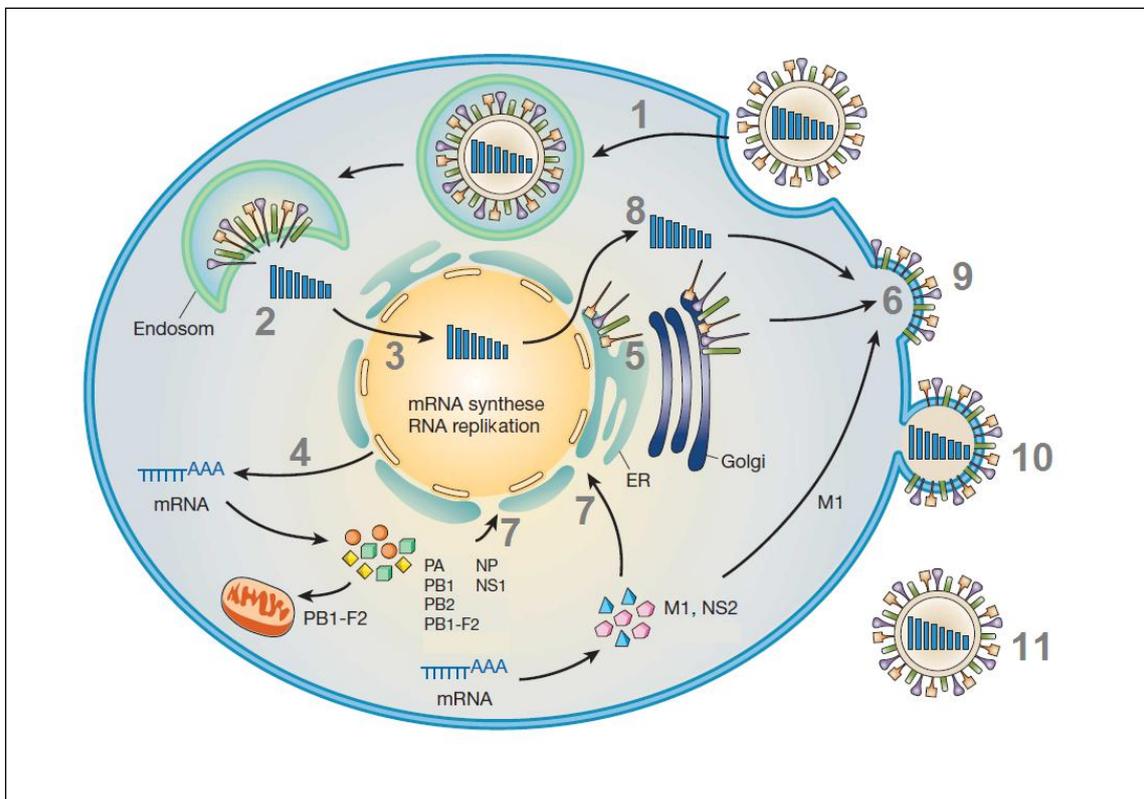
Nukleäre Export Protein (NS2/NEP). Dieses wiederum interagiert mit zellulären Exportrezeptoren [94, 107].

Das Matrixprotein M2 bildet als Homo-Tetramer einen Protonenkanal in der Virusmembran [16, 108]. Dieser Ionenkanal ist für die Replikationsfähigkeit essentiell, da sich das Virion nach seiner Aufnahme in die Zelle in einem Endosom mit saurem pH-Wert befindet und die Protonen aus dem Endosom über den M2-Protonenkanal in das Innere des Viruspartikels gelangen (s. Kap. 1.2.3). Durch das Absenken des pH-Wertes im Virusinneren lösen sich die vRNPs von den M1-Proteinen und es kommt nach der Fusion der Endosomen mit der Virusmembran zur Freisetzung des viralen Genoms in das Cytoplasma der Wirtszelle [106, 109, 110]. Eine weitere Funktion des M2-Proteins ist die Regulation des pH-Wertes des trans-Golgi Netzwerkes, um hier einen zu niedrigen pH und damit die vorzeitige Konformationsänderung des viralen HA-Proteins zu verhindern. Der M2-Protonenkanal kann durch antivirale Substanzen, die Adamantane, blockiert werden, wodurch die Virusreplikation inhibiert wird [111, 112]. Durch Mutationen im M2-Protein kommt es zu weit verbreiteten Resistenzen gegen Adamantane [113].

Das Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) ist nur in infizierten Wirtszellen, nicht jedoch im Viruspartikel nachweisbar. Es bildet Homo-Dimere und trägt eine RNA-Bindungsdomäne und eine Effektor-Domäne. Über die RNA-Bindungsdomäne kann das NS1 an virale RNA und mRNA aber auch zelluläre mRNA binden [114-116]. Die Effektor-Domäne ermöglicht die Interaktion mit verschiedenen Proteinen der Wirtszelle. So inhibiert das NS1-Protein das zelluläre RIG I – Protein, blockiert somit eine Signalkaskade und verhindert die Expression und Sekretion von IFN- $\beta$  [117, 118]. Zudem kann das NS1 direkt mit der zellulären Protein Kinase R (PKR) interagieren, sie inhibieren und auf diese Weise die durch PKR vermittelte Verringerung der Proteintranslation, die die virale Replikation erschwert, verhindern [119]. Das NS1-Protein ermöglicht es den Influenzaviren, die antivirale Immunantwort des Wirtes effizient zu hemmen [120-124]. Um dies bereits in einem frühen Stadium des viralen Replikationszyklus zu erreichen, wird die NS1-mRNA effizient aus dem Zellkern transportiert [125]. Da Influenzaviren ohne NS1-Gen deutliche Attenuierungen aufweisen, wird das NS1-Protein als essentiell für eine effiziente Virusreplikation angesehen [121].

Das Nicht-Strukturprotein 2 (NS2) wurde, nachdem es zunächst nicht im Virion nachgewiesen werden konnte, bei späteren Untersuchungen sowohl in der infizierten Zelle als auch im Viruspartikel identifiziert [19]. Das NS2-Protein trägt ein Kernexportsignal und eine Domäne für die Interaktion mit dem M1-Protein [126-128], das wiederum an vRNP-Komplexe bindet. Über die Bindung des NS2-Proteins an zelluläre Exportfaktoren vermittelt das NS2 auf diese Weise den Export der vRNPs aus dem Zellkern [94, 107]. Das NS2-Protein ist daher für die Replikation der Influenzaviren essentiell und wird auch als nukleäres Exportprotein (NEP) bezeichnet.

### 1.2.3 Replikationszyklus



**Abbildung 4: Replikationszyklus**

Die in der Abbildung gekennzeichneten Vorgänge während der Replikation sind im Text detailliert beschrieben.; verändert nach: Neumann et al., 2009 [129]

Die Influenzaviren adsorbieren über die HA-Proteine in der Virusmembran an endständige Neuraminsäuren der Oberflächenproteine der Wirtszelle [69]. Durch rezeptorvermittelte Endozytose kommt es im Anschluss zur Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle [71] (Abbildung 4; 1). Der pH-Wert im Endosom wird abgesenkt und hat eine Konformationsänderung im HA2-Protein zu Folge,

die in der Exponierung der Fusions-Domäne und der Verschmelzung der Endosomenmembran mit der Hüllmembran des Virus resultiert [69, 71, 72, 130-133]. Zeitgleich gelangen über die M2-Ionenkanäle Protonen in das Virusinnere, senken den pH-Wert und lösen so die Interaktion der M1- mit den NP-Proteinen der vRNPs [3, 109]. Die derart freigesetzten vRNPs (Abbildung 4; 2) werden über die Kernlokalisierungssignale des NP in den Zellkern transportiert (Abbildung 4; 3), wo die Transkription und Replikation der Influenzaviren stattfindet [92, 96, 134, 135].

Die in negativer Orientierung vorliegenden viralen Einzelstrang-RNA-Moleküle dienen als Matrize für die Synthese der viralen mRNA. Die mit den vRNPs assoziierten viralen Polymerasekomplexe können die Transkription nicht eigenständig initiieren und auch das 5'-Ende der viralen mRNA nicht mit der für eukaryotische mRNA typischen methylierten 5'-Kappe modifizieren. Aus diesem Grund muss die Transkription der viralen RNA mittels des *cap-snatchings* initiiert werden: Dazu bindet das PB2 als Teil der viralen Polymerase an die 5'-Kappe eines zellulären mRNA-Moleküls. Das PA-Protein spaltet diese und einige anhängende Nukleotide ab. Diese kurzen, gecappten 5'-Enden stehen nun als Primer für die virale RNA-Synthese zur Verfügung [43-47, 136]. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase polyadenyliert durch wiederholtes Ablesen einer Poly(U)-Sequenz am 5'-Ende der vRNA die virale mRNA [137-139]. Die mRNAs der M- und NS-Segmente werden gespleißt und so die M2- und NS2/NEP-mRNA erzeugt. Durch zelluläre und virale Komponenten werden die viralen mRNAs im Anschluss aus dem Zellkern exportiert [3] (Abbildung 4; 4). Die Translation der membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) (Abbildung 4; 5). Auf ihrem Transport vom rER über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk zur Zelloberfläche werden sie glykosyliert, palmitoyliert und polymerisieren zu trimeren bzw. tetrameren Proteinkomplexen [29, 140, 141]. An der Zellmembran konzentrieren sich die HA- und NA-Proteine sowie die M2-Ionenkanalproteine in bestimmten Bereichen [142] (Abbildung 4; 6). Die Synthese der übrigen Proteine erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma. Die Proteine des Polymerasekomplexes, PB1, PB2 und PA, sowie die NP-, NS1-, NS2/NEP- und M1-Proteine werden in den Zellkern transportiert (Abbildung 4; 7). Der Übergang von der Transkription zur Replikation wird durch freie NP-Proteine im Zellkern

vermittelt, die mit den Polymerasekomplexen und der viralen RNA interagieren [90, 143, 144]. Bei der Replikation wird die vRNA zunächst primerunabhängig in eine cRNA umgeschrieben, welche dann wiederum als Matrize für die Synthese neuer vRNA-Moleküle dient. Die neu gebildeten vRNAs komplexieren mit den NP-, PB1-, PB2- und PA-Proteinen zu viralen RNPs [40, 145]. Über die Interaktion der vRNPs mit den M1- und NS2/NEP-Proteinen werden die neu gebildeten Genomsegmente aus dem Zellkern an die Zellmembran transportiert (Abbildung 4; 8), in der bereits die viralen Oberflächenproteine eingelagert sind [126, 146]. Durch Wechselwirkungen der M1-Proteine mit den zytoplasmatischen Anteilen der in die Wirtszellmembran eingelagerten HA-, NA und M2-Proteine erfolgt die Ausbildung der initialen Budding-Strukturen [147, 148] (Abbildung 4; 9). Ob die vRNPs dabei selektiv oder zufällig in die sich bildenden Viruspartikel inkorporiert werden, ist derzeit nicht endgültig verstanden. Die Zellmembran stülpt sich weiter aus, umschließt die vRNPs (Abbildung 4; 10) und durch basale Fusion der Membran erfolgt die Abschnürung des Viruspartikels [148, 149]. Die Neuraminidase entfernt dabei sowohl auf der Wirtszellmembran als auch der Membran anderer Virionen vorhandene Sialinsäuren, um eine erneute Anlagerung an die Zellmembran bzw. eine Aggregation von Viruspartikeln zu verhindern [77, 78] (Abbildung 4; 11). Das HA0-Protein wurde in Abhängigkeit von der vorhandenen multi- bzw. monobasischen Spaltstelle bereits intrazellulär gespalten bzw. wird nun extrazellulär durch spezifische Proteasen prozessiert (s. Kap. 1.2.2). Die Proteine NS1 und PB1-F2 haben während der Replikation immunmodulatorische Funktionen und ermöglichen die effiziente Replikation der Influenzaviren (s. Kap. 1.2.2, 1.6).

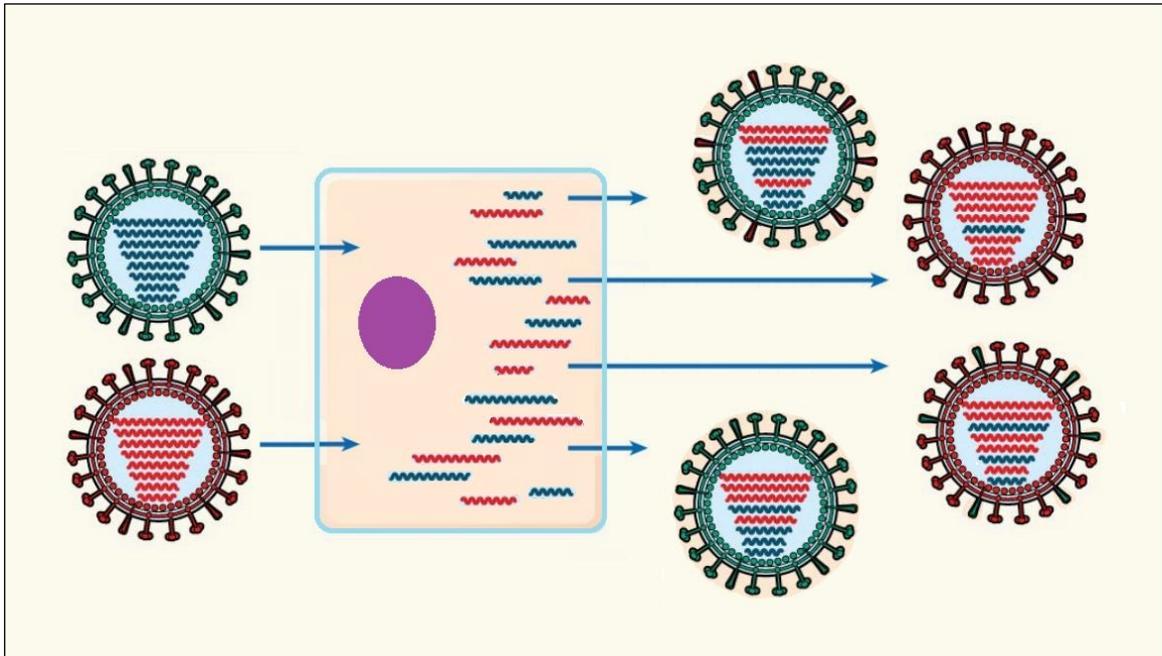
#### **1.2.4 Evolutionsmechanismen der Influenza A-Viren**

Die hohe antigenische Variabilität der Influenzaviren und das häufige Auftreten neuer Varianten werden durch zwei evolutionäre Mechanismen verursacht.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase der Influenzaviren besitzt keine *proofreading*-Aktivität und weist daher im Vergleich zu DNA-Polymerasen eine deutlich erhöhte Fehlerrate auf. Mit einer Häufigkeit von etwa einem Mismatch je 10.000 bis 100.000 Basen kommt es bei der Replikation der viralen Genomsegmente zu Punktmutationen [150-152]. Diese Punktmutationen sind

über das gesamte virale Genom verteilt, akkumulieren über die Zeit und verursachen z.T. Aminosäuresubstitutionen. Treten diese Aminosäureaustausche in den Oberflächenproteinen HA und NA auf, so können sie die antigenen Eigenschaften der Viren verändern. So entsteht eine Population antigenisch unterschiedlicher Virusvarianten und unter dem Selektionsdruck der neutralisierenden Antikörper der Wirte werden diejenigen Varianten positiv selektiert, die von den neutralisierenden Antikörpern nicht erkannt werden. Auf diese Weise gelingt es den Influenzaviren, der Immunantwort kontinuierlich auszuweichen. Diese langsame aber stetige Veränderung der Antigenität der Influenzaviren wird als *Antigen-drift* bezeichnet.

Das segmentierte Genom der Influenzaviren ermöglicht bei gleichzeitiger Infektion einer Wirtszelle durch zwei verschiedene Influenzaviren eine Neukombination von Genomsegmenten während des Assembly der neu gebildeten Virionen [153] (Abbildung 5). Bei diesem Reassortment genannten Prozess entstehen demnach Viren, die sich in ihrem Genom und damit auch in ihren Eigenschaften von den Parentalviren unterscheiden (Abbildung 5). Die Influenza A-, B- und C-Viren können *in vivo* Reassortanten nur mit Viren desselben Genus, nicht jedoch mit den Viren der anderen Virusgenera bilden [154]. Innerhalb eines Genus kann Reassortment zwischen den verschiedenen zirkulierenden humanen Viren aber auch zwischen humanen und animalen Influenzaviren stattfinden [155, 156]. Ist bei einem Reassortment mindestens eines der Oberflächenproteine HA oder NA von einem Austausch betroffen, so unterscheiden sich die antigenen Eigenschaften der Reassortante von denen ihrer Parentalviren und es kann ein neuer Subtyp entstehen. Wird das HA- und/ oder NA-Segment während eines Reassortment ausgetauscht, so spricht man von *Antigen-shift* [153, 157]. Treffen die neu entstandenen Viren mit neuen antigenen Eigenschaften auf eine immunologisch naive Population, so können sie eine hohe Morbidität und Mortalität zur Folge haben. Drei von fünf Influenza-Pandemien des 20. und 21. Jahrhunderts sind durch Viren verursacht worden, die durch einen *Antigen-shift* entstanden sind (s. Kap. 1.5). Darunter befinden sich auch solche Viren, die neben humanen Genomsegmenten auch Segmente porcinen bzw. aviären Ursprungs aufweisen.



**Abbildung 5: schematische Darstellung des Reassortments**

verändert nach: Trifonov et al., 2009 [158]

### 1.3 Wirtsspektrum und Speziesbarriere

Die Influenza A-Viren weisen ein sehr breites Wirtsspektrum auf: Neben dem Menschen können sie Schweine, Pferde, Hunde, Katzen, Seehunde, Wale sowie domestizierte und freilebende Vögel infizieren [159-163] (Abbildung 6). Auch in Fledermäusen wurden sie bereits nachgewiesen [4]. Wasservögel stellen das natürliche Reservoir der Influenza A-Viren dar (Abbildung 6). Influenza B-Viren, die Menschen und Seehunde infizieren, und Influenza C-Viren, die Menschen und Schweine infizieren können, zeigen demgegenüber ein engeres Wirtsspektrum [164, 165].

Eine Übertragung von Influenza A-Viren zwischen den einzelnen Wirtsspezies wird insgesamt betrachtet eher selten dokumentiert. Die beim Menschen derzeit vorherrschenden Subtypen der Influenza A-Viren sind H1N1 und H3N2. In der Vergangenheit war auch der Subtyp H2N2 in der humanen Population verbreitet. Seit 1997 wurden mehrere hundert Fälle einer direkten Übertragung von aviären H5N1-Viren auf den Menschen beobachtet. Aviäre Influenzaviren des Subtyps H7N9 infizierten seit 2013 mehrere hundert Menschen, wobei z.T. Übertragungen zwischen Menschen nicht ausgeschlossen



von Schweinen aber auch im unteren Respirationstrakt von Menschen vorkommen [169, 170]. Humane Inflenzaviren binden dagegen bevorzugt an  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäuren, die im oberen Respirationstrakt von Menschen und im Respirationstrakt von Schweinen vorhanden sind [70, 169-171]. Die Rezeptorpräferenz wird durch definierte Aminosäuren im HA-Protein festgelegt, die damit als Virulenzfaktoren angesehen werden können (s. Anhang). So sind beispielsweise die Aminosäurepositionen 190, 222 und 225 der Influenza A (H1N1)-Viren als entscheidend für die  $\alpha$ 2,3- bzw.  $\alpha$ 2,6-Präferenz beschrieben [171-176]. Die Ursache für die Infektion von Menschen durch aviäre Inflenzaviren, die  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren bevorzugen, ist vermutlich im Vorhandensein der  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren im unteren Respirationstrakt von Menschen zu suchen [170]. Dass es nicht häufiger zu solchen Infektionen und auch zur Übertragung aviärer Viren von Mensch zu Mensch kommt, liegt vermutlich daran, dass vor allem die Rezeptoren des oberen Respirationstraktes entscheidend für die Übertragung von Inflenzaviren zwischen verschiedenen Individuen zu sein scheinen. Ein weiterer Faktor mit Einfluss auf die Speziesbarriere ist die virale Polymerase [177]. Dabei ist nicht nur das Maß der Aktivität der Polymerase im Kontext verschiedener Wirtszellen, sondern ebenso ihr Einfluss auf die Virusreplikation und Pathogenität von Bedeutung. Diesbezüglich sind sehr viele Polymorphismen beschrieben, die die Polymeraseaktivität, Virusreplikation und Pathogenität beispielsweise in Säugerzellen bzw. Säugern erhöhen oder senken können (s. Anhang). Prominente Vertreter sind hier die Aminosäuren 627 und 701 des PB2-Proteins (s. Kap. 4.1, Anhang).

Dem Schwein kommt in Bezug auf die Überwindung der Speziesbarriere von aviären Inflenzaviren zu humanen Wirten und bei der Entstehung neuer, humanpathogener Viren eine besondere Bedeutung zu: Aufgrund des Vorhandenseins von sowohl  $\alpha$ 2,3- als auch  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren auf den Zellen des Respirationstraktes von Schweinen ist eine Infektion des Schweins neben den porcinen auch mit aviären oder humanen Inflenzaviren möglich [169, 178]. Bei der Replikation von aviären Inflenzaviren im Schwein können Virusvarianten entstehen und selektiert werden, die eine Präferenz für den (humanen)  $\alpha$ 2,6-Rezeptor aufweisen [169]. Zudem kann es bei einer Doppel- oder Tripelinfektion des Schweins mit Inflenzaviren aus verschiedenen Wirten zur Bildung von Reassortanten kommen, die die

Speziesbarriere aufgrund ihrer Eigenschaften überwinden können (s. Kap. 1.2.4). Das Schwein wird aufgrund dieser Merkmale auch als *mixing vessel* bezeichnet. Die Bildung solcher Reassortanten im Schwein, die im Anschluss Menschen infizierten, konnte mehrfach belegt werden [179]. Auch die Influenzapandemie von 2009 ist auf eine solchermaßen entstandene Reassortante zurückzuführen [180] (s. Kap. 1.5).

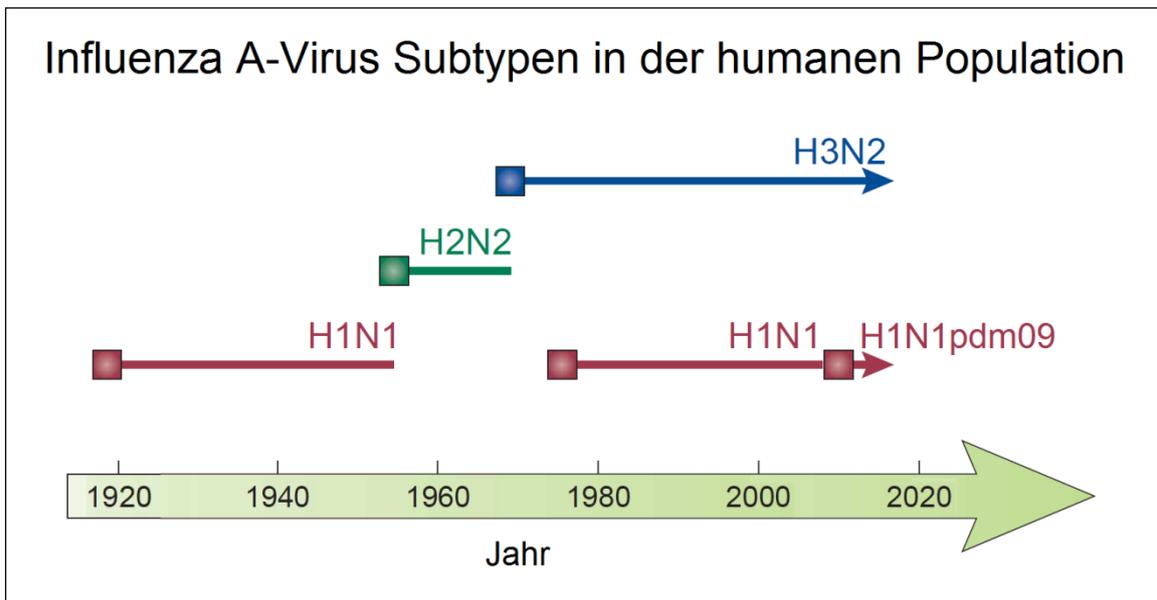
## **1.4 Epidemiologie**

### **1.4.1 Epidemiologie humaner Influenza A-Viren**

Die humanen Influenza A-Viren verursachen regelmäßig wiederkehrende, saisonale Epidemien aber auch deutlich seltener vorkommende Pandemien. Die saisonalen Epidemien treten in der nördlichen Hemisphäre meist von Januar bis April, in der südlichen Hemisphäre meist zwischen Mai und September auf. Die tropischen Regionen gelten hingegen als zeitlich unbeschränktes Übertragungsgebiet und darüber hinaus als Reservoir für die Influenzaviren [181].

Humane Influenzavirusinfektionen traten nicht erst seit der Pandemie von 1918 auf, sondern sind beispielsweise bereits für die Jahre 1889/90 beschrieben worden [182]. Die Influenzaviren, die über einen längeren Zeitraum in der humanen Population zirkulierten, gehören zu den Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2 (Abbildung 7): Der Influenzavirus-Subtyp H1N1 etablierte sich ab 1918 als Folge der durch diesen Subtyp ausgelösten Influenzapandemie weltweit in der humanen Population (s. Kap. 1.5). Der Subtyp H1N1 zirkulierte bis 1957, als er aufgrund einer durch den Subtyp H2N2 verursachten Influenzapandemie (s. Kap. 1.5) verdrängt wurde. Der H2N2-Subtyp wiederum zirkulierte bis 1968 und wurde durch ein Influenzavirus des Subtyps H3N2 ersetzt, welches in diesem Jahr eine Pandemie auslöste (s. Kap. 1.5). Erst seit 1977, als es zu einer weiteren durch den Subtyp H1N1 verursachten Pandemie kam (s. Kap. 1.5), zirkuliert neben dem Subtyp H3N2 auch der Subtyp H1N1 erneut (Abbildung 7). Die erste Pandemie des aktuellen Jahrhunderts wurde 2009 ebenfalls durch ein Virus des Subtyps H1N1 ausgelöst (s. Kap. 1.5). Es kam in der Folge zur

Verdrängung des alten H1N1- durch das neue H1N1-Virus (A(H1N1)pdm09), so dass weiterhin H1N1- und H3N2-Viren in der humanen Population koexistieren (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Zirkulation humaner Influenza A-Virus Subtypen**

verändert nach: Palese P, 2004 [183]

In den Phasen der Zirkulation der H1N1-Viren kam es, wie auch bei den anderen Subtypen, durch Antigen-*drift* zu einer kontinuierlichen Veränderung der Viren. Zudem sind auch Reassortment-Ereignisse innerhalb des Subtyps H1N1 zwischen Viren verschiedener H1N1-Subclades beschrieben [184]. Zwei der daraus entstandenen Reassortanten verursachten 1947 und 1951 Influenza-Epidemien mit ungewöhnlich hoher Morbidität und Mortalität, ohne dass es zum Austausch von Genomsegmenten mit anderen Subtypen gekommen war.

#### 1.4.2 Epidemiologie porciner Influenza A-Viren

In den Schweinepopulationen der Welt wurde in den vergangenen 100 Jahren eine große Zahl von verschiedenen porcinen Influenzavirus-Subtypen nachgewiesen. Dem Subtyp H1N1 sind dabei mehrere voneinander unterscheidbare Virusstämme, die sich zu verschiedenen Zeiten in der Schweinepopulation etablierten, zuzuordnen: Das H1N1-Virus von 1918, das in der humanen Population eine große Pandemie auslöste (s. Kap. 1.5), zirkuliert seit dieser Zeit als „klassisches H1N1“ in den Schweinebeständen [185, 186].

Dieser Erreger ist bis heute fast weltweit verbreitet. Lediglich in Europa war er ab den 1950er Jahren für die Dauer von etwa 20 Jahren nicht mehr nachweisbar, bis er 1976 vermutlich durch Importe wieder in die europäische Schweinepopulation eingetragen wurde. Unter der Beteiligung des klassischen H1N1-Virus kam es mehrfach zu Reassortment-Ereignissen, so dass Oberflächenprotein- oder interne Segmente dieses Virus in den inzwischen in Nordamerika zirkulierenden (Triple-)Reassortanten der Subtypen H1N2, H1N1, H2N3, H3N1 und H3N2 nachgewiesen wurden [187, 188]. In Europa wurde das klassische H1N1-Virus seit 1979 durch ein aviäres H1N1-Virus, das sich in der europäischen Schweinepopulation verbreiten konnte, verdrängt [189]. Dieses „avian-like H1N1“ genannte Virus war wiederum an verschiedenen Reassortment-Vorgängen mit humanen Viren beteiligt, bei denen Reassortanten mit dem Subtyp H1N2 und H3N2 entstanden, die in den Schweinepopulationen Europas fortgesetzt zirkulieren [190].

Das A(H1N1)pdm09-Virus wurde durch das Reassortment eines europäischen „avian-like H1N1“ mit einer nordamerikanischen H1N1-Triple-Reassortante erzeugt. Es entstand möglicherweise bereits einige Zeit vor der Übertragung auf den Menschen im Schwein und zirkulierte unerkant in der porcinen Population [180]. Einige Segmente des A(H1N1)pdm09-Virus wurden in eine neu entstandene H1N2-Reassortante integriert.

Die weltweit nachgewiesenen porcinen Influenzaviren verschiedenen Subtyps zeigen nicht nur die große Vielfalt der zirkulierenden porcinen Viren, sondern auch eine hohe Wahrscheinlichkeit der Entstehung neuer Reassortanten. Beides wird wahrscheinlich auch durch die regelmäßige Übertragung von humanen Influenzaviren auf Schweine befördert [191]. In der Regel äußert sich die Infektion von Schweinen durch Influenzaviren durch eine hohe Morbidität und einer meist geringen Letalität. Dennoch konnten eine Reihe von porcinen, humanen und aviären Influenzaviren aus Schweinen isoliert werden, die keine Erkrankung hervorriefen.

### **1.4.3 Epidemiologie aviärer Influenza A-Viren**

Bei den aviären Influenza A-Viren werden niedrig- und hochpathogene Viren unterschieden. Die niedrigpathogenen Viren weisen eine monobasische HA-Spaltstelle auf, wodurch das HA-Protein nur durch Trypsin-ähnliche Proteasen

gespalten werden kann, die extrazellulär im Respirations- und Intestinaltrakt der Vögel vorkommen (s. Kap. 1.2.2). Eine Infektion bleibt daher lokal auf den Respirations- und Verdauungstrakt beschränkt und verursacht meist nur milde Symptome. Zu den niedrigpathogenen aviären Influenzaviren zählen alle aviären Subtypen außer H5 und H7, beispielsweise H1N2, H6N1, H9N2 oder H10N7. Auch diejenigen H5 und H7, die eine monobasische HA-Spaltstelle tragen, werden den niedrigpathogenen Viren zugerechnet, wie einige H5N1-Virusstämme. Die hochpathogenen aviären Influenzaviren besitzen eine multibasische Spaltstelle des HA. Aufgrund dessen kann das HA-Protein bereits intrazellulär durch ubiquitär vorhandene Proteasen gespalten werden (s. Kap. 1.2.2), was systemische Infektionen ermöglicht. Diese führen je nach Vogelspezies zu einem teils sehr schweren klinischen Erscheinungsbild mit einer hohen Mortalität. Nur die Subtypen H5 und H7 und darunter nur diejenigen Viren mit multibasischer Spaltstelle des HA, wie H5N1 oder H7N7 mit multibasischer Spaltstelle des H5 bzw. H7, zählen zu den hochpathogenen Viren.

Die hochpathogenen aviären Influenza A (H5N1)-Viren wurden seit dem Beginn der umfangreichen epidemiologischen Überwachung 1997 in fast jedem Jahr in domestizierten Vögeln oder in Wildvögeln nachgewiesen [192, 193]. Nach einem größeren Ausbruch 2003 in Südostasien verbreiteten sich die Viren vermutlich über Transporte von tierischem Material aber auch durch Zugvögel bis in den Nahen Osten, Afrika und Europa. Im Jahr 2014 wurden aviäre Infektionen mit hochpathogenen H5N1-Viren in China, Nepal, Kambodscha, Vietnam, Indonesien, Nordkorea, Indien, Ägypten, Libyen und Russland dokumentiert [193]. Die hochpathogenen aviären Influenza A (H5N1)-Viren verursachen in verschiedenen Vogelspezies unterschiedlich starke Erkrankungen: Während die Infektion bei Hausgeflügel, z.B. bei Hühnern und Puten, fast immer zu einem schweren Krankheitsverlauf und einer Mortalität von bis zu 100 % führt, ist bei einigen Wasservögeln, insbesondere einigen Entenspezies, keine oder nur eine milde Erkrankung mit sehr geringer Mortalität zu beobachten [194-198].

Während des Ausbruchs in Hausgeflügel 1997 kam es auch zu ersten Infektionen im Menschen durch direkt übertragene, hochpathogene aviäre Influenza A (H5N1)-Viren [199, 200]. Während in den Jahren 1998 bis 2002

keine humanen H5N1-Fälle registriert wurden, werden seit 2003 in jedem Jahr humane H5N1-Infektionen dokumentiert. Aufgrund der weiten Verbreitung der aviären H5N1-Viren kam und kommt es in vielen Ländern zu humanen Infektionen. 2014 wurden Erkrankungen von Menschen durch H5N1 in China, Kambodscha, Vietnam, Indonesien, Ägypten und Kanada gemeldet [193]. Insgesamt betrachtet kommt es jedoch nur selten zur Übertragung der hochpathogenen aviären H5N1-Viren auf den Menschen und Mensch-zu-Mensch Transmissionen wurden nur in Ausnahmefällen beobachtet. Die durch die Infektion hervorgerufene Erkrankung im Menschen verläuft häufig schwer und führt oft zum Tod. Von den 850 bisher registrierten humanen Infektionsfällen verliefen 449 fatal (Stand: 09.05.2016; [193]). Als eine Ursache für die schweren Krankheitsverläufe wird eine starke Virusvermehrung in Verbindung mit einer möglichen systemischen Infektion angesehen. Zudem erfolgt durch die Infektion eine sehr starke Aktivierung des Immunsystems, die zu einer hohen Cytokinsekretion führt und so möglicherweise den Organismus schädigt [201]. Obwohl die hochpathogenen aviären Influenza A (H5N1)-Viren sehr wahrscheinlich in der Lage sind, den Menschen auch ohne vorherige Adaptation zu infizieren und in ihm zu replizieren, sind eine Reihe von Adaptationen bzw. Virulenzfaktoren bei verschiedenen Genomsegmenten beschrieben, die die Vermehrungsfähigkeit der aviären Viren in Säugern bzw. dem Menschen verbessern oder die Pathogenität verändern (s. Kap. 4.1, Anhang). Zudem besteht aufgrund der weiterhin erfolgenden Infektionen von Menschen durch aviäre H5N1-Viren die Möglichkeit, dass die Viren durch Reassortmentereignisse oder Punktmutationen die Fähigkeit erlangen, sich effizient von Mensch zu Mensch zu übertragen. Dadurch würde die Gefahr einer durch H5N1-Viren ausgelösten Pandemie steigen.

Bei der Untersuchung von Schweinen in Indonesien zwischen 2005 und 2007 wurden mehr als 50 Tiere identifiziert, die mit hochpathogenen aviären Influenza A (H5N1)-Viren infiziert waren. Zudem ist wahrscheinlich, dass das Virus dabei mehrmals unabhängig voneinander in die Schweinepopulation eingetragen wurde [202]. Da mit hochpathogenen H5N1-Viren infizierte Schweine keine Symptome zeigten, besteht verstärkt die grundsätzliche Gefahr der Adaptation der Viren an den humanen  $\alpha$ 2,6-Sialinsäure-Rezeptor, da dieser auch in Schweinen vorhanden ist. Tatsächlich wurde die Fähigkeit zur Bindung an den humanen Rezeptor bei einem der Isolate nachgewiesen,

wodurch die Wahrscheinlichkeit der Infektion von Menschen durch ein solches Virus erhöht ist. Da offenbar Schweine für hochpathogene aviäre Influenza A (H5N1)-Viren grundsätzlich empfänglich sind, besteht auch die Möglichkeit zur Bildung von Reassortanten, sollten die Schweine zusätzlich mit einem porcinen oder humanen Influenzavirus infiziert sein.

## **1.5 Pandemien humaner Influenza A-Viren**

Eine Influenza-Pandemie ist gekennzeichnet durch eine hohe geographische Verbreitung des Erregers, meist auf mehr als einem Kontinent, sowie durch eine effiziente Mensch-zu-Mensch Transmission des Virus, aufgrund derer ein großer Anteil der Population innerhalb einer kurzen Zeitspanne von einer Infektion betroffen ist. Die beiden elementaren Voraussetzungen für die Entstehung einer Influenza-Pandemie sind die unzureichende Immunität gegen ein neu auftretendes Influenzavirus in großen Teilen der Bevölkerung sowie die bereits genannte effiziente Übertragung des Erregers.

In den letzten 100 Jahren traten fünf Pandemien auf, die in ihrem zeitlichen Abstand zueinander aber auch in der Morbidität und Mortalität deutlich differierten: Die Pandemie von 1918/19, auch „Spanische Grippe“ genannt, wurde durch ein H1N1-Virus verursacht und war von einer vergleichsweise hohen Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. So starben aufgrund der Pandemie nach unterschiedlichen Schätzungen zwischen 20 und 50 Millionen Menschen weltweit. Zur Entstehung des Virus gibt es unterschiedliche Theorien: Möglich ist zum einen der Eintrag eines aviären Virus in die Schweinepopulation mit anschließender Zirkulation und Adaptation des Virus im Schwein, gefolgt von der Übertragung auf den Menschen, oder zum anderen die direkte Übertragung eines aviären Virus von Vögeln auf den Menschen. Auch die Entstehung des Virus durch Reassortment wird diskutiert [203, 204]. Im Anschluss an die Pandemie etablierte sich das H1N1-Virus in der humanen Population (s. Kap. 1.4). Erst 1957 trat mit der „Asiatischen Grippe“ die nachfolgende Pandemie auf, die mehr als eine Million Todesfälle verursachte. Das dafür ursächliche H2N2-Virus entstand aus dem Reassortment des seit Jahrzehnten zirkulierenden humanen H1N1-Subtyps mit einem aviären H2N2-Virus, wobei das PB1-, HA- und NA-Segment des aviären

Virus in die Reassortante übernommen wurde [205, 206]. In den Folgejahren der Pandemie zirkulierten die H2N2-Viren weiterhin in der humanen Population. Bereits 1968 ereignete sich die durch ein H3N2-Virus ausgelöste „Hongkong Grippe“, eine Pandemie, die mehrere 100.000 Tote zur Folge hatte. Das H3N2-Virus ist eine Reassortante, die das PB1- und HA-Segment von einem aviären H3-Virus und die übrigen Segmente von den zirkulierenden humanen H2N2-Viren trägt [205, 206]. In der Folge der Pandemie wurden die in der humanen Population zirkulierenden H2N2-Viren vollständig durch die H3N2-Viren verdrängt, die ihrerseits bis heute zirkulieren. Die „Russische Grippe“ von 1977 wurde durch ein H1N1-Virus verursacht. Dieses Virus war weitgehend identisch mit H1N1-Influenzaviren, die in den frühen 1950er Jahren zirkulierten. Durch diese enge Verwandtschaft und das Fehlen von Mutationen, die Influenzaviren üblicherweise während der Replikation über lange Zeiträume erwerben, wird inzwischen vermutet, dass das H1N1-Virus die Zeit zwischen den 1950er Jahren und 1977 nicht replizierend in animalen Wirten sondern in kryokonserviertem Zustand überdauerte und versehentlich freigesetzt wurde. Im Gegensatz zu früheren Pandemien kam es durch das Auftreten der H1N1-Viren nicht zur Verdrängung der H3N2-Viren in der humanen Population, sondern zu einer immer noch anhaltenden Kozirkulation von H3N2 und H1N1. 2009 trat eine weitere H1N1-Pandemie auf, die häufig als „Schweinegrippe“ bezeichnet wurde. Das verursachende H1N1-Virus (A(H1N1)pdm09), besitzt Segmente humanen, porcinen und aviären Ursprungs, da es sehr wahrscheinlich durch das Reassortment einer nordamerikanischen porcinen Triple-Reassortante (mit Segmenten aviärer, porciner klassischer H1N1-, und humaner H3N2-Viren) mit einem porcinen avian-like H1N1-Virus entstand [180]. Einzelne humane Infektionen mit der in Schweinen zirkulierenden nordamerikanischen porcinen Triple-Reassortante wurden bereits in den Jahren vor dem Auftreten des A(H1N1)pdm09-Virus beobachtet [207, 208]. Für das A(H1N1)pdm09-Virus selbst ist eine Entstehung im Schwein einige Jahre vor dem ersten Auftreten in der humanen Population möglich [180]. In der Folge der Pandemie wurden die vor 2009 in der humanen Population zirkulierenden H1N1-Viren durch den neuen H1N1-Subtyp verdrängt, so dass weiterhin die Subtypen H1N1 und H3N2 in der humanen Population kozirkulieren.

## 1.6 Nicht-adaptive Immunantwort der Zelle auf eine Infektion mit Influenza A-Viren

Das nicht-adaptive Immunsystem hat eine entscheidende Aufgabe bei der schnellen Immunantwort gegen in den Organismus eindringende Erreger, bei der Kontrolle viraler Infektionen sowie der Initiation der adaptiven Immunantwort. Es besteht aus von Epithelzellen gebildeten physiologischen Barrieren sowie aus weiteren spezialisierten Zellen, u.a. dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Das nicht-adaptive Immunsystem erkennt Pathogene mittels verschiedener Rezeptorfamilien, die wirtseigene von fremden Strukturen unterscheiden können. Diese Rezeptoren, PRRs (*pattern recognition receptors*) genannt, befinden sich auf der Oberfläche oder im Cytoplasma von spezialisierten Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems, auf Epithelzellen und vielen weiteren Zelltypen. Werden definierte, bei Pathogenen häufig vorkommende Strukturen (PAMPs; *pathogen associated molecular pattern*) wie z.B. Zuckerverbindungen, Lipopolysaccharide, virale Nukleinsäuren und Peptide von den PRRs erkannt, so wird das nicht-adaptive Immunsystem aktiviert. Hierbei werden nur wenige Gene, darunter die Typ I IFN-Gene, direkt induziert. Die sekretierten Typ I Interferone binden jedoch auto- und parakrin an ihre Rezeptoren und führen über eine Signalkaskade zur Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs). Viele dieser Genprodukte haben eine direkte antivirale Wirkung oder sind selbst Cytokine [209]. Dadurch werden die IFN-stimulierten Zellen in einen antiviralen Status versetzt, der die virale Replikation inhibiert [209]. Die sekretierten Typ I Interferone wirken darüber hinaus aktivierend auf dendritische Zellen und natürliche Killerzellen [210-212].

Influenzaviren haben Mechanismen entwickelt, um die Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems zu hemmen oder der antiviralen Wirkung zu entgehen. Das NS1-Protein der Influenza A-Viren kann die Expression der Typ I-Interferone inhibieren, indem es in die Signalkaskade, die zur Transkription der Typ I-IFN-Gene führt, eingreift [117, 121, 123, 213-218]. Durch die Inhibition der Typ I-IFN-Expression wird in der Folge auch die Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) gehemmt. Zusätzlich kann das virale NS1 die Aktivität einiger interferon-induzierter Genprodukte mit antiviraler Wirkung auch direkt beeinflussen [119, 219-222].

Zu den Typ I Interferonen werden IFN- $\beta$ , aber auch mehrere IFN- $\alpha$ -Isotypen sowie IFN- $\epsilon$ , - $\kappa$  und - $\omega$  gezählt, die an den gleichen Rezeptor binden und wie beschrieben eine antivirale Wirkung zeigen [223-225]. Für die IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2 und - $\lambda$ 3, die zu den Typ III-IFN gehören, wird teilweise eine den Typ I-Interferonen ähnliche Funktion diskutiert [226-228]. Ihr Rezeptor wird jedoch nur in speziellen Geweben wie Epithelien exprimiert [228, 229].

## **1.7 Fragestellung der Arbeit**

Während die zeitgleiche Infektion eines Wirtes mit zwei verschiedenen Influenzaviren lediglich die notwendige Voraussetzung für das Entstehen von Reassortanten schafft, ist die genetische Kompatibilität der Parentalviren für die mögliche genetische Zusammensetzung der Reassortanten ausschlaggebend. Natürlich entstandene, fortgesetzt zirkulierende Reassortanten in der europäischen und nordamerikanischen Schweinepopulation geben erste Hinweise darauf, welche Genomsegmente der verschiedenen Subtypen humanen, porcinen und teils aviären Ursprungs erfolgreich kombiniert werden können. Weiterhin ist die virale Fitness der entstandenen Reassortanten von entscheidender Bedeutung für die epidemiologischen Folgen des Auftretens dieser Reassortanten für die humane Population.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Kompatibilität zwischen Genomsegmenten von humanen, porcinen und aviären Influenzaviren analysiert. Von besonderem Interesse waren dabei die Segmente der Oberflächenproteine HA und NA, sowie die Polymerasesegmente, u.a. PB1, da diese Segmente bei der Entstehung von Pandemieviren in der Vergangenheit ausgetauscht wurden (s. Kap. 1.5) und gleichzeitig die wichtigsten Virulenzfaktoren für die Wirtsspezifität und -adaptation tragen (s. Kap. 4.1, Anhang). Mittels reverser Genetik wurden Reassortanten erzeugt, wobei der Focus auf porcine-aviären, porcine-humanen, sowie Triple-Reassortanten lag und weniger auf human-aviären Reassortanten, zu denen in der Vergangenheit bereits mehrere Studien erstellt wurden. Um die Auswirkungen der Segmentaustausche auf die virale Fitness zu prüfen, wurden die erzeugten Reassortanten im Hinblick auf ihre viralen Eigenschaften charakterisiert.

Hinsichtlich einer Risikoabschätzung bezüglich der Entstehung von bestimmten Reassortanten für die humane Population wurden auch Reassortanten mit einem aviären H5-HA mit multibasischer Spaltstelle in einem ansonsten weitgehend porcinen oder porcino-humanen Virus untersucht. Da gegen porcine Influenza-Oberflächenproteine in der humanen Population keine Immunität vorhanden ist, wurden auch die Auswirkungen des Austausches der Oberflächenproteine eines saisonalen humanen Influenzavirus gegen ein porcines HA und NA analysiert. Die vorliegende Studie und ihre Ergebnisse dienen somit nicht nur einem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, sondern ebenso der Bewertung des Risikos der Entstehung einer Reassortante mit hoher viraler Fitness, die bei Vorliegen weiterer Voraussetzungen potentiell eine Pandemie verursachen könnte.

# Material

## 2.1 Virusstämme

Bezeichnung	Virus-ID	Subtyp	Herkunft
A/NewCaledonia/20/99	K	H1N1 (human)	RKI
A/NSA/58/2007 (A/Niedersachsen/58/2007)	B	H1N1 (porcin)	RKI
A/whooperswan/R65/2006	L	H5N1 (aviär)	FLI
A/WSN/1933 (A/WilsonSmithNeurotropic/1933)	-	H1N1 (human)	RKI
A/PR/8/1934 delta NS1 (A/PuertoRico/8/1934 delta NS1)	-	H1N1 (human)	RKI
Reassortante NSA-bb H5-HA	A	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA	C	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1	D	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1,PA	S	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1,PB2,PA	H	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1,PA NC-PB2	O	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1 NC-PB2	P	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NSA-bb H5-HA,NA,PB1 NC-PB2, PA	T	H5N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA	E	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA,NA	I	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA,NA H5-PB1	R	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA,NA,PB1	F	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA,NA,PB1,PA	U	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt
Reassortante NC-bb NSA-HA,NA,PB1,PB2,PA	N	H1N1	in dieser Arbeit erzeugt

NSA - A/Niedersachsen/58/2007; H5 - A/whooperswan/R65/2006;  
NC - A/NewCaledonia/20/99;bb - backbone

## 2.2 Zelllinien

Zelllinie	Spezies/ Alter	Gewebe
A549	Homo sapiens, adult	Lunge, epithelial
HEK 293T	Homo sapiens, fötal	Niere, epithelial
MDCK2	Canis familiaris, adult	Niere, epithelial

## 2.3 Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
E.coli BIOBlue	<i>Bioline</i>
E.coli SURE 2	<i>Stratagene</i>
E.coli One Shot TOP10	<i>Invitrogen</i>
E.coli XL1-Blue	<i>Agilent Technologies</i>

## 2.4 Kulturmedien, Puffer, Suspensionen und Lösungen

Kulturmedium/ Puffer/ Suspension/ Lösung	Zusammensetzung
Agar (1 %/ 1,5 %/ 2 %)	1 g/ 1,5 g/ 2 g Agar 100 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
Agar-Overlaymedium	17,5 ml 2x EMEM/ 0,4 % BSA 8 ml Agar (2 %) 8 ml H <sub>2</sub> O, bidest. 350 µl DEAE-Dextran (1 %) 350 µl NaHCO <sub>3</sub> (5 %) 35 µl TPCK-Trypsin (1 mg/ml)
Avicel-Suspension (2,5 %)	2,5 g Avicel 100 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
Avicel-Medium-Lösung	14 ml 2x EMEM/ 0,4 % BSA 14 ml Avicel-Suspension (2,5 %) 280 µl DEAE (1 %) 280 µl NaHCO <sub>3</sub> (5 %) 29 µl TPCK-Trypsin (1 mg/ml)
Ca/Mg-Lösung (100x)	1,33 g CaCl <sub>2</sub> 1 g MgCl <sub>2</sub> 100 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
DEAE (1 %)	1 g DEAE 100 ml PBS
Einfriermedium	10 ml FKS 5 ml DMSO ad 50 ml DMEM/ EMEM-Medium
Erythrozytensuspension (0,5 %)	0,5 ml gewaschene Erythrozyten von Huhn/ Pute 100 ml NaCl-Lösung (0,9 %)

<b>Kulturmedium/ Puffer/ Suspension/ Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixier- und Färbelösung für Plaque Tests	100 ml Kristallviolett (1 % Lösung in 20 % Ethanol) 300 ml Formaldehyd (36 %) H <sub>2</sub> O, bidest. ad 1L
Gel-Ladepuffer (6x)	25 ml Bromphenolblau (1 %) 15 ml Ficoll 400 1 ml Tris-HCl (1 M) 0,2 ml EDTA (0,5 M) 58,8 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
Infektionsmedium – A549-Zellen	1 % Glutamin 1 % NEAA 0,2 % BSA 0,25 % TPCK-Trypsin in DMEM
Infektionsmedium – HEK 293T-Zellen	1 % Glutamin 0,2 % BSA 0,25 % TPCK-Trypsin in DMEM
Infektionsmedium – MDCK2-Zellen	1 % Glutamin 1 % NEAA 0,2 % BSA 0,2 % Trypsin (1:250; 1x) in EMEM
Kulturmedium – A549-Zellen	10 % FKS 1 % Glutamin 1 % NEAA in DMEM
Kultur- und Transfektionsmedium – HEK 293T-Zellen	10 % FKS 1 % Glutamin in DMEM
Kulturmedium – MDCK2-Zellen	10 % FKS 1 % Glutamin 1 % NEAA in EMEM
LB-Festmedium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 20 g Agar H <sub>2</sub> O, bidest. ad 1 L 1 ml Ampicillin (100 µg/ml)
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt H <sub>2</sub> O, bidest. ad 1 L
NaCl-Lösung (0,9 %)	9 g NaCl 1000 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung (5 %)	5 g NaHCO <sub>3</sub> 100 ml H <sub>2</sub> O, bidest.
PBS „ohne“; pH: 7,2	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O, bidest.

<b>Kulturmedium/ Puffer/ Suspension/ Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS „mit“	wie PBS „ohne“, zusätzlich 0,1 g/l CaCl <sub>2</sub> 0,1 g/l MgCl <sub>2</sub>
PBS*	25 ml PBS „mit“ 250 µl Ca/Mg-Lösung (100x) 167,5 µl BSA (30 %)
TAE-Laufpuffer (50x)	242 g TrizmaBase 57,1 ml CH <sub>3</sub> COOH (100 %) 100 ml EDTA (0,5 M) H <sub>2</sub> O, bidest. ad 1 L
Trypanblau (0,25 %)	0,25 g Trypanblau 100 ml NaCl-Lösung (0,9 %)

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/ Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
100bp DNA-Ladder	<i>Invitrogen</i>
250bp DNA-Ladder	<i>Invitrogen</i>
Agarose, ultra pure	<i>Bio-Rad, OXOID</i>
Ampicillin-Natriumsalz	<i>Sigma</i>
Avicel RC 581	<i>FMC BioPolymer</i>
Blut (Pute, Meerschwein)	<i>Bundesinstitut für Risikobewertung</i>
Bovines Serum Albumin 30 % (BSA)	<i>PAA</i>
Bromphenolblau	<i>Bromma</i>
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	<i>Merck</i>
Diethylaminoethyl (DEAE)	<i>Sigma</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Merck</i>
Dinatriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<i>Merck</i>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	<i>Gibco/ Invitrogen</i>
dNTP-Mix	<i>GE Healthcare</i>
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	<i>Gibco/ Invitrogen</i>
Essigsäure, CH <sub>3</sub> COOH (100 %)	<i>Merck</i>
Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH 96 %	<i>Merck</i>
Ethidumbromid 95 %	<i>Sigma</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck</i>
Ficoll 400	<i>Pharmacia</i>
Formaldehyd 36 %	<i>Fluka</i>
Fötale Kälberserum (FKS)	<i>PAN Biotech</i>
Glycerin (UltraPure)	<i>Invitrogen</i>
H <sub>2</sub> O, bidest.	<i>RKI</i>
H <sub>2</sub> O, RNase frei	<i>Sigma</i>
Kaliumchlorid, KCl	<i>Merck</i>
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Merck</i>
Kristallviolett	<i>Roth</i>
L-Glutamin 200 mM (100x)	<i>PAA</i>
Lipofectamine 2000	<i>Life Technologies</i>
Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>	<i>Merck</i>
Natriumchlorid, NaCl	<i>Merck</i>
Natriumhydrogenkarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	<i>Merck</i>

<b>Chemikalie/ Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Non-Essential-Amino-Acids (NEAA) (100x)	<i>PAN Biotech</i>
Opti-MEM	<i>Life Technologies</i>
Passive Lysis 5X Buffer	<i>Promega</i>
PyroMark Annealing Buffer	<i>Qiagen</i>
PyroMark Binding Buffer	<i>Qiagen</i>
PyroMark Wash Buffer	<i>Qiagen</i>
Streptavidin Sepharose	<i>GE Healthcare</i>
Tris-HCl	<i>Roth</i>
TrizmaBase	<i>Sigma</i>
Trypanblau	<i>Sigma</i>
Trypsin (1:250, 1x)	<i>PAA</i>
Trypsin, TPCK-behandelt (T 1426)	<i>Sigma</i>
Trypsin-EDTA (1x)	<i>PAA</i>

## 2.6 Oligonukleotide

**Tabelle 1: Generischer Primer für reverse Transkription und segmentspezifische Primer für Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Position (im Referenz- genom: A/NSA/58/07)</b>
Uni12	AgC RAA AgC Agg	1 - 12
BsmBI-PB1-F	TAT TCg TCT CAg ggA gCg AAA gCA ggC A	(-10) - 14
BsmBI-PB1-R	ATA TCg TCT CgT ATT AgT AgA AAC AAg gCA TTT	(15+2341) - 2324
BtgZI-PB2-F	AAT TgC gAT gAT ACA TTg TAg ggA gCg AAA gCA ggT C	(-23) - 14
BtgZI-PB2-R (2)	ATA TgC gAT gTA gTA ATC TAT ATT AgT AgA AAC AAg gTC gTT	(24+2341) - 2324
BsaI-PA-F	TAT Tgg TCT CAg ggA gCg AAA gCA ggT AC	(-14) - 15
BsaI-PA-R	ATA Tgg TCT CgT ATT AgT AgA AAC AAg gTA CTT	(15+2233) - 2216
BfuAI-HA-F	TAT TAC CTg CAC gAg ggA gCA AAA gCA ggg g	(-17) - 14
BfuAI-HA-R	ATA TAC CTg CAC TCT ATT AgT AgA AAC AAg ggT gTT TT	(18+1777) - 1758
BfuAI-NP-F	TAA TAC CTg CAC gAg ggA gCA AAA gCA ggg TA	(-17) - 15
BfuAI-NP-R	TTA TAC CTg CAC gCT ATT AgT AgA AAC AAg ggT AT	(18+1565) - 1549
BfuAI-NA-F	TAT TAC CTg CAC gAg ggA gCA AAA gCA ggA gT	(-17) - 15
BfuAI-NA-R	TTA TAC CTg CAC TCT ATT AgT AgA AAC AAg gAg TTT T	(18+1461) - 1443
BsmBI-M-F	ATA TCg TCT CAg ggA gCA AAA GCA ggT Ag	(-14) - 15
BsmBI-M-R	ATA TCg TCT CTT ATT AgT AgA AAC AAg gTA g	(15+1027) - 1012

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Position (im Referenz- genom: A/NSA/58/07)</b>
BsmBI-NS-F	<i>ATA TCg TCT CAg ggA</i> gCA AAA gCA ggg Tg	(-14) - 15
BsmBI-NS-R	<i>ATA TCg TCT CTT ATT</i> AgT AgA AAC AAg ggT g	(15+890) - 875

5'-Überhänge der Primer sind *kursiv* dargestellt und die Länge der Überhänge mit (-x) bzw. (y+...) angegeben

Alle in der Tabelle 2 aufgeführten Primer wurden als Sequenzierprimer verwendet. Die FluSwine-Primer wurden von Dr. Barbara Biere (RKI) designt und die pHW2000-Primer von Andrea Zöhner (RKI) zur Verfügung gestellt. Primer, die in der Kolonie-PCR eingesetzt wurden, sind mit \* gekennzeichnet.

**Tabelle 2: Sequenzierprimer und Kolonie-PCR-Primer**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C]</b>	<b>Position (Referenz- genom)</b>
FluSwine PB1 F1	AgC RAA AgC Agg CAA ACY ATT T	52	1 - 22 (EU004445)
FluSwine PB1 F18	CAT TTg AAT ggA TgT CAA YCC gAC	54	18 - 41 (EU004445)
FluSwine PB1 F839	CAg THg gRg gNA ATg ARA AgA ARg C	51	839 - 863 (EU004445)
FluSwine PB1 F1548*	gCT DCC YAg YTT Tgg RgT RTC Tgg	54	1548 - 1571 (EU004445)
FluSwine PB1 R1068	CAT TTT gTT TgA gAA CAT TAT Dgg DgC	51	1068 - 1042 (EU004445)
FluSwine PB1 R1663*	CCA TYT gDg CDg TTg CWg g	53	1663 - 1645 (EU004445)
FluSwine PB1 R2323	TTT CAT gAA ggA CAA gCY AAA TTC AYT A	52	2323 - 2296 (EU004445)
FluSwine PB1 R2341	AgT AgA AAC AAg gCA TTT TTT CAY gAA	53	2341 - 2315 (EU004445)
FluSwine PB2 F1	AgC RAA AgC Agg TCA AWT ATA TTC ART ATg	53	1 - 30 (EU004455)
FluSwine PB2 F8	gCA ggT CAA WTA TAT TCA RTA Tgg ARA gAA	52	8 - 37 (EU004455)
FluSwine PB2 F743	gCT ggg ARC ARH TRT ACA CTC CAg	54	743 - 766 (EU004455)
FluSwine PB2 F1312	gAC TCC AAg CAC AgA gAT gTC ATT	53	1312 - 1335 (EU004455)
FluSwine PB2 F1614*	AAC WTA TTC RTC RTC AAT gAT gTg ggA	53	1614 - 1640 (EU004455)
FluSwine PB2 R1024	TTC TTT TRA ADg TgA ASC CDC CAA A	54	1024 - 1000 (EU004455)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C]</b>	<b>Position (Referenz- genom)</b>
FluSwine PB2 R1775*	AAR gAY TgR AAY ggY TCA AAY TCC	51	1775 – 1752 (EU004455)
FluSwine PB2 R2285	CTT TTg gTC gCT gTC Tgg C	54	2285 – 2267 (EU004455)
FluSwine PB2 R2341	AgT AgA AAC AAg gTC gTT TTT AAA CWA TT	52	2341 – 2313 (EU004455)
FluSwine PA F1	AgC RAA AgC Agg TAC TgA TYC RAA	53	1 – 24 (EU004445)
FluSwine PA F30*	AgA YTT YgT RCg ACA RTg CTT CAA	55	30 – 53 (EU004445)
FluSwine PA F673	CAA AgT CTC CCR CCR AAY TTC TC	55	673 – 695 (EU004445)
FluSwine PA F1342	AAg YAT gAg RAg gAA YTA YTT YAC AgC	52	1342 – 1367 (EU004445)
FluSwine PA R760*	gCT TgC CCT CAA TgY AgC C	53	760 – 742 (EU004445)
FluSwine PA R1465	gRA ART CAT CCA TKg CYg CAC A	52	1444 – 1465 (EU004445)
FluSwine PA R2212	Tgg ACA gTA Tgg ATA gCA ARK AgT AgC A	54	2212 – 2185 (EU004445)
FluSwine H1 F1	AgC AAA AgC Agg ggA AAA TWA A	54	1 – 22 (EU004452)
FluSwine H1 F9	CAG ggg AAA ATA AAA DCA ACM RAN ATg	52	9 – 35 (EU004452)
FluSwine H1 F576	AAA TTC TTg TAA TCT ggg gAg TgC	53	576 – 599 (EU004452)
FluSwine H1 F711*	TTC AHN CCA gAA ATA gCA RMN AgA CC	52	711 – 736 (EU004452)
FluSwine H1 F970	ATC CAg TCA CWA TWg gAg ART gYC C	52	970 – 994 (EU004452)
FluSwine H1 R638	gTC AgT Cgg Agg ATg gTg C	52	638 – 620 (EU004452)
FluSwine H1 R1003	ACA TAT TTD ggR CAY TCT CCW ATN gT	52	1003 – 978 (EU004452)
FluSwine H1 R1127*	CCA TCC ATC TAT CAT TCC WgT CCA	54	1127 – 1104 (EU004452)
FluSwine H1 R1696	CAC ATC CAg AAR CTg ATT gCC C	55	1696 – 1675 (EU004452)
FluSwine H1 R1710	gAC CCA TTR gAR CAC ATC CAR AA	52	1710 – 1686 (EU004452)
FluSwine NP F1	AgC RAA AgC Agg gTA gAT AAT CAC TC	53	1 – 26 (EU004451)
FluSwine NP F45	CAT ggC gTC TCA Agg CAC	52	45 – 62 (EU004451)
FluSwine NP F655*	gRA AYT TCT ggA gRg gYg ARA ATg g	50	655 – 680 (EU004451)
FluSwine NP F949	CCA ggT gTT CAg CCT CAT TAg AC	53	949 – 971 (EU004451)
FluSwine NP R855	CAC TgA TCC TCT CAg AAT gAg TgC	52	855 – 832 (EU004451)
FluSwine NP R895*	CAA gYC CRT AYA CAC ARg CAg gCA	54	895 – 872 (EU004451)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C]</b>	<b>Position (Referenz- genom)</b>
FluSwine NP R1501	ATC CCT CAT TAC TCA TgT CAA Agg A	52	1501 - 1477 (EU004451)
FluSwine NP R1565	AgT AgA AAC AAg ggT ATT TTT CHT YAA YTN TC	53	1565 - 1534 (EU004451)
FluSwine N1 F1	AgC RAA AgC Agg RgT TYA AAA TgA AT	52	1 - 26 (EU004442)
FluSwine N1 F20	AAT gAA TCC AAA TCA RAA RAT AAT AAC CAT	50	20 - 49 (EU004442)
FluSwine N1 F23	gAA TAC AAA TCA RAR RAT AAT AAC CAT Ygg	52	23 - 52 (EU004442)
FluSwine N1 F612*	CCA gAY RAT ggR gCW gTR gCT g	53	612 - 633 (EU004442)
FluSwine N1 R997	ggR TTR TCH CCR AAA AYY CCA CTg C	54	997 - 973 (EU004442)
FluSwine N1 R1412	CAR MTC AgC WCC gTC Tgg C	53	1412 - 1394 (EU004442)
FluSwine N1 R1432*	TAC TTg TCA ATR gTR AAT ggC ARM TC	53	1432 - 1407 (EU004442)
FluSwine M F1*	AgC RAA AgC Agg TAg ATR TTK AAA gAT g	54	1 - 28 (AB286001)
FluSwine M F28	gAg YCT TCT AAC CgA ggT CgA AAC	54	28 - 51 (AB286001)
FluSwine M R1008	TTT ACT CYA gCW CTA TgT TgA CAA AAT gAC	54	1008 - 979 (AB286001)
FluSwine M R1027*	AgT AgA AAC AAg gTA gTT TTT TAC TCY AgC	54	1027 - 998 (AB286001)
FluSwine NS F1	AgC RAA AgC Agg gTg RCA AA	55	1 - 20 (EU004448)
FluSwine NS F9*	CAG ggT gRC AAA RAC ATA ATg gA	55	9 - 31 (EU004448)
FluSwine NS R819*	AAg CAR TAg TTg YAA KgC TTg CAT AAA	55	819 - 793 (EU004448)
FluSwine NS R881	AAg ggT gTT TTT TAT YAT TAA ATA ARC TgA A	55	881 - 851 (EU004448)
pHW2000_2895-F	AgC TCT CTg gCT AAC TAg Ag	55	-
pHW2000_342-R	Tgg CAA CTA gAA ggC ACA g	55	-

**Tabelle 3: Pyrosequenzierungs-PCR- und Pyrosequenzierungsprimer**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Position (im Referenz- genom)</b>
FluA PB1 F1030 bio	TTY TCA AAC AAA ATg gCR AgA YTA	1030 - 1053 (DQ508855)
FluA PB1 R1295	gTg TAY CTY TTY TgY CCA AgR TTC	1295 - 1272 (DQ508855)
FluA PB1 S1205	gAK gCH gTD CCA TCT ATT A	1205 - 1187 (DQ508855)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Position (im Referenz- genom)</b>
FluA PB2 F772 bio	AgY YTR ATY ATT gCT gCY AgR AAC	772 - 795 (DQ508854)
FluA PB2 R874	TCC CAC CAA TYT gTg TgC T	874 - 856 (DQ508854)
FluA PB2 S833	gCY AgT ggR TCY gCT gAT	833 - 816 (DQ508854)
FluA PA F1599	gCC ACA CAA RTg ggA RAA gTA YTg	1599 - 1622 (DQ508856)
FluA PA R1694 bio	ACA TAC ARR AAC ATK ggC CTY gA	1694 - 1672 (DQ508856)
FluA PA S1625	TYC TYg AgA TAg gAg AYA Tg	1625 - 1644 (DQ508856)
FluA HA F925-2	CAG AAC gTM CAY CCH VTC ACH ATH gg	925 - 950 (AJ344014)
FluA HA R1100 bio	TAH CCA TAC CAH CCA TCT AYC ATT	1100 - 1077 (AJ344014)
FluA HA S949	ggR gAR TgY CCM AAR TAT gT	949 - 968 (AJ344014)
FluA NP F986 bio	TRT ggA Tgg CAT gCM AYT CT	986 - 1005 (DQ508858)
FluA NP R1160	gCC CAR TAT YTR CTT CTM AgY TCA	1160 - 1137 (DQ508858)
FluA NP S1095	AAT TTg WAC YCC TCT RgT gg	1095 - 1076 (DQ508858)
FluA NA F1215 bio	gTC Agg RTA YAg Cgg RAg TTT	1215 - 1235 (AJ518092)
FluA NA R1320	RYT YTC TYT Rgg CMg YCC TCT gA	1320 - 1298 (AJ518092)
FluA NA S1288	CCC AgA ARC AAg gTC	1288 - 1274 (AJ518092)
FluA M F348 bio	ACT MAg YTA YTC WRC Ygg TgC ACT	348 - 371 (DQ508860)
FluA M R456	YTC ACA RgT KgC RCA YAY WAg g	456 - 435 (DQ508860)
FluA M S436	ggC CAA AWg CHR MTT C	436 - 421 (DQ508860)
FluA NS F545	TCR RRg gAC TTg AAT ggA AT	545 - 564 (DQ508861)
FluA NS R673 bio	TTC YCg CCA TTT TYC gTT	673 - 656 (DQ508861)
FluA NS S599	gAT TCg CTT ggA gAA g	599 - 614 (DQ508861)

## 2.7 Plasmide

Bezeichnung	Insert	Herkunft
pHW2000 (Leervektor)	-	R. Webster (Hoffmann <i>et al.</i> , 2000)
pHW2000-PB1 (WSN)	PB1 von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-PB2 (WSN)	PB2 von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-PA (WSN)	PA von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-HA (WSN)	HA von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-NP (WSN)	NP von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-NA (WSN)	NA von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-M (WSN)	M von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-NS (WSN)	NS von A/WSN/1933	A. Zöhner, RKI
pHW2000-PB1 (NC)	PB1 von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-PB2 (NC)	PB2 von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-PA (NC)	PA von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-HA (NC)	HA von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-NP (NC)	NP von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-NA (NC)	NA von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-M (NC)	M von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-NS (NC)	NS von A/NewCaledonia/20/99	A. Anton, RKI
pHW2000-PB1 (R65/06)	PB1 von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-PB2 (R65/06)	PB2 von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-PA (R65/06)	PA von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-HA (R65/06)	HA von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-NP (R65/06)	NP von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-NA (R65/06)	NA von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-M (R65/06)	M von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-NS (R65/06)	NS von A/whooperswan/R65/2006	J. Stech, FLI
pHW2000-PB1 (NSA)	PB1 von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-PB2 (NSA)	PB2 von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-PA (NSA)	PA von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-HA (NSA)	HA von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-NP (NSA)	NP von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-NA (NSA)	NA von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-M (NSA)	M von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pHW2000-NS (NSA)	NS von A/NSA/58/2007	in dieser Arbeit erzeugt
pPol-A-NS-Luc	Luciferase von <i>Photinus pyralis</i>	A. Zöhner, RKI
pTK-Luc	Luciferase von <i>Renilla reniformis</i>	Promega

## 2.8 Enzyme und Kits

<b>Enzym/ Kit</b>	<b>Hersteller</b>
AccuScript High Fidelity 1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit	<i>Stratagene</i>
BfuAI	<i>New England BioLabs</i>
BigDye Terminator 3.1	<i>ABI</i>
BsaI	<i>New England BioLabs</i>
BsmBI	<i>New England BioLabs</i>
BstEII	<i>New England BioLabs</i>
BtgZI	<i>New England BioLabs</i>
Dual-Luciferase Reporter Assay	<i>Promega</i>
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	<i>Stratec</i>
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	<i>Stratec</i>
MSB Spin PCRapace	<i>Stratec</i>
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	<i>Invitrogen</i>
PyroMark Gold Q96 Reagents	<i>Qiagen</i>
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i>
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	<i>Agilent Technologies</i>
RNasin	<i>Promega</i>
RTP DNA/RNA Virus Mini Kit	<i>Stratec</i>
T4 DNA Ligase	<i>Fermentas</i>
TaKaRa Ex Taq HS	<i>TaKaRa</i>

## 2.9 Kunststoffverbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Cryogefäße (1,8 ml)	<i>Nunc</i>
Kunststoffpipetten	<i>Corning</i>
Mikrotiterplatten (96 well)	<i>Greiner Bio-One</i>
PCR-Platten (96 well)	<i>ABgene</i>
Pipettenspitzen	<i>Roth, Eppendorf</i>
PyroMark Q96 Plate Low	<i>Qiagen</i>
PyroMark Q96 Cartridge	<i>Qiagen</i>
Reaktionsgefäße (200 µl)	<i>ABgene</i>
Reaktionsgefäße (500 µl, 1500 µl, 2000 µl)	<i>Eppendorf</i>
Zellkulturflaschen (Fläche: 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	<i>TPP</i>
Zellkulturflaschen (Fläche: 175 cm <sup>2</sup> )	<i>nunc</i>
Zellkulturplatten (6, 12, 24 well)	<i>TPP</i>
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	<i>TPP</i>
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	<i>TPP</i>

## 2.10 Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Modellbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	<i>CB 210</i>	<i>Binder</i>
Brutschrank	<i>Heracell 150</i>	<i>Heraeus</i>
ELISA-Reader	<i>Genios Pro</i>	<i>Tecan</i>
Erlenmeyerkolben	-	<i>Schott</i>
Gelelektrophoresekammer	<i>Horizon 58</i>	<i>Gibco</i>
Glaspipetten	-	<i>BRAND</i>
Kamera	<i>Powershot A95</i>	<i>Canon</i>
Kapillarsequenzier	<i>ABI 3500 Genetic Analyzer</i>	<i>ABI</i>
Luminometer	<i>TriStar LB 941</i>	<i>Berthold</i>
Magnetrührer	<i>Hotplate Stirrer Model L81</i>	<i>Labinco</i>
Meßzylinder	-	<i>BRAND</i>
Mikroskop	<i>Axiovert 25/ Axiovert 40C</i>	<i>Zeiss</i>
Mikrowellengerät	<i>8520</i>	<i>Privileg</i>
Minizentrifuge	<i>Rotilabo</i>	<i>Roth</i>
Netzgerät	<i>ST 305</i>	<i>Gibco</i>
Netzgerät	<i>P25</i>	<i>Biometra</i>
Neubauer-Zählkammer	-	<i>BRAND</i>
PCR-Pipettier-Box	-	<i>RKI-Eigenbau</i>
Photometer	<i>ND-1000 Spectrophotometer</i>	<i>NanoDrop</i>
Pipetten	<i>Research</i>	<i>Eppendorf</i>
Pipetten	<i>Pipetman P</i>	<i>Gilson</i>
Pipettierhilfe	<i>pipetus-akku</i>	<i>Hirschmann</i>
Pyrosequencer	<i>PyroMark ID</i>	<i>Qiagen</i>
Pyrosequencing Prep-Tool	<i>PyroMark Q96 Vacuum Prep</i>	<i>Qiagen</i>
Sandbad	<i>DB 2A Dri-block</i>	<i>Techne-Bibby Scientific</i>
Scanner	<i>Scanjet 2400</i>	<i>HP</i>
Sicherheitswerkbank Kl. 2	<i>CA/REV4</i>	<i>Clean Air</i>
Sicherheitswerkbank Kl. 2	<i>HeraSafe KS12</i>	<i>Heraeus</i>
Skalpell	-	<i>Dahle</i>
Thermoblock	<i>HB-130</i>	<i>Unitek</i>
Thermoblock	<i>Digital Dry Block Heater</i>	<i>PMC</i>
Thermocycler	<i>Mastercycler epGradient</i>	<i>Eppendorf</i>
Thermocycler	<i>T3000</i>	<i>Biometra</i>
Thermodrucker	<i>P91D</i>	<i>Mitsubishi</i>
Thermomixer	<i>Thermomixer compact</i>	<i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge	<i>Biofuge fresco</i>	<i>Heraeus</i>
Tischzentrifuge (gekühlt)	<i>Multifuge 3S-R</i>	<i>Heraeus</i>
Tischzentrifuge (gekühlt)	<i>5402/ 5417R</i>	<i>Eppendorf</i>
UV-Transilluminator mit Videodokumentation	<i>RH-5.1/ E.A.S.Y. 429K</i>	<i>Herolab</i>
Vortexer	<i>REAX 2000, Reax top</i>	<i>Heidolph</i>
Wasserbad	<i>3042</i>	<i>Köttermann</i>
Zählkammer	<i>Neubauer improved</i>	<i>BRAND</i>
Zentrifuge	<i>RC5C</i>	<i>Sorvall</i>

## 2.11 Software und Datenbanken

<b>Software/ Datenbank</b>	<b>Hersteller/ Autor/ Homepage</b>
BioEdit 7.0.9	<i>Hall T</i>
Easy RH-3	<i>Herolab</i>
EndNote X5	<i>Thomson Reuters</i>
GraphPad Prism v5.01	<i>GraphPad Software</i>
Influenza Virus Resource	<i><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html">www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html</a></i>
Lasergene 7.2.1	<i>DNASTAR</i>
NCBI Datenbank	<i><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a></i>
Primer3	<i>Rozen S, Skaletsky HJ</i>
PyroMark Q96 ID Software	<i>Qiagen</i>

# Methoden

## 3.1 Extraktion viraler RNA

Die Extraktion der genomischen RNA der Influenzavirus-Partikel erfolgte aus virushaltigem, zellfreiem Medienüberstand von Virusanzuchten in MDCK2-Zellen (s. Kap. 3.16) oder zum Endzeitpunkt von Replikationskinetiken in A549-Zellen (s. Kap. 3.22). Im Protokoll des für die Extraktion benutzten Kits (*RTP DNA/RNA Virus Mini Kit, Stratec*) wurde die Verwendung von 400 µl Ausgangsmaterial empfohlen, das im Fall der RNA-Isolierung aus Zellkulturüberstand aus 200 µl Überstand und 200 µl RNase-freiem Wasser bestehen sollte. Mittels des Lysispuffers wurde zunächst die Virushülle aufgebrochen, um so die virale Nukleinsäure freizusetzen. Die eigentliche Abtrennung der RNA von Proteinen und weiteren Bestandteilen der Virushülle erfolgte über eine Säule mit einer Filtermembran, an die die Nukleinsäure selektiv band. In zwei Waschschrritten mit verschiedenen Waschpuffern wurden nicht gebundene Moleküle entfernt. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 60 µl Elutionspuffer eluiert.

## 3.2 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der viralen RNA in eine einzelsträngige cDNA wurde das *AccuScript High Fidelity 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene)* und der Influenza A-Virus spezifische, nicht segmentspezifische Uni12-Primer (s. Kap. 2.6) verwendet. Dadurch war es möglich, alle acht RNA-Segmente in einem Ansatz revers zu transkribieren. Dem Protokoll des Herstellers folgend, wurde die Reaktion in einem zweistufigen Prozess durchgeführt. Zunächst wurde der Mastermix 1 (Tabelle 4) hergestellt, 5 µl der viralen RNA hinzugefügt und der Ansatz bei 65 °C für 5min und danach bei 4 °C für 2min inkubiert. Im Anschluss wurden 3 µl des Mastermix 2 (Tabelle 5) zum Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser nacheinander für 10 min bei 20 °C, für 60 min bei 42 °C und für 5 min bei 85 °C inkubiert.

**Tabelle 4: cDNA-Mastermix 1**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	5,5
Accuscript RT Puffer (10x)	1x	2,0
Uni12 - Primer (25 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ M	1,0
dNTPs (je 2,5 mM)	438 $\mu$ M	3,5
<b>gesamt</b>		12,0

**Tabelle 5: cDNA-Mastermix 2**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]
DTT (100 mM)	10 mM	2,0
RNAsin (40 U/ $\mu$ l)	1 U/ $\mu$ l	0,5
AccuScript High Fidelity RT	-	0,5
<b>gesamt</b>		3,0

### 3.3 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, DNA-Moleküle *in vitro* zu amplifizieren. Ein Zyklus der PCR verläuft in mehreren Schritten: Bei einer hohen Temperatur von ca. 95 °C wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge denaturiert, die anschließend als Matrize dienen. Bei der nachfolgenden Abkühlung auf die spezifische Annealingtemperatur der Primer hybridisieren diese mit ihren komplementären Zielsequenzen auf den Matrizensträngen. Bei ca. 72 °C wird in der Elongationsphase, beginnend an den 3´-OH-Enden der Primer, durch die DNA-Polymerase der Gegenstrang zur Matrize synthetisiert. Ausgehend von den neu synthetisierten, doppelsträngigen DNA-Molekülen kann ein weiterer Reaktionszyklus beginnen. Da in einer PCR 25 bis 45 dieser Zyklen durchlaufen werden, liegt nach Abschluss der DNA-Amplifikation ein Vielfaches der ursprünglich vorhandenen DNA-Moleküle vor.

#### 3.3.1 Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente

Für die Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente der Influenzaviren wurden segmentspezifische Primer (Tabelle 1, s. Kap. 2.6) verwendet. Dabei wiesen sowohl der *forward* als auch der *reverse* Primer

jeweils an den 5'-Enden Nukleotidüberhänge auf, so dass bei der Amplifikation an die vollständigen genomischen Segmente beidseitig definierte Nukleotidfolgen angehängt wurden. Diese dienten zu einem späteren Zeitpunkt als Erkennungs- und Schnittstellen für Restriktionsenzyme (s. Kap. 3.7). Die Amplifikation der viralen Segmente erfolgte durch die *TaKaRa Ex Taq HS*-Polymerase in einem Reaktionsansatz nach Tabelle 6. Zu jedem Ansatz wurden 3,0 µl cDNA pipettiert. Das Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente der Influenzaviren**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [µl]
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	36,50
Ex Taq Puffer (10x)	1x	5,00
dNTPs (je 2,5 mM)	200 µM	4,00
Primer, forward (10 µM)	0,125 µM	0,625
Primer, reverse (10 µM)	0,125 µM	0,625
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	1,25 U	0,25
<b>gesamt</b>		47,00

**Tabelle 7: Temperaturprofil für die Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente der Influenzaviren**

Temperatur	Zeit [min:sec]	Anzahl Wiederholungen
98 °C	3:00	-
98 °C	0:15	45
T <sub>a</sub>	0:30	
72 °C	t	
72 °C	5:00	-
T <sub>a</sub> der Primer für Segmente M, NS: 52 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segmente PB1, NA: 53 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment NP: 54 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment HA: 56 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment PB2: 59 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment PA: 61 °C t der Elongationsphase für Segmente PB1, PB2, PA: 3:30 t der Elongationsphase für Segmente HA, NP, NA, M, NS: 2:30		

### 3.3.2 Kolonie-PCR

Zum Zweck des schnellen Nachweises einer erfolgreichen Transformation (s. Kap. 3.10) in einer bestimmten Bakterienkolonie wurde die Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze ein Teil einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Agarplatte abgelöst und in jeweils einen Reaktionsansatz (Tabelle 8) überführt. Die initiale Erhitzung der Ansätze auf 98 °C im Rahmen des Temperaturprofils (Tabelle 9) der Kolonie-PCR lysiert die Bakterienzellen und setzt die DNA frei. Da viruspezifische Primer (mit \* markierte Primer, Tabelle 2, s. Kap. 2.6) verwendet wurden, konnten eventuell vorhandene virale Sequenzen in der PCR-Reaktion amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.4) nachgewiesen werden.

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [µl]
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	16,15
10x PCR Puffer (10x)	1x	2,50
dNTPs (je 2,5 mM)	200 µM	2,00
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 mM	1,00
Primer, forward (10 µM)	0,25 µM	0,625
Primer, reverse (10 µM)	0,25 µM	0,625
Platinum Taq DNA Pol. (5 U/µl)	0,5 U	0,10
<b>gesamt</b>		23,00

**Tabelle 9: Temperaturprofil der Kolonie-PCR**

Temperatur	Zeit [min:sec]	Anzahl Wiederholungen
98 °C	5:00	-
98 °C	0:30	45
T <sub>a</sub>	0:30	
72 °C	2:00	
72 °C	5:00	-
T <sub>a</sub> der Primer für Segmente PB2, NS: 51 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment PA: 52 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segmente PB1, HA, NA: 53 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment M: 54 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segment NP: 55 °C		

### 3.3.3 PCR für nachfolgende Pyrosequenzierung

PCR-Produkte, die mittels Pyrosequenzierung (s. Kap. 3.7.2) analysiert werden sollen, müssen unter Verwendung eines biotinylierten und eines nicht-biotinylierten Primers synthetisiert werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Pyrosequenzierungs-PCR-Primerpaare sind in Tabelle 3 (s. Kap. 2.6) aufgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 10 dargestellt. Zu jedem Ansatz wurden 3 µl cDNA (s. Kap. 3.2) pipettiert und die Gesamtansätze in Abhängigkeit der Primerannealingtemperatur nach dem Temperaturprofil aus Tabelle 11 inkubiert.

**Tabelle 10: Reaktionsansatz für PCR mit nachfolgender Pyrosequenzierung**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [µl]
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	14,87
Ex Taq Puffer (10x)	1x	2,50
dNTPs (je 2,5 mM)	200 µM	2,00
Primer, biotinyliert (10 µM)	0,5 µM	1,25
Primer, nicht biotinyliert (10 µM)	0,5 µM	1,25
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0,65 U	0,13
<b>gesamt</b>		22,00

**Tabelle 11: Temperaturprofil für PCR mit nachfolgender Pyrosequenzierung**

Temperatur	Zeit [min:sec]	Anzahl Wiederholungen
98 °C	3:00	-
98 °C	0:15	45
T <sub>a</sub>	0:30	
72 °C	0:30	
72 °C	5:00	-
T <sub>a</sub> der Primer für Segmente PB1, HA, NP, M: 48 °C T <sub>a</sub> der Primer für Segmente PB2, PA, NA, NS: 53 °C		

### 3.4 Qualitative Agarosegelelektrophorese

Die qualitative Agarosegelelektrophorese diente dem Nachweis von DNA-Fragmenten und ggf. der Bestimmung ihrer Größe. Mit Hilfe dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit PCR-Produkte (s. Kap. 3.3) und linearisierte Plasmide (s. Kap. 3.7) analysiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 %, 1,5 % oder 2 %igen Agarosegelen, denen Ethidiumbromid (*Sigma*) zur

Visualisierung der DNA unter UV-Licht zugesetzt war. In jede Geltasche wurden 4 µl Mix, bestehend aus 3 µl DNA-haltiger Probe und 1 µl Gel-Ladepuffer, pipettiert. Eine 100 bp oder 250 bp DNA-Leiter (*Invitrogen*) wurde als Größenstandard verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Laufpuffer bei 90 V für 30 bis 45 min.

### **3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden**

#### **3.5.1 Aufreinigung durch präparative Agarosegel-Elektrophorese**

Wurden durch die qualitative Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.4) in einem PCR-Produkt unerwünschte DNA-Fragmente nachgewiesen, so wurde die betreffende Probe mit einem präparativen Gel aufgereinigt. Auch linearisierte pHW2000-Leervektoren (s. Kap. 3.7) wurden mit dieser Methode gereinigt. Bis auf die höhere Probenmenge von 15 µl, die mit 3 µl Gel-Ladepuffer versetzt wurde, blieben die Versuchsbedingungen im Vergleich zur qualitativen Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.4) gleich. Nach der Elektrophorese wurde der Teil des Agarosegels, der die DNA-Fragmente der korrekten Größe enthielt, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde anschließend im *Gel Solubilizer S*-Puffer aus dem *Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec)* bei 50 °C für 15 min geschmolzen und die so freigesetzte DNA nach Herstellerprotokoll über die Säulenmembran isoliert.

#### **3.5.2 Aufreinigung durch DNA-bindende Membranen**

Konnte mittels qualitativer Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.4) ein PCR-Produkt der korrekten Größe ohne weitere unerwünschte DNA-Fragmente nachgewiesen werden, so war die Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem membranbasierten *MSB Spin PCRapace Kit (Stratec)* möglich. Auch mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente wurden mittels dieses Kits gereinigt. Den Herstellervorgaben entsprechend wurde die gesamte Probe mit *Binding Buffer* versetzt und auf eine Säule mit einer Filtermembran pipettiert. DNA-Moleküle ab einer definierten Größe binden an diese Membran, wohingegen nicht eingebaute dNTPs, Oligonukleotide und Enzyme aus einer PCR-Reaktion bzw. kurze DNA-Stücke aus einem Restriktionsverdau nicht

gebunden werden. Bei der nachfolgenden Zentrifugation werden alle nicht gebundenen Moleküle von der Membran entfernt. In einem letzten Schritt wurde die gebundene DNA mit 40 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

### **3.6 DNA-Quantifizierung durch photometrische Bestimmung**

Die Quantifizierung der DNA in einer Probe war nötig, da für molekularbiologische Methoden und für die Transfektion von A549-Zellen definierte Mengen der PCR-Produkte, der linearisierten Leervektoren und Plasmide eingesetzt werden mussten. Zur Analyse wurden auf den Messfuß des ND-1000 Mikrovolumen-Spectrophotometers (*NanoDrop*) 2 µl der zu quantifizierenden Probe pipettiert. Über die Messung der Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von 260 nm konnte die Nukleinsäurekonzentration photometrisch ermittelt werden.

### **3.7 DNA-Sequenzierung**

#### **3.7.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger**

Im Anschluss an die Isolierung der pHW2000-Expressionsplasmide aus Bakterienzellen (s. Kap. 3.13) wurden die Inserts sequenziert. Dadurch sollten eventuell vorhandene Mutationen identifiziert werden, die während der Erzeugung der Plasmide entstanden waren. Die Sequenzierung erfolgte in Anlehnung an die Sanger-Sequenziermethode [230] nach der Cycle-Sequencing-Methode. Als Matrize dienten dabei die Inserts der pHW2000-Expressionsplasmide, als Sequenzierprimer wurde pro Sequenzierreaktion jeweils ein Primer aus Tabelle 2 (s. Kap. 2.6) verwendet. Die Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes und das Temperaturprofil sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellt. In der Reaktion wurden dNTPs und Didesoxy-Nukleosidtriphosphate (ddNTPs) in einem definierten Verhältnis zueinander eingesetzt, so dass während der DNA-Synthese einer statistischen Wahrscheinlichkeit entsprechend Kettenabbrüche erfolgten. Die dadurch entstandenen, unterschiedlich langen Nukleinsäurefragmente trugen an ihrem 3'-Ende jeweils ein ddNTP mit einem spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff. Die Fragmente wurden mittels einer Polyacrylamidgel-Kapillarelektrophorese im

ABI 3500 Genetic Analyzer ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wurde das emittierte Licht der verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffe detektiert und so die Nukleotidsequenz ermittelt. Die Sequenzdaten wurden anschließend mit der Software *DNASTAR Lasergene* und *BioEdit* bearbeitet und analysiert.

**Tabelle 12: Sequenzieransatz**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration/ Masse	Volumen [ $\mu$ l]
Sequencing Buffer (5x)	0,75x	1,5
Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ M	0,5
BigDye Terminator v3.1 Mix	-	1,0
Plasmid-DNA	150-300 ng	1,0 – 7,0
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	ad 10,0
<b>gesamt</b>		10,0

**Tabelle 13: Temperaturprofil für die Cycle-Sequencing-Reaktion**

Temperatur	Zeit [min:sec]	Anzahl Wiederholungen
96 °C	1:30	-
96 °C	0:10	25
T <sub>a</sub>	0:05	
60 °C	4:00	
T <sub>a</sub> der Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt		

### 3.7.2 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde für die Bestätigung der genomischen Zusammensetzung der Reassortanten und Parentalviren eingesetzt. Ausgehend von jedem viralen Segment wurde zunächst ein Biotin-markiertes PCR-Produkt synthetisiert (s. Kap. 3.3.3) und in einem Reaktionsansatz nach Tabelle 14 eingesetzt. Bei einer Inkubation von 10 min bei RT bindet die Straptavidin-Sepharose an das Biotin des PCR-Produkts, das anschließend an einer Säule immobilisiert werden kann. Bei mehreren Waschschrinen wird das PCR-Produkt denaturiert und der nicht Biotin-markierte Strang entfernt. Der Biotin-markierte Einzelstrang wird in einen Reaktionsansatz nach Tabelle 15 überführt und der Ansatz für 2 min auf 80 °C erhitzt. Bei der folgenden Abkühlung auf RT hybridisiert der Sequenzierprimer (Tabelle 3, Kap. 2.6) mit dem Einzelstrang.

**Tabelle 14: Reaktionsansatz für Immobilisierung des Biotin-PCR-Produkts**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration/ Masse	Volumen [ $\mu$ l]
Binding Buffer (2x)	1x	40,0
Streptavidin-Sepharose	-	3,0
Biotin-PCR-Produkt	100-200 ng	12,5-30,0
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	ad 80,0
<b>gesamt</b>		80,0

**Tabelle 15: Reaktionsansatz für Primerannealing**

Reagenz (Stockkonzentration)	Endkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Annealing Buffer	-	40,0
Sequenzier-Primer (25 $\mu$ M)	1,47 $\mu$ M	2,5
<b>gesamt</b>		42,5

Während der eigentlichen Pyrosequenzierungsreaktion wird dem Sequenzansatz zunächst eines der vier dNTPs sowie ein Enzymmix aus Polymerase, Sulfurylase, Luciferase und Apyrase hinzugefügt. Das dNTP wird an das 3'OH-Ende des Sequenzierprimers gebunden, wenn es zum Nukleotid des Biotin-markierten Einzelstrangs komplementär ist. Bei dieser Reaktion wird ein Pyrophosphat-Molekül frei, welches durch die Sulfurylase bei der ATP-Synthese verbraucht wird. Das entstandene ATP wird von der Luciferase für die Umsetzung von Luciferin in Oxyluciferin verwendet, wobei ein Lichtsignal entsteht. Die Stärke des Lichtsignals ist dabei ein Maß für die Anzahl der eingebauten dNTPs. Sollte das hinzugefügte dNTP nicht komplementär zum Nukleotid des Einzelstrangs sein, bleibt die Reaktion aus. Nicht eingebaute dNTPs werden durch die Apyrase abgebaut. Ein neuer Zyklus der Sequenzierung beginnt, wenn ein anderes der vier dNTPs zusammen mit dem Enzymmix hinzugefügt wird. Die Nukleotidsequenz des synthetisierten Stranges kann durch die Reihenfolge der dem Sequenzansatz hinzugefügten dNTPs und der dabei jeweils detektierten Lichtsignale bestimmt werden.

### **3.8 Restriktionsenzymatischer Verdau von PCR-Produkten und Plasmiden**

Im Vorfeld der Klonierung der genomischen Segmente der Influenzaviren in die pHW2000-Vektoren (s. Kap. 3.9) wurden die PCR-Produkte aus 3.3.1 und der pHW2000-Leervektor an definierten Sequenzpositionen mit Restriktions-

enzymen geschnitten, um spezifische Einzelstrang-DNA-Überhänge zu erzeugen. Auch die Linearisierung der Insert-tragenden pHW2000-Plasmide, die aus Bakterien isoliert wurden (s. Kap. 3.12) und im qualitativen Agarosegel (s. Kap. 3.4) auf die korrekte Länge überprüft werden sollten, wurde mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Die verwendeten Enzyme, die damit jeweils verdauten PCR-Produkte und Plasmide sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Restriktionsenzyme, enzymatisch verdaute PCR-Produkte/ Plasmide und Reaktionsbedingungen**

<b>Restriktions- enzym</b>	<b>enzymatisch verdautes genomisches Segment als PCR-Produkt o. Plasmid</b>	<b>Restriktions- ansatz</b>	<b>Inkubations- bedingungen</b>	<b>Inaktivierungs- bedingungen</b>
BfuAI	HA, NP, NA	500 ng DNA 2,5 µl Puffer 1,25 µl BfuAI ad 25,0 µl H <sub>2</sub> O	50 °C, ü.N.	65 °C, 20 min
BsaI	PA	500 ng DNA 2,5 µl Puffer 1,25 µl BsaI ad 25,0 µl H <sub>2</sub> O	50 °C, ü.N.	65 °C, 20 min
BsmBI	PB1, M, NS, pHW2000- Leervektor	500 ng DNA 2,5 µl Puffer 1,25 µl BsmBI ad 25,0 µl H <sub>2</sub> O	55 °C, ü.N.	80 °C, 20 min
BstEII	pHW2000-PB1, -PB2, -PA, -HA, -NP, -NA, -M, - NS	500 ng Plasmid-DNA 1,5 µl Puffer 0,15 µl BSA 0,3 µl BstEII ad 15,0 µl H <sub>2</sub> O	60 °C, 1 h	keine Inaktivierung
BtgZI	PB2	500 ng DNA 2,5 µl Puffer 0,25 µl BSA 1,25 µl BtgZI ad 25,0 µl H <sub>2</sub> O	60 °C, 1 h	80 °C, 20 min

### **3.9 Klonierung von viralen cDNAs in den pHW2000-Vektor**

Nach der Methode von Hoffmann *et al.* [231] wurde jedes der acht viralen Genomsegmente in Form eines PCR-Produktes aus Kap. 3.3.1 einzeln in je einen pHW2000-Leervektor kloniert, so dass die genetische Information eines Influenzavirus-Stammes getrennt auf acht Expressionsplasmiden vorlag. Für

die Klonierung wurden die restriktionsenzymatisch geschnittenen (s. Kap. 3.8) und aufgereinigten (s. Kap. 3.5) PCR-Produkte und pHW2000-Leervektoren verwendet. Die Insertion der viralen cDNA erfolgte aufgrund spezifischer Einzelstrangüberhänge in definierter Orientierung zwischen dem p<sub>Th</sub>-Promotor und der t<sub>r</sub>-Terminationssequenz des Vektors (Abbildung 8, s. Kap. 3.20). Die Ligation wurde mit einem Insert zu Vektor-Verhältnis von 5:1 durchgeführt. Der Ligationsansatz (Tabelle 17) wurde bei 16 °C ü.N. inkubiert und danach bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

**Tabelle 17: Ligationsansatz**

<b>Komponente (Stockkonzentration)</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen/ Masse</b>
PCR-Produkt (Insert)	-	75 ng – 200 ng
pHW2000-Leervektor	-	50 ng
T4 DNA Ligase - Puffer (10x)	1x	1 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 U	1 µl
H <sub>2</sub> O, RNase frei	-	ad 10 µl

### 3.10 Transformation von Bakterien

Die Transformation verschiedener Bakterienstämme (s. Kap. 2.2) mit den pHW2000-Expressionsplasmiden aus 3.9 diente der Amplifikation der Plasmide. Dazu wurde pro Transformationsansatz ein pHW2000-Expressionsplasmid, das zusätzlich zum Insert ein Ampicillin-Resistenzgen trug, entsprechend des Herstellerprotokolls in die Bakterienzellen eingebracht. Alle Transformationsprotokolle basieren auf der heat-shock Methode: Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1 - 5µl des Ligationsansatzes (s. Kap. 3.9) in das Gefäß pipettiert. Nach der Inkubation von 30 min auf Eis wurde der Transformationsansatz für 30 - 45 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von SOC- oder NZY<sup>+</sup>-Medium wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Das Medium mit den transformierten Bakterien wurde im Anschluss auf Petrischalen mit Ampicillin-haltigem LB-Festmedium ausplattiert und die Kulturen ü.N. bei 37 °C oder für 3 d bei RT inkubiert.

### **3.11 Kultivierung von Bakterien**

Von jedem Transformationsansatz (s. Kap. 3.10) wurden mehrere Bakterienklone von der Petrischale aufgenommen und einzeln in flüssigem LB-Medium vermehrt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit 3 µl Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und das Medium mit einem Bakterienklon angeimpft. Für größere Kultivierungsansätze wurden 250 ml LB-Medium (mit 250 µl Ampicillin) mit 2 ml Start-Bakterienkultur beimpft. Alle Flüssigkulturen wurden bei 37 °C ü.N. auf dem Schüttler inkubiert.

### **3.12 Glycerinstocks transformierter Bakterien anlegen**

Um die mit den pHW2000-Expressionsplasmiden transformierten Bakterienklone (s. Kap. 3.10) dauerhaft verfügbar zu halten, wurden von diesen Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 1 ml der Bakterienkultur (s. Kap. 3.11) mit 250 µl Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

### **3.13 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen**

Für die Isolierung der pHW2000-Expressionsplasmide aus den kultivierten Bakterienzellen (s. Kap. 3.11) wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet. Dem jeweiligen Herstellerprotokoll folgend wurden mit dem *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (Stratec) 2 ml, mit dem *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) 250 ml Bakterienkultur präpariert und die Plasmide isoliert.

### **3.14 Kultivierung von Zellen**

Die Kultivierung der adhärent wachsenden A549-, HEK 293T- und MDCK2-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem Zellkulturbrutschrank. Für die A549- und HEK 293T-Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), für die MDCK2-Zellen *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) verwendet. Jedem Zellkulturmedium wurden 10 % FKS und 1 % Glutamin zugesetzt. Das Medium der A549- und MDCK2-Zellen enthielt zusätzlich 1 % Non-Essential-Amino-Acids (NEAA). In Abhängigkeit der Größe der Zellkultur-

flasche wurden 10 ml (T25-), 20 ml (T75-) oder 50 ml Zellkulturmedium (T175-Flasche) eingesetzt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80 – 95 %. Dazu wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und die adhärennten Zellen zweimal mit PBS „ohne“ gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS wurden die A549- und HEK 293T-Zellen einmalig mit 1 – 2 ml Trypsin-EDTA überschichtet und für 3 min im Brutschrank inkubiert. Die MDCK2-Zellen wurden zunächst mit 1 – 2 ml Trypsin-EDTA überschichtet, für eine Minute bei RT inkubiert und das Trypsin-EDTA wieder entfernt. Anschließend wurden die MDCK2-Zellen erneut mit 1 – 2 ml Trypsin-EDTA überschichtet und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die abgelösten Zellen in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und mit einer Splitrate von 1:2 bis 1:8 in eine neue Zellkulturflasche eingesät.

### **3.15 Bestimmung der Zellkonzentration in Suspensionen**

Die Bestimmung der Konzentration von Zellen in einer Zellsuspension erfolgte direkt nach Resuspendierung der Zellen (s. Kap. 3.14). Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension in 150 µl PBS „ohne“ verdünnt und mit 50 µl Trypanblau (0,25 %) versetzt. Trypanblau färbt abgestorbene Zellen mit perforierter Zellmembran blau, wohingegen lebende Zellen mit intakter Zellmembran nicht gefärbt werden. In einer Neubauer-Zählkammer wurden alle lebenden Zellen der vier großen Eckquadrate gezählt, der Mittelwert pro Eckquadrat ermittelt und unter Beachtung des Verdünnungsfaktors die Zellkonzentration errechnet.

### **3.16 Virusanzucht**

Für die Herstellung der Influenza A Virus-Stocks wurden MDCK2-Zellen verwendet. In der Vorbereitung der Virusanzucht wurden die Zellen mit einem definierten Umsetzfaktor in Zellkulturflaschen ausgesät und mit MDCK2-Kulturmedium kultiviert, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu etwa 80 % konfluent waren. Vor der Infektion wurden die MDCK2-Zellen zweimal mit EMEM-Medium ohne Zusätze gespült und das Medium vollständig entfernt. Die Infektion der Zellen erfolgte durch das Überschichten mit einer virushaltigen

Suspension, wobei für die Herstellung der Virus-Stocks keine definierte multiplicity of infection (MOI) gewählt wurde. Je nach Größe der Zellkulturflasche wurde ein Infektionsvolumen von mindestens 650 µl für T25- und 2 ml für T75-Flaschen verwendet. Die Infektionsansätze wurden für 45 min bei RT inkubiert und die Zellkulturflaschen dabei alle 15 min leicht geschwenkt. Im Anschluss wurden die MDCK2-Zellen zweimal mit EMEM-Medium ohne Zusätze gespült und das Medium entfernt. Für die Virusanzucht wurde in die T25-Flaschen 7,5 ml, in T75-Flaschen 10 ml des trypsinhaltigen MDCK2-Infektionsmediums gefüllt und die Zellen bei 37 °C für zwei bis sechs Tage im Brutschrank inkubiert. Die Ernte des virushaltigen Zellkulturüberstandes erfolgte in Abhängigkeit der Ausbildung des cytopathischen Effekts (CPE), spätestens jedoch nach sechs Tagen. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### **3.17 HA-Test**

Der Haemagglutinations-Test (HA-Test) ermöglicht die Quantifizierung von Influenzavirus-Partikeln in einer Suspension. Dabei wird die Fähigkeit der Influenzaviren genutzt, Erythrozyten von bestimmten Säugetieren oder Vögeln zu agglutinieren. Für den Test wurden ab der zweiten Reihe einer 96-Well-Mikrotiterplatte in jedes Well 50 µl NaCl-Lösung (0,9 %) vorgelegt. Von den zu untersuchenden Suspensionen wurden je 100 µl in das erste Well pipettiert. Um eine Verdünnungsreihe ( $\log_2$ ) herzustellen, wurden 50 µl Virus-Suspension aus dem ersten in das zweite Well überführt und durch Pipettieren mit der NaCl-Lösung gemischt. Dieser Schritt wiederholte sich bis zum letzten Well der Platte und endete mit der Entfernung von 50 µl Material aus der letzten Verdünnungsstufe. Mit der mitgeführten Negativkontrolle wurde ebenso verfahren. Im Anschluss wurden 50 µl Erythrozytensuspension (0,5 %) in jedes Well pipettiert und die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt. Nach 30minütiger Inkubation konnte der HA-Test ausgewertet werden, indem die Mikrotiterplatte vertikal gestellt wurde. In allen Wells der Negativkontrolle muss eine vollständige Sedimentation der Erythrozyten am Boden der Platte als „Knopf“-Bildung erkennbar sein. Läuft dieser Erythrozyten-„Knopf“ beim Vertikalhalten der Platte aus, so liegt keine Hämagglutination vor. Alle Wells, in

denen die Erythrozyten nicht sedimentieren oder in denen der Erythrozyten-„Knopf“ beim Vertikalhalten der Platte nicht ausläuft, wurden als Hämagglutinations-positiv gewertet. Der HA-Titer der jeweiligen Probe ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe, in der noch eine Hämagglutination auftritt.

### **3.18 Virustitration mittels Plaque-Test**

Der Plaque-Test wurde zur Quantifizierung replikationskompetenter Influenzavirus-Partikel in einer Probe verwendet. Er basiert auf dem durch die Virusinfektion verursachten CPE bzw. der Lyse von benachbarten Zellen innerhalb eines ansonsten konfluenten Zellrasens. Zusätzlich zur Bestimmung des Virustiters kann mit dem Plaque-Test auch die Plaque-Morphologie beurteilt werden. In Vorbereitung des Tests wurden in Kultur befindliche MDCK2-Zellen, wie in Kap. 3.14 beschrieben, mit PBS „ohne“ gespült, mit Trypsin-EDTA trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 12-Well-Platten ausgesät und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Am Tag des Testbeginns wurde aus den zu 100 % konfluenten Wells das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 1 ml EMEM gespült. Von den zu titrierenden Proben wurde eine Verdünnungsreihe ( $\log_{10}$ ) in PBS\* angelegt und 100  $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe in je ein Well pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 100  $\mu$ l PBS\* verwendet. Die 12-Well-Platten wurden anschließend für 45 min bei RT inkubiert und alle 15 min leicht geschwenkt. Nach dieser Inkubationszeit wurden pro Well 1 ml Avicel-Medium-Lösung aufgetragen und die Platten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Fixieren und Färben des Zellrasens erfolgte nach zwei bis drei Tagen Inkubation durch die Zugabe von 0,5 ml Fixier- und Färbelösung pro Well. Nach 20 min wurde die Lösung in den Wells vollständig abgesaugt, jedes Well zweimal mit 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest.) gewaschen und die Platte getrocknet. Das Auszählen der Plaques erfolgte in den Wells, in denen die Plaques voneinander klar abgegrenzt waren und die Plaqueanzahl zwischen 5 und 100 lag. Über die Anzahl der Plaques bei dieser Verdünnungsstufe und die entsprechende Vorverdünnung konnte dann der Virustiter in plaque forming units (pfu)/ml berechnet werden. Alle Virustiter wurden in Plaque-Test-Duplikaten bestimmt.

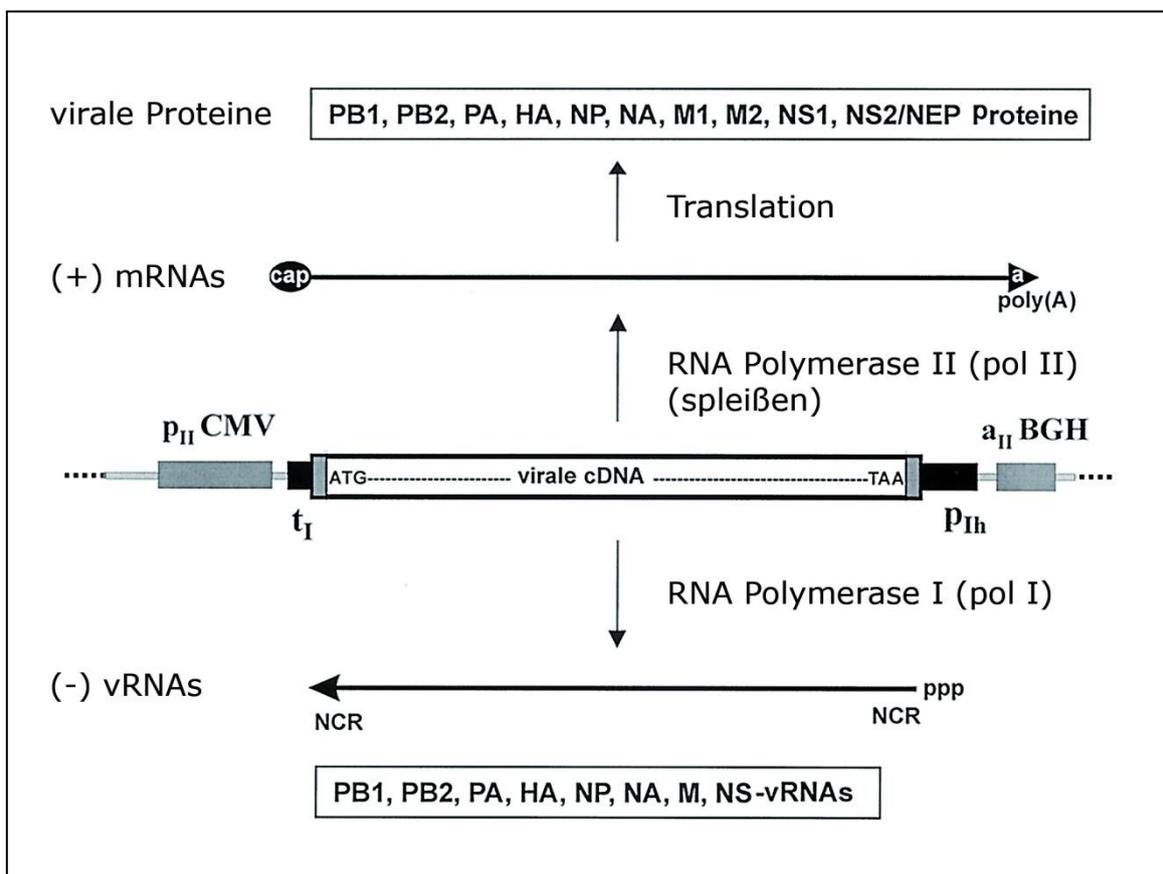
### **3.19 Plaquereinigung von Virusisolaten**

Virusisolate, die aus humanen oder tierischen Proben gewonnen wurden, stellen eine Mischung genetisch nicht identischer Viren dar. Die Plaquereinigung erfolgte mit dem Ziel, aus dieser Mischung mindestens einen einzelnen genetischen Virusklon zu isolieren. Dazu wurden kultivierte MDCK2-Zellen mit PBS „ohne“ gespült, trypsiniert und in Kulturmedium resuspendiert (s. Kap. 3.14). Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) ausgesät und mit Kulturmedium für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit EMEM gespült. Da bei einer Plaquereinigung die Plaques klar voneinander abgegrenzt sein müssen, wurde anhand des bekannten Virustiters des zu reinigenden Virusmaterials die passende Verdünnung, bezogen auf das Infektionsvolumen und die Kulturgefäßfläche, berechnet. Die Verdünnung wurde in PBS\* vorgenommen und als Infektionsvolumen 2050 µl pro Zellkulturschale aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge PBS\* in eine separate Schale pipettiert. Alle Zellkulturschalen wurden für 45 min bei RT inkubiert und alle 15 min leicht geschwenkt. Nach der Inkubationszeit wurde das Infektionsvolumen abgesaugt und die Zellen mit EMEM gespült. Im Anschluss wurde pro Kulturschale 16,4 ml erwärmtes Agar-Overlaymedium aufgetragen und bei RT abgekühlt. Die invertierten Zellkulturschalen wurden für drei Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Isolierung der einzelnen Virusklone wurden die entstandenen Plaques im Zellrasen im Gegenlicht markiert und mittels Pipettenspitze der an dieser Stelle aufliegende Agar abgehoben. Die Agarfragmente wurden jeweils in 325 µl 2xEMEM aufgenommen und bei 4 °C über Nacht (ü.N.) inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 325 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) pipettiert. Die Anzucht der plaquegereinigten Virusklone erfolgte in T25-Zellkulturflaschen (s. Kap. 3.16).

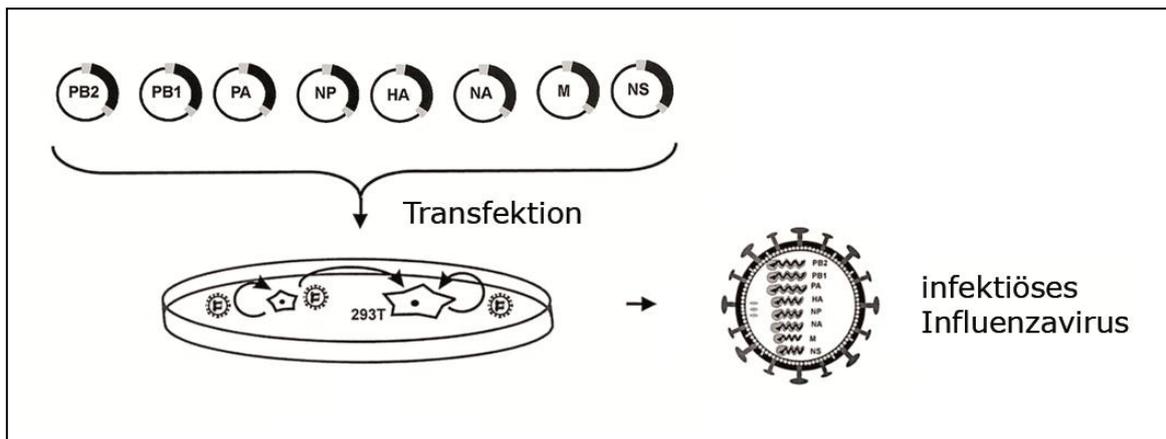
### **3.20 Erzeugung rekombinanter Influenzaviren durch reverse Genetik**

Das gesamte Genom eines Influenzavirus, bestehend aus acht viralen Genomsegmenten, kann nach der Methode von Hoffmann *et al.* [231] in acht pHW2000-Expressionsplasmide kloniert werden (s. Kap. 3.3.1, 3.7, 3.9). Wird

eine eukaryotische Zelle mit einem solchen Plasmid transfiziert, so wird von der viralen cDNA im Plasmid sowohl eine virale genomische RNA als auch eine virale mRNA gebildet: Die RNA-Polymerase I verwendet dabei den  $p_{Ih}$ -Promotor und die  $t_I$ -Terminationssequenz für die Synthese der viralen genomischen RNA, die RNA-Polymerase II den  $p_{II}$ -CMV-Promotor und das  $a_{II}$ -BGH-Polyadenylierungssignal für die Synthese der viralen mRNA (Abbildung 8). Durch die Translation der viralen mRNA werden die viralen Proteine gebildet. Werden alle acht pHW2000-Expressionsplasmide in eine eukaryotische Zelle eingebracht, so werden alle viralen genomischen RNAs und alle viralen Proteine in der Zelle gebildet. Auf diese Weise werden infektiöse und replikationskompetente Viruspartikel erzeugt (Abbildung 9).



**Abbildung 8: Synthese der vRNA und mRNA ausgehend von der viralen cDNA**  
(verändert nach: Hoffmann et al., 2000 [231])



**Abbildung 9: Transfektion des vollständigen pHW2000-Expressionsplasmidsatzes in HEK293T-Zellen zur Generierung infektiöser Influenzaviren**

(verändert nach: Hoffmann et al., 2000 [231])

Liegen von wenigstens zwei verschiedenen Influenzavirus-Stämmen die pHW2000-Expressionsplasmide vor, so kann durch die Transfektion definierter Kombinationen der Expressionsplasmide in HEK 293T-Zellen potentiell jede denkbare Virus-Reassortante erzeugt werden. Als Positivkontrolle wurden alle acht Expressionsplasmide des Influenza A/WSN/1933, als Negativkontrolle nur sieben der acht A/WSN/1933-Plasmide in getrennten Ansätzen transfiziert. Für die Transfektion wurde eine konfluente T75-Zellkulturflasche mit HEK 293T-Zellen 1:2 gesplittet (s. Kap. 3.14) und ü.N. kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS „ohne“ gewaschen, trypsinisiert, in 10 ml HEK 293T-Transfektionsmedium aufgenommen und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 2,5 ml Transfektionsmedium resuspendiert. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden 1,5 ml Transfektionsmedium vorgelegt und 250 µl der HEK 293T-Zellsuspension hinzugefügt. Für die Transfektion der gewünschten Plasmid-Kombination wurden von jedem der acht pHW2000-Expressionsplasmide 0,5 µg in ein Reaktionsgefäß pipettiert und der Ansatz mit *Opti-MEM* (Life Technologies) auf 25 µl aufgefüllt. Pro Transfektionsansatz wurden nun 6 µl *Lipofectamine 2000* (Life Technologies) mit 119 µl *Opti-MEM* separat gemischt, 5 min bei RT inkubiert und dem Ansatz hinzugefügt. Nach mehrmaligem Puls vortexen inkubierte der Transfektionsansatz für 20 min bei RT und wurde anschließend auf die ausgesäten HEK 293T-Zellen in den 6-Well-Platten gegeben. Nach einer Inkubation von 5-6 h im Brutschrank bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und pro Well 2 ml Infektionsmedium

hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert, danach der Zellkulturüberstand mit den infektiösen Viruspartikeln entnommen und für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde anschließend für die Anzucht der Viren auf MDCK2-Zellen (s. Kap. 3.16) verwendet.

### **3.21 Minigenom-Luciferase-Reporterassay zur Bestimmung der Polymeraseaktivität**

Die Polymeraseaktivität definiert zusammengesetzter, viraler Polymerasekomplexe wurde mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega)* untersucht. Dabei wurde ein Plasmid (pPol-A-NS-Luc) mit dem Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* unter der Kontrolle eines Influenza-spezifischen Promotors und ein zweites Plasmid (pTK-Luc) mit einem anderen, konstitutiv exprimierten Luciferase-Gen der Seefeder *Renilla reniformis* in geeignete Zellen kotransfiziert. Wurden zusätzlich zu diesen beiden Plasmiden vier pHW2000-Expressionsplasmide mit den viralen cDNAs der Segmente PB1, PB2, PA und NP kotransfiziert, so wurde durch den von PB1, PB2 und PA gebildeten Polymerasekomplex das Luciferase-Gen des pPol-A-NS-Luc transkribiert. In Abhängigkeit von der Polymeraseaktivität variiert dabei das Maß der Transkription. Das konstitutiv exprimierte Genprodukt des pTK-Luc diente im Hinblick auf eine mögliche unterschiedliche Transfektionseffizienz verschiedener Ansätze der Normalisierung. Die Expression der beiden verschiedenen Luciferasen wurde indirekt über die Luciferase-Aktivität in den Lysaten der transfizierten Zellen gemessen. Die Luciferase-Aktivität der mitgeführten Negativkontrolle wurde auf den Wert Eins gesetzt und alle anderen Messwerte gegen die Negativkontrolle normiert und als [x-fache Aktivität] beschrieben.

Im Vorfeld der Transfektion wurden HEK 293T-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät. Dazu wurde eine konfluente T75-Zellkulturflasche mit PBS „ohne“ gewaschen, trypsiniert, die Zellen in 10 ml HEK 293T-Transfektionsmedium aufgenommen und für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 2,5 ml Transfektionsmedium resuspendiert. In jedes Well der 12-Well-Platte wurde 1 ml Transfektionsmedium vorgelegt und

130 µl Zellsuspension hinzugefügt. Ein Transfektionsansatz bestand aus jeweils 50 ng der pHW2000-Expressionsplasmide mit den viralen cDNAs der Segmente PB1, PB2 und PA, 100 ng des pHW2000-NP-Plasmids, 125 ng pPol-A-NS-Luc und 5 ng pTK-Luc und wurde mit *Opti-MEM* auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Separat wurde eine *Lipofectamine 2000/ Opti-MEM* Suspension im Verhältnis 1:207 angesetzt, 5 min bei RT inkubiert und 125 µl dem Transfektionsansatz hinzugefügt. Nach mehrmaligem Pulsvortexen wurde der Transfektionsansatz bei RT für 20 min inkubiert und anschließend auf die ausgesäten HEK 293T-Zellen in den 12-Well-Platten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 h bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium durch das Infektionsmedium ersetzt. 24 h nach Transfektion wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS „ohne“ gewaschen und mit 100 µl *Passive Lysis Buffer (Promega)* für 10 min bei RT lysiert. Die Zelllysate wurden im Anschluss bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und 20 µl des ÜS in ein Well einer weißen 96-Well-Platte überführt. Die Messung der *Photinus*- und *Renilla*-Luciferaseaktivität erfolgte unter Verwendung der Komponenten des *Dual-Luciferase Reporter Assay Kits (Promega)* in einem *BERTHOLD TriStar LB 941* nach Herstellervorschrift. Als Positivkontrolle wurden neben den Luciferaseplasmiden vier pHW2000-Expressionsplasmide (PB1, PB2, PA und NP) des Isolats A/WSN/1933 transfiziert. Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle fehlte demgegenüber das pHW2000-PB1-(WSN)-Plasmid. Alle Ansätze zur Messung der Polymeraseaktivität definierter Polymerasekomplexe wurden drei Mal zeitlich unabhängig voneinander und jeweils in Duplikaten transfiziert.

## **3.22 Replikationskinetik**

### **3.22.1 Replikationskinetik in humanen A549-Zellen**

Um die Replikationseigenschaften der Parentalviren und Reassortanten beurteilen zu können, wurden Virusvermehrungsversuche in Zellkulturen humaner A549-Lungenzellen durchgeführt. Dazu wurden in Kultur befindliche A549-Zellen trypsiniert, resuspendiert (s. Kap. 3.14) und gezählt (s. Kap. 3.15). In jede T25-Zellkulturflasche wurden 10 ml Kulturmedium vorgelegt und  $2,08 \times 10^6$  A549-Zellen ausgesät. Nach einer Inkubation von 72 h im

Brutschrank waren die A549-Zellen zu 100 % konfluent und konnten für den Replikationsversuch verwendet werden. Vor der Infektion wurden die Zellen aus drei zufällig ausgewählten T25-Flaschen trypsinisiert, resuspendiert und gezählt, um die durchschnittliche Zellzahl pro T25-Flasche zu bestimmen. Um die Infektion mit einer definierten MOI von 0,01 durchzuführen, wurde auf Basis dieser Zellzahl pro T25-Flasche, dem jeweiligen bekannten Titer des Virusmaterials und dem festgelegten Infektionsvolumen von 650 µl pro T25-Flasche das Virusmaterial entsprechend in PBS\* verdünnt. Die konfluenten A549-Zellen wurden vor der Infektion zweimal mit DMEM-Medium gespült und das Medium vollständig entfernt. Pro Zellkulturflasche wurden 650 µl des virushaltigen Materials auf die Zellen aufgetragen, für 45 min bei RT inkubiert und dabei die T25-Flaschen alle 15 min leicht geschwenkt. Danach wurden das Infektionsvolumen abgenommen, die Zellen zweimal mit DMEM-Medium gespült und je T25-Flasche 7,5 ml trypsinhaltiges A549-Infektionsmedium hinzugefügt. Der Zustand der Zellen wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Alle Replikationskinetik-Ansätze wurden für 72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h p.i. wurden jeweils 300 µl Medium aus den Zellkulturflaschen entnommen. Die Proben wurden bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser bis zur Virustitration (s. Kap. 3.18) bei -80 °C gelagert. Alle Replikationskinetiken wurden zwei Mal zeitlich unabhängig voneinander und jeweils in Duplikaten durchgeführt.

### **3.22.2 Bewertung des cytopathischen Effekts nach Infektion**

Der Zellzustand der A549-Zellen bzw. der CPE wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops zum Zeitpunkt der Infektion (0 h p.i.) und 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h p.i. beurteilt und fotografisch dokumentiert. Bei der Beurteilung wurden die Kriterien zellmorphologische Veränderungen, Anzahl abgelöster Zellen im Kulturüberstand sowie die Konfluenz herangezogen und in ihrer Ausprägung beurteilt (Tabelle 18). Auf Basis der jeweiligen Ausprägung der Kriterien wurde der Grad des CPEs insgesamt als stark, deutlich, sichtbar (leicht) oder kein CPE eingestuft und entsprechend einem CPE-Score von 3 bis 0 zugeordnet (Tabelle 19). Je Virus und Zeitpunkt wurde aus zwei CPE-Scorewerten aus der Beurteilung zweier zeitlich unabhängig voneinander durchgeführter Replikationskinetiken ein Mittelwert berechnet.

**Tabelle 18: Kriterien für die Beurteilung des beobachteten CPE**

<b>Kriterium</b>	<b>Ausprägung des Kriteriums</b>			
zellmorphologische Veränderungen (Abkuglung)	keine	leicht	deutlich	stark
Anzahl abgelöster Zellen im Kulturüberstand	sehr wenige	wenige	mittelmäßig viele	viele
Konfluenz	95-100 %	80-95 %	50-80 %	< 50 %

**Tabelle 19: Beschreibung des CPEs und Zuordnung zu einem Scorewert**

<b>Zellzustand/ CPE</b>	<b>CPE-Score</b>
kein CPE	0
sichtbarer (leichter) CPE	1
deutlicher CPE	2
(sehr) starker CPE	3

### **3.23 Messung der Interferonsekretion von humanen A549-Zellen nach Infektion**

Die Messung der sekretierten Interferone erfolgte in Zellkulturüberständen infizierter A549-Zellen. Um diese Überstände zu erhalten, wurden kultivierte A549-Zellen zunächst trypsiniert, resuspendiert (s. Kap. 3.14) und gezählt (s. Kap. 3.15). Pro Well einer 12-Well-Platte wurde 1 ml A549-Kulturmedium vorgelegt und 400.000 Zellen/Well ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert, damit sie eine Konfluenz von 100 % erreichen konnten. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen aus zwei Wells einer 12-Well-Platte trypsiniert, resuspendiert und gezählt, um die durchschnittliche Zellzahl pro Well zu ermitteln. Aus der Zellzahl pro Well, dem Titer des Virusmaterials und dem Infektionsvolumen von 255 µl ergab sich ein Verdünnungsfaktor, mit dem das jeweilige Virusmaterial in PBS\* verdünnt wurde, um eine MOI von 0,4 zu erreichen. Kurz vor der Infektion wurden die konfluenten A549-Zellen in den Wells zweimal mit DMEM-Medium gespült und das Medium vollständig entfernt. Pro Well wurden 255 µl des zuvor verdünnten Virusmaterials aufgetragen, bei RT für 45 min inkubiert und dabei in 15-minütigen Intervallen leicht geschwenkt. Nach der Inkubationszeit wurde das Infektionsvolumen entfernt, die Zellen zweimal mit DMEM-Medium gespült und 1 ml A549-Infektionsmedium pro Well hinzugefügt. Nach der Beurteilung des Zustands der A549-Zellen im Lichtmikroskop wurden die Ansätze für 24 h

bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut von jedem Well der Zellzustand/ CPE beurteilt und 900 µl des Überstands abgenommen, dieser bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. In jedem Versuch wurden mit A/PR/8/1934 delta NS1 infizierte Kontrollzellen (PK dNS1) und eine nicht infizierte Zellkontrolle als Negativkontrolle (NK) mitgeführt. Die Infektionsversuche zur Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden drei Mal zeitlich unabhängig voneinander und jeweils in Duplikaten wiederholt.

### **3.23.1 IFN-β ELISA**

Die Quantifizierung des humanen Interferon-β (IFN-β) in den Zellkulturüberständen infizierter A549-Zellen erfolgte mit dem *Human Interferon-β ELISA Kit (FUJIREBIO)*. Das verwendete Laborprotokoll für den ELISA folgte dabei den Empfehlungen des Herstellers. Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, die Referenzwellenlänge betrug 650 nm. Für jedes Parentalvirus bzw. jede Reassortante waren Zellkulturüberstände aus sechs Infektionsversuchen vorhanden, da diese Versuche drei Mal zeitlich unabhängig voneinander und jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (s. Kap. 3.23). Jede dieser Proben wurde einfach bestimmt. Auf jeder 96-Well-ELISA-Platte wurde die Standardreihe in Duplikaten vermessen. Mit Hilfe der Absorptionswerte des Standards konnte anhand der bekannten Konzentrationen eine Standardgerade errechnet werden, die anschließend der Berechnung des IFN-β-Gehalts in den unbekanntenen Proben diente.

### **3.23.2 IFN-λ2 ELISA**

Mit dem *Human IFN-λ2 Kit (R&D Systems)* konnte der Gehalt des humanen Interferon-λ2 (IFN-λ2) in den Zellkulturüberständen infizierter A549-Zellen bestimmt werden. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die Absorption im ELISA-Reader gemessen. Die verwendete Referenzwellenlänge betrug 540 nm. Pro Parentalvirus und Reassortante waren sechs Zellkulturüberstände vorhanden, da die Infektionsversuche drei Mal zeitlich unabhängig voneinander und jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (s. Kap. 3.23). Jede dieser Proben wurde einfach gemessen. Die Standardreihe wurde auf

jeder 96-Well-ELISA-Platte in Duplikaten vermessen. Mittels nichtlinearer Regression der log-transformierten Mittelwerte der Absorption der Verdünnungsstufen des Standards wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism eine Standardkurve berechnet. Diese diente der Quantifizierung des humanen IFN- $\lambda$ 2 in den unbekanntenen Proben.

### **3.24 Statistische Analysen**

Die statistische Analyse der Messwerte erfolgte mit einer ein- oder zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test. Das Konfidenzintervall wurde auf 95 % festgelegt. Das Signifikanzniveau ist durch die Anzahl der Sterne (\*) gekennzeichnet. Dabei entspricht \* einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ , \*\* einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  und \*\*\* einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,001$ . Die Berechnungen wurden mit der Statistik-Software GraphPad Prism v5.01 durchgeführt.

# Ergebnisse

## 4.1 Charakteristika der Parentalviren

Als Parentalviren für die Generierung von Reassortanten wurden das humane H1N1-Isolat A/NewCaledonia/20/99, das porcine H1N1-Isolat A/NSA/58/2007 und der hochpathogene aviäre H5N1-Stamm A/whooperswan/R65/2006 ausgewählt. Der humane H1N1-Stamm A/NewCaledonia/20/99 wurde 1999 isoliert. Da dieses Isolat in seiner Antigenität mit den damals zirkulierenden H1N1-Stämmen gut übereinstimmte, wurden A/NewCaledonia/20/99-ähnliche Viren als H1N1-Komponente in humanen Influenzaimpfstoffen der Influenzasaisons 2000/2001 bis 2006/2007 eingesetzt. A/NewCaledonia/20/99 repräsentiert somit einen über mehrere Jahre erfolgreich zirkulierenden humanen Influenzastamm. Das porcine H1N1-Isolat A/NSA/58/2007 gehört der aviären Linie der porcinen H1N1-Viren an. Es ist somit mit Influenzaviren verwandt, die sich seit dem Ende der 1970er Jahre in der Schweinepopulation Europas erfolgreich verbreiteten und bis heute zirkulieren. Das Virus wurde, obgleich ein porcines Virus, am RKI aus einer humanen Probe isoliert. Es ist im Gegensatz zu anderen porcinen Viren des Subtyps H3N2 und H1N2, die ebenfalls in den europäischen Schweinepopulationen zirkulieren, keine Reassortante mit Segmenten humanen Ursprungs. Als aviäres Virus sollte ein hochpathogenes aviäres H5N1-Isolat mit multibasischer Spaltstelle im HA ausgewählt werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Isolat A/whooperswan/R65/2006 verwendet, das durch das Friedrich-Loeffler-Institut aus einem toten Singschwan isoliert wurde.

Die viralen Proteine des humanen und porcinen H1N1- sowie des aviären H5N1-Influenzavirus wurden hinsichtlich ihrer Sequenzidentität analysiert (Tabelle 20). Dadurch kann im weiteren Verlauf der Studie die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der codierten Genprodukte bei der Bewertung der Kompatibilität der Segmente einbezogen werden. Es zeigten sich bezüglich der Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA ähnlich große Unterschiede zwischen porcinem und humanem H1N1 mit einer AS-Identität von 93-94 % wie von beiden Viren zum aviären H5N1-Virus (94-96 % bzw. 94-95 %) (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Identität der Genprodukte zwischen den Parentalviren A/NSA/58/2007 (porcines H1N1), A/NewCaledonia/20/99 (humanes H1N1) und A/whooperswan/R65/2006 (aviäres H5N1)**

<b>PB1</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,93	0,94
humanes H1N1	0,93		0,95
aviäres H5N1	0,94	0,95	
<b>PB2</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,94	0,96
humanes H1N1	0,94		0,95
aviäres H5N1	0,96	0,95	
<b>PA</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,93	0,95
humanes H1N1	0,93		0,94
aviäres H5N1	0,95	0,94	
<b>HA</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,78	0,61
humanes H1N1	0,78		0,61
aviäres H5N1	0,61	0,61	
<b>NP</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,91	0,96
humanes H1N1	0,91		0,92
aviäres H5N1	0,96	0,92	
<b>NA</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,81	0,84
humanes H1N1	0,81		0,81
aviäres H5N1	0,84	0,81	
<b>M1</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,92	0,94
humanes H1N1	0,92		0,92
aviäres H5N1	0,94	0,92	
<b>M2</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,77	0,89
humanes H1N1	0,77		0,85
aviäres H5N1	0,89	0,85	
<b>NS1</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,82	0,82
humanes H1N1	0,82		0,82
aviäres H5N1	0,82	0,82	
<b>NS2</b>	porcines H1N1	humanes H1N1	aviäres H5N1
porcines H1N1		0,91	0,90
humanes H1N1	0,91		0,88
aviäres H5N1	0,90	0,88	

Für das HA-Protein sind die ermittelten Unterschiede zwischen dem porcinen und humanen H1N1 mit 78 % AS-Identität deutlich kleiner als zwischen den porcinen oder humanen H1N1-Viren zum aviären H5N1-Virus (61 % AS-Identität). Das Oberflächenprotein NA betreffend ergeben sich mit einer AS-Identität von 81 % (porcin/ humanes H1N1) bzw. 81-84 % (human/ aviäres und porcin/ aviäres Parentalvirus) hingegen ähnliche Sequenzidentitäten. Die Identität zwischen den NP-Proteinen des porcinen und aviären Parentalvirus ist mit 96 % höher bestimmt worden als die Sequenzidentität zwischen dem porcinen bzw. aviären und dem humanen Virus (91 % bzw. 92 %). Die Unterschiede zwischen den M1-Proteinen der drei Parentalviren sind ähnlich groß (92-94 % Identität). Zwischen dem humanen und porcinen M2-Protein existieren vergleichsweise große Unterschiede (77 % Identität), während sich die M2-Proteine des humanen und aviären (85 %) oder des porcinen und aviären Virus (89 % Identität) in ihrer AS-Sequenz stärker ähneln. Gleich bzw. ähnlich hohe Übereinstimmungen der AS-Sequenz wurden für das NS1- (82 %) und auch das NS2-Protein (88-91 %) für alle drei Parentalviren ermittelt. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich alle drei Parentalviren - und insbesondere auch das porcine und humane Parentalvirus trotz des formal gleichen H1N1-Subtyps - z.T. deutlich in der Aminosäuresequenz der viralen Genprodukte unterscheiden.

In der wissenschaftlichen Literatur sind eine Vielzahl von Wirts- und Virulenzdeterminanten von Influenzaviren beschrieben. Einige der prominentesten wie beispielsweise das PB1-F2-Protein, die PB2-Polymorphismen 627K und 701N, die mono- und multibasische HA-Spaltstelle oder eine Deletion in der NA-Stielregion sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die Existenz des jeweiligen Merkmals ist für jedes der drei Parentalviren analysiert worden (Tabelle 21). Eine umfangreiche Liste weiterer Wirts- und Virulenzdeterminanten ist im Anhang aufgeführt und wird auch in der Diskussion verwendet.

**Tabelle 21: bedeutende Virulenzfaktoren/ Polymorphismen und Existenz des Merkmals in den PB1-, PB2-, HA- und NA-Proteinen der Parentalviren**

Protein	Merkmal	Folge des Merkmals	Merkmal vorhanden (Aminosäure)			Referenz
			A/NSA/58/07	A/NewCaledonia/20/99	A/whooperswan/R65/06	
PB1	PB1-F2 (Protein)	<p>ein Verlust der PB1-F2-Expression bleibt ohne Auswirkung auf die Polymeraseaktivität und die Virusreplikation in Zellkultur;                      ohne PB1-F2 kommt es in Mäusen zu verminderter Pathogenität und früherer Virus-clearance; die Expression von PB1-F2 erhöht die Pathogenität in Mäusen; PB1-F2 moduliert die frühe Immunantwort des Wirtes: PB1-F2-Expression steigert angeborene Immunantwort und führt zu erhöhter IFN-beta Expression;</p> <p>Expression des PB1-F2 führt zu Zerstörung des mitochondrialen Membran-Potentials und induziert vermutlich auf diese Weise (in lymphozytären Zellen) Apoptose</p>	ja	nein	ja	[20, 49-54, 57]
PB2	E627K	<p>E: vorwiegend bei aviären Isolaten                      K: vorwiegend bei humanen Isolaten;                      steigert Polymeraseaktivität in Säugerzellen aufgrund erhöhter Bindung von PB2 an NP (im vRNP) und RNA; steigert Replikation in Säugerzellen (z.B. Maus) und Säugern (Mäuse, Totenkopffäffchen); erhöhte Pathogenität in Säugern (Mäusen); beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; somit an Adaptation von Viren an Säuger beteiligt</p>	nein (E)	ja (K)	ja (K)	[232-248]
PB2	D701N	<p>steigert Polymeraseaktivität und Replikation in Säugerzellen; Steigerung der Pathogenität in Mäusen;                      kann wirtsspezifisch die Abwesenheit von 627K z.T. kompensieren; beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; steigert nukleären PB2-Import in Säugerzellen (nicht jedoch in aviären Zellen); somit an Adaptation aviärer Viren an Säuger beteiligt</p>	ja (N)	nein (D)	nein (D)	[242, 249-255]

<b>HA</b>	<b>monobasische HA0-Spaltstelle</b>	Spaltung des HA0 (HA-Reifung) nur durch spez. Proteasen, die nur im Respirationstrakt vorkommen: Proteasen Clara und Mini-Plasmin, Serinproteasen TMPRSS2 und HAT; Spaltung erfolgt nach Virion-Freisetzung aus Zelle, also extrazellulär; folglich Einfluss auf Pathogenität, da Ausbreitung der Infektion auf Respirationstrakt beschränkt	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>[61-64]</b>
<b>HA</b>	<b>multibasische HA0-Spaltstelle</b>	Spaltung des HA0 (HA-Reifung) durch intrazelluläre Proteasen: Furin (in Golgi-Vesikeln), weitere subtilisinähnliche Proteasen wie PC6 (ubiquitär in vielen Gewebstypen); Spaltung erfolgt bereits intrazellulär (durch häufig in Geweben vorkommende Proteasen); folglich Einfluss auf Pathogenität, da systemische Ausbreitung der Infektion möglich (hohe Pathogenität mögl.)	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>[64-68]</b>
<b>NA</b>	<b>allgemein</b>	Neuraminidasen unterscheiden auch zwischen $\alpha 2,3$ - und $\alpha 2,6$ -verknüpften Sialinsäuren: -aviäre NAs: spalten sehr stark bevorzugt $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäuren; kaum $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren -porcine NAs: spalten zwar bevorzugt $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäuren; aber auch $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren -humane NAs: spalten leicht bevorzugt $\alpha 2,3$ -SAs, aber auch $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren	<b>porcines NA</b>	<b>humanes NA</b>	<b>aviäres NA</b>	<b>[80-83]</b>
<b>NA</b>	<b>Deletion in NA-Stiel-Region</b>	Deletion in NA-Stielregion vermindert Fähigkeit den Sialinsäurerezeptor zu spalten; dies führt u.a. zu verminderter Freisetzung neugebildeter Viruspartikel von der Wirtszelloberfläche; Deletion in NA-Stielregion bei H5N1-Isolaten aus Menschen häufig; mit erhöhter Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern assoziiert	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>ja (49-68)</b>	<b>[256-258]</b>

## 4.2 Erzeugung eines Expressionsplasmid-Satzes auf Basis des porcinen H1N1-Virus

Nach der Plaquereinigung (s. Kap. 3.19) des porcinen H1N1 Isolats A/NSA/58/2007 wurden ausgehend von den genomischen Segmenten acht virale cDNAs erzeugt (s. Kap. 3.1, 3.2). Diese konnten anschließend über mehrere Zwischenschritte (s. Kap. 3.3, 3.4, 3.5, 3.7, 3.9) erfolgreich in jeweils einen pHW2000-Expressionsvektor kloniert und die Plasmide in Bakterien amplifiziert werden (s. Kap. 3.10, 3.11, 3.13). Aus den Plasmiden, die sich

nach einer Sequenzierung (s. Kap. 3.7.1) als frei von nicht-synonymen Mutationen zeigten, wurde ein Plasmidsatz, bestehend aus acht Expressionsplasmiden mit allen viralen cDNAs, zusammengestellt. Mit der in Kap. 3.20 beschriebenen Methode, durch die ausgehend von diesem Plasmidsatz infektiöse und replikationskompetente A/NSA/58/2007-Viren generiert werden konnten, wurde die Funktionsfähigkeit dieser Plasmide erfolgreich geprüft.

### **4.3 Untersuchung der Kompatibilität der viralen genomischen Segmente durch Erzeugung von Reassortanten**

Alle Arbeiten zur unmittelbaren Generierung von Parentalviren oder Reassortanten wurden unter hohen Sicherheitsanforderungen in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 (S3) durchgeführt. Ebenso wurden alle weiteren Tätigkeiten mit infektiösen und replikationskompetenten Viren, die beispielsweise der Charakterisierung der Parentalviren und Reassortanten dienen, in einem S3-Labor vorgenommen.

Für die Generierung des humanen (A/NewCaledonia/20/99) und des aviären Parentalvirus (A/whooperswan/R65/2006) nach der in Kap. 3.20 beschriebenen Methode wurden bereits vorhandene Expressionsplasmidsätze verwendet. Durch die erfolgreiche Erzeugung dieser beiden Parentalviren wurde die Funktionsfähigkeit jedes Plasmides des jeweiligen Plasmidsatzes gezeigt. Das porcine Parentalvirus (A/NSA/58/2007) wurde im Rahmen der Prüfung der Funktionsfähigkeit der in dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmide (s. Kap. 4.1) generiert.

Neben den drei Parentalviren sollten insgesamt 15 rekombinante Viren erzeugt werden (Tabelle 22). Von diesen Reassortanten sollten acht die porcinen NP-, M- und NS-Segmente, die aviären HA- und zum Teil auch NA-Segmente sowie Polymerasesegmente porcinen, aviären und humanen Ursprungs besitzen. Das Genom der übrigen sieben Reassortanten sollte aus den humanen NP-, M- und NS-Segmenten, den porcinen HA- und größtenteils auch NA-Segmenten und humanen, porcinen und aviären Polymerasesegmenten zusammengesetzt sein. Die Kombinationen der Genomsegmente der zu erzeugenden Influenzaviren

waren in einer Art und Weise gewählt (Tabelle 22), möglichst viele Viren, die sich nur in einem einzelnen Segment unterscheiden, zu generieren. Für jedes Virus mit einer in Tabelle 22 aufgeführten Segmentkombination wurden für die Generierung bis zu drei voneinander unabhängige Laborversuche unternommen.

Von den 15 Influenzavirus-Reassortanten unterschiedlichster Zusammensetzung konnten 14 Viren (93,3 %) erfolgreich generiert werden (Tabelle 22). Dazu zählen alle Viren mit nur einem (Virus A und E) oder zwei Segmentaustauschen (Virus C und I) in den Oberflächenproteinen HA und NA, wobei die übrigen Segmente weiterhin porcinen bzw. humanen Ursprungs waren. Ebenso konnten nahezu alle Reassortanten mit bis zu drei Austausch in den Polymeraseproteinen (PB1, PB2 und PA), zusätzlich zum HA- und NA-Austausch, erzeugt werden (Virus D, S, H, O, P, T, R, F, U, N). Das Genom der human-porcinen Reassortante W, die nicht generiert werden konnte, sollte aus humanen NP-, M-, NS- und PA- sowie porcinen PB1-, PB2-, HA- und NA-Segmenten bestehen.

**Tabelle 22: Parentalviren (K, B, L) und rekombinante Viren, die durch reverse Genetik generiert wurden**

Virus-ID	PB1	PB2	PA	HA	NP	NA	M	NS	generiert
K	human	+							
B	porcin	+							
L	aviär	+							
A	porcin	porcin	porcin	aviär	porcin	porcin	porcin	porcin	+
C	porcin	porcin	porcin	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
D	aviär	porcin	porcin	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
S	aviär	porcin	aviär	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
H	aviär	aviär	aviär	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
O	aviär	human	aviär	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
P	aviär	human	porcin	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
T	aviär	human	human	aviär	porcin	aviär	porcin	porcin	+
E	human	human	human	porcin	human	human	human	human	+
I	human	human	human	porcin	human	porcin	human	human	+
R	aviär	human	human	porcin	human	porcin	human	human	+
F	porcin	human	human	porcin	human	porcin	human	human	+
U	porcin	human	porcin	porcin	human	porcin	human	human	+
W	porcin	porcin	human	porcin	human	porcin	human	human	-
N	porcin	porcin	porcin	porcin	human	porcin	human	human	+

#### **4.4 Untersuchung der Kompatibilität der Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA sowie des NP-Proteins durch Analyse der Polymeraseaktivität**

Durch die Analyse der Polymeraseaktivität des aus dem PB1-, PB2- und PA-Protein bestehenden Polymerasekomplexes, der mit den NP-Proteinen interagiert, kann auf die Kompatibilität dieser Proteine untereinander geschlossen werden. Die Polymeraseaktivität wurde mit dem Minigenom-Luciferase-Reporterassay in humanen HEK 293T-Zellen bestimmt (s. Kap. 3.21). Die Aktivität der Negativkontrolle (NK) wurde auf den Wert Eins gesetzt und alle anderen Messwerte dagegen normiert. Als Positivkontrolle (PK) wurde der Polymerasekomplex und das NP-Protein des Influenzavirus-Isolats A/WSN/1933 verwendet (Tabelle 23).

Die Ergebnisse der Analyse der Polymeraseaktivität aller 81 möglichen Kombinationen der PB1-, PB2-, PA- und NP-Proteine sind in Tabelle 23 aufgeführt und in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Insgesamt wird das sehr unterschiedliche Niveau der Polymeraseaktivität der verschiedenen Polymerase-Kombinationen (PoK) deutlich. Viele Kombinationen weisen eine sehr geringe Polymeraseaktivität auf, die nur wenig höher als die der Negativkontrolle (NK) ist und unterhalb einer 10-fachen Aktivität verbleibt (Tabelle 23). Diese, im Verhältnis zur Positivkontrolle (PK) außerordentlich geringe Polymeraseaktivität der PoK 3-11, 22, 24-26, 28, 30-38, 49-56, 58, 60-64 und 79 ist in allen Fällen durch das Vorhandensein entweder eines porcinen oder aviären PB2-Segments gekennzeichnet (Tabelle 23 und Abbildung 10). Die Polymerase-Kombinationen 12, 13, 19, 20, 39, 41, 77 und 83 zeigen hingegen eine mittlere und mit der PK vergleichbare Polymeraseaktivität zwischen 200 und 400-facher Aktivität. Diese Kombinationen besitzen ein humanes PB2- mit porcinem oder humanem PB1-Segment oder alternativ ein aviäres PB2- in Verbindung mit einem aviären PB1-Segment. Die drei Polymerase-Kombinationen 69-71 weisen im Minigenom-Luciferase-Reporterassay eine hohe, 500-fache Polymeraseaktivität auf. Eine mehr als 1000-fache bis nahezu 2000-fache, außerordentlich starke Polymeraseaktivität zeigen die Kombinationen 66-68 und 72-74 (Tabelle 23 und Abbildung 10). Das gemeinsame Merkmal dieser neun Polymerase-Kombinationen ist ein aviäres PB1- und ein humanes PB2-Segment.

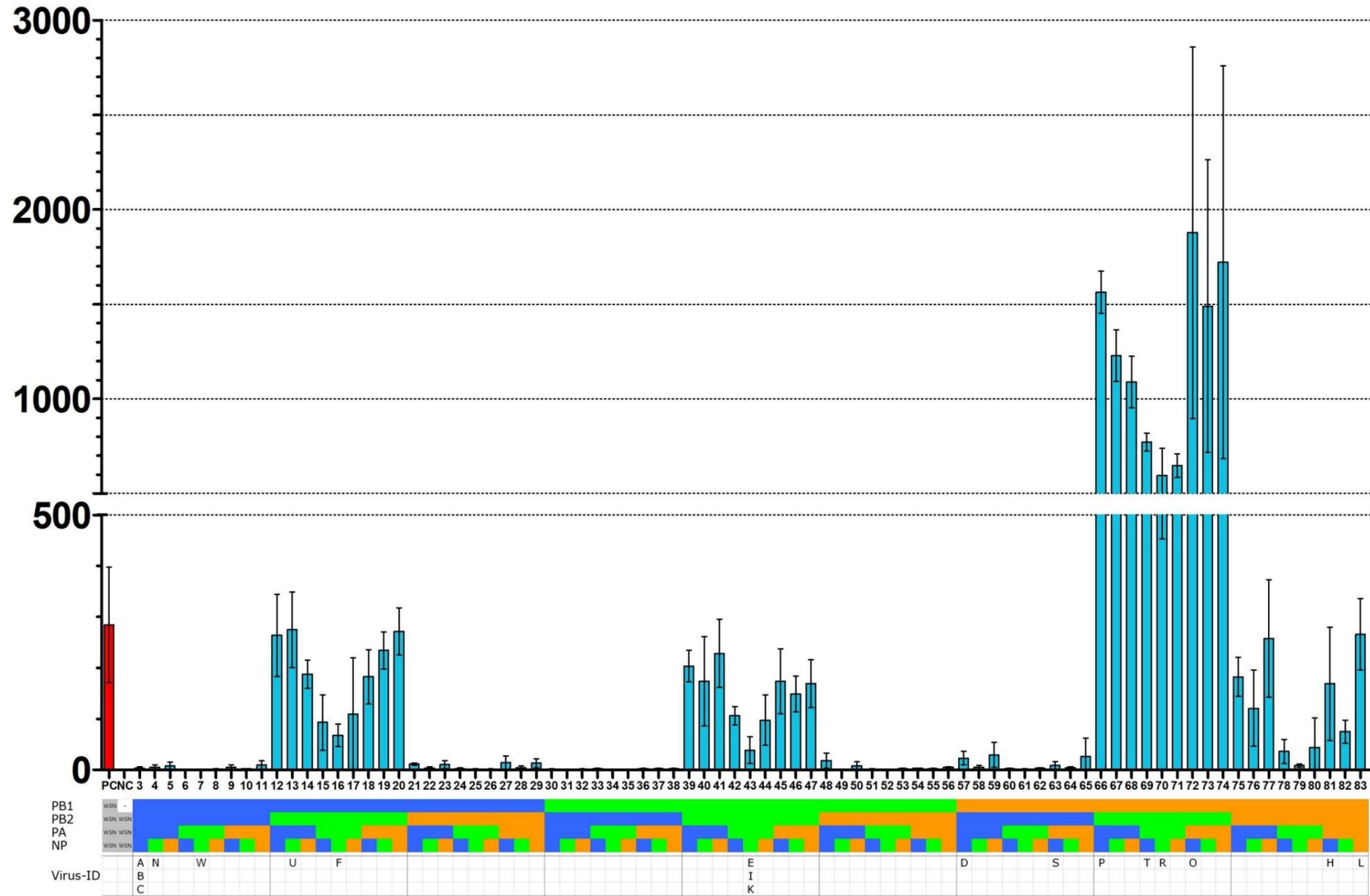
**Tabelle 23: Polymeraseaktivität der definierten Polymerase-Kombinationen**

<b>Polymerase-Kombination (PolK) Nr.</b>	<b>PB1</b>	<b>PB2</b>	<b>PA</b>	<b>NP</b>	<b>Virus-ID</b>	<b>Polymerase-aktivität [x-fache Aktivität]</b>
<b>PK</b>	WSN	WSN	WSN	WSN		<b>284,0</b>
<b>NK</b>	-	WSN	WSN	WSN		<b>1,0</b>
<b>3</b>	porcin	porcin	porcin	porcin	<b>A, B, C</b>	<b>3,3</b>
<b>4</b>	porcin	porcin	porcin	human	<b>N</b>	<b>4,6</b>
<b>5</b>	porcin	porcin	porcin	aviär		<b>7,5</b>
<b>6</b>	porcin	porcin	human	porcin		<b>1,2</b>
<b>7</b>	porcin	porcin	human	human	<b>W</b>	<b>1,1</b>
<b>8</b>	porcin	porcin	human	aviär		<b>1,6</b>
<b>9</b>	porcin	porcin	aviär	porcin		<b>4,9</b>
<b>10</b>	porcin	porcin	aviär	human		<b>2,2</b>
<b>11</b>	porcin	porcin	aviär	aviär		<b>9,3</b>
<b>12</b>	porcin	human	porcin	porcin		<b>263,6</b>
<b>13</b>	porcin	human	porcin	human	<b>U</b>	<b>274,7</b>
<b>14</b>	porcin	human	porcin	aviär		<b>187,4</b>
<b>15</b>	porcin	human	human	porcin		<b>92,8</b>
<b>16</b>	porcin	human	human	human	<b>F</b>	<b>67,4</b>
<b>17</b>	porcin	human	human	aviär		<b>109,6</b>
<b>18</b>	porcin	human	aviär	porcin		<b>182,5</b>
<b>19</b>	porcin	human	aviär	human		<b>234,2</b>
<b>20</b>	porcin	human	aviär	aviär		<b>271,4</b>
<b>21</b>	porcin	aviär	porcin	porcin		<b>11,3</b>
<b>22</b>	porcin	aviär	porcin	human		<b>3,3</b>
<b>23</b>	porcin	aviär	porcin	aviär		<b>10,3</b>
<b>24</b>	porcin	aviär	human	porcin		<b>2,2</b>
<b>25</b>	porcin	aviär	human	human		<b>1,5</b>
<b>26</b>	porcin	aviär	human	aviär		<b>1,7</b>
<b>27</b>	porcin	aviär	aviär	porcin		<b>13,9</b>
<b>28</b>	porcin	aviär	aviär	human		<b>4,1</b>
<b>29</b>	porcin	aviär	aviär	aviär		<b>13,0</b>
<b>30</b>	human	porcin	porcin	porcin		<b>1,6</b>
<b>31</b>	human	porcin	porcin	human		<b>1,1</b>
<b>32</b>	human	porcin	porcin	aviär		<b>1,7</b>
<b>33</b>	human	porcin	human	porcin		<b>2,1</b>
<b>34</b>	human	porcin	human	human		<b>1,2</b>
<b>35</b>	human	porcin	human	aviär		<b>1,3</b>
<b>36</b>	human	porcin	aviär	porcin		<b>2,3</b>
<b>37</b>	human	porcin	aviär	human		<b>2,1</b>
<b>38</b>	human	porcin	aviär	aviär		<b>2,4</b>
<b>39</b>	human	human	porcin	porcin		<b>203,3</b>
<b>40</b>	human	human	porcin	human		<b>173,5</b>
<b>41</b>	human	human	porcin	aviär		<b>228,3</b>
<b>42</b>	human	human	human	porcin		<b>106,1</b>
<b>43</b>	human	human	human	human	<b>E, I, K</b>	<b>38,4</b>
<b>44</b>	human	human	human	aviär		<b>97,3</b>

<b>Polymerase-Kombination (PolK) Nr.</b>	<b>PB1</b>	<b>PB2</b>	<b>PA</b>	<b>NP</b>	<b>Virus-ID</b>	<b>Polymerase-aktivität [x-fache Aktivität]</b>
45	human	human	aviär	porcin		173,7
46	human	human	aviär	human		148,7
47	human	human	aviär	aviär		169,1
48	human	aviär	porcin	porcin		18,0
49	human	aviär	porcin	human		1,5
50	human	aviär	porcin	aviär		7,5
51	human	aviär	human	porcin		1,7
52	human	aviär	human	human		1,2
53	human	aviär	human	aviär		2,2
54	human	aviär	aviär	porcin		2,9
55	human	aviär	aviär	human		2,5
56	human	aviär	aviär	aviär		5,2
57	aviär	porcin	porcin	porcin	<b>D</b>	22,8
58	aviär	porcin	porcin	human		4,7
59	aviär	porcin	porcin	aviär		29,3
60	aviär	porcin	human	porcin		2,3
61	aviär	porcin	human	human		1,8
62	aviär	porcin	human	aviär		3,0
63	aviär	porcin	aviär	porcin	<b>S</b>	8,6
64	aviär	porcin	aviär	human		4,0
65	aviär	porcin	aviär	aviär		25,9
66	aviär	human	porcin	porcin	<b>P</b>	1563,4
67	aviär	human	porcin	human		1228,2
68	aviär	human	porcin	aviär		1088,7
69	aviär	human	human	porcin	<b>T</b>	771,7
70	aviär	human	human	human	<b>R</b>	595,5
71	aviär	human	human	aviär		647,1
72	aviär	human	aviär	porcin	<b>O</b>	1877,4
73	aviär	human	aviär	human		1490,3
74	aviär	human	aviär	aviär		1721,2
75	aviär	aviär	porcin	porcin		182,2
76	aviär	aviär	porcin	human		120,6
77	aviär	aviär	porcin	aviär		257,3
78	aviär	aviär	human	porcin		36,0
79	aviär	aviär	human	human		8,3
80	aviär	aviär	human	aviär		44,0
81	aviär	aviär	aviär	porcin	<b>H</b>	168,6
82	aviär	aviär	aviär	human		74,7
83	aviär	aviär	aviär	aviär	<b>L</b>	265,7

# Polymeraseaktivität

Polymeraseaktivität [x-fache Aktivierung]



Kombination der Polymerase- (PB1, PB2, PA) und NP-Segmente

n=6  
MW ± SD

- WSN Segment des A/WSN/1933 (Positiv-/ Negativkontrolle)
- Segment des porcinen H1N1
- Segment des humanen H1N1
- Segment des aviären H5N1

Abbildung 10: Polymeraseaktivität definierter Polymerase-Kombinationen (PoIK) (ohne Darstellung von Signifikanzen)

Der Austausch einzelner Segmente einer Polymerase-Kombination hat zum Teil große Auswirkungen auf das Maß der Polymeraseaktivität. Im Folgenden wird daher auf den Austausch von einzelnen Segmenten näher eingegangen. Es werden dabei vor allem die Polymerase-Kombinationen (PolK) 12-20, 39-47 und 66-83 betrachtet, da bei den übrigen PolK die Polymeraseaktivität generell sehr niedrig ist und Unterschiede nicht signifikant sind.

#### **4.4.1 Austausch des PB1-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität**

Der Austausch des porcinen gegen das humane PB1-Segment führt unabhängig von den übrigen Segmenten nicht zu einer veränderten Polymeraseaktivität, wie bei einem Vergleich der jeweiligen Polymerase-Kombinationen 3-29 mit 30-56 in Abbildung 10 ersichtlich ist. Der Ersatz eines porcinen (PolK 3-11) oder humanen PB1 (30-38) durch das aviäre PB1 (57-65) – bei gleichzeitigem Vorhandensein eines porcinen PB2 und unabhängig von der Herkunft des PA und NP – bleibt nahezu ohne Folgen für das Niveau der Polymeraseaktivität (Abbildung 10). Ein ebensolcher Austausch des porcinen oder humanen PB1- gegen das aviäre PB1-Segment mit gleichzeitiger Existenz eines aviären PB2 und unabhängig von der Herkunft des PA und NP erhöht leicht bis z.T. stark, jedoch in allen Fällen nicht signifikant die Polymeraseaktivität des entsprechenden Polymerasekomplexes um das etwa 5 – 80-fache auf bis zu etwa 260-fache Aktivität (PolK 21-29 bzw. 48-56 gegen 75-83; Tabelle 24, Abbildung 10). Wenn der Austausch des porcinen oder humanen PB1 gegen das aviäre PB1 vor dem Hintergrund eines humanen PB2 und unabhängig von der Herkunft des PA und NP stattfindet, erhöht sich die Polymeraseaktivität meist signifikant um den Faktor 5 bis 15 auf sehr hohe Polymeraseaktivitäts-Werte (Tabelle 24, Abbildung 10): Der Vergleich der Polymeraseaktivitäten der Polymerase-Kombinationen 12-15 und 18-20 mit 66-69 und 72-74 sowie der Kombinationen 39-42 und 45-47 mit 66-69 und 72-74 zeigt eine signifikante Steigerung auf bis zu etwa 1900-fache Aktivität. Die Polymerase-Kombinationen 70, 71 besitzen gegenüber 16, 17 bzw. 43, 44 eine um den Faktor 6 – 15 gesteigerte, bis zu etwa 650-fache Aktivität, wobei die Steigerung jedoch nicht signifikant ist (Tabelle 24, Abbildung 10). Insgesamt betrachtet erhöht ein aviäres PB1-Protein in den meisten Fällen die Polymeraseaktivität des betreffenden Polymerasekomplexes.

**Tabelle 24: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PB1-Proteins**

Die Tabelle zeigt die Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch eines einzelnen PB1-Proteins in einem ansonsten unveränderten Polymerasekomplex in absoluten Zahlen [x-fache Aktivität] und als Faktor der Veränderung.

Polym.-Kombination (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
21 / 75	poPB1	avPB1	11,3 ↗ 182,2	16,1	ns
22 / 76	poPB1	avPB1	3,3 ↗ 120,6	36,5	ns
23 / 77	poPB1	avPB1	10,3 ↗ 257,3	25,0	ns
24 / 78	poPB1	avPB1	2,2 ↗ 36,0	16,4	ns
25 / 79	poPB1	avPB1	1,5 ↗ 8,3	5,5	ns
26 / 80	poPB1	avPB1	1,7 ↗ 44,0	25,9	ns
27 / 81	poPB1	avPB1	13,9 ↗ 168,6	12,1	ns
28 / 82	poPB1	avPB1	4,1 ↗ 74,7	18,2	ns
29 / 83	poPB1	avPB1	13,0 ↗ 265,7	20,4	ns
48 / 75	huPB1	avPB1	18,0 ↗ 182,2	10,1	ns
49 / 76	huPB1	avPB1	1,5 ↗ 120,6	80,4	ns
50 / 77	huPB1	avPB1	7,5 ↗ 257,3	34,3	ns
51 / 78	huPB1	avPB1	1,7 ↗ 36,0	21,2	ns
52 / 79	huPB1	avPB1	1,2 ↗ 8,3	6,9	ns
53 / 80	huPB1	avPB1	2,2 ↗ 44,0	20,0	ns
54 / 81	huPB1	avPB1	2,9 ↗ 168,6	58,1	ns
55 / 82	huPB1	avPB1	2,5 ↗ 74,7	29,9	ns
56 / 83	huPB1	avPB1	5,2 ↗ 265,7	51,1	ns
12 / 66	poPB1	avPB1	263,6 ↗ 1563,4	5,9	***
13 / 67	poPB1	avPB1	274,7 ↗ 1228,2	4,5	***
14 / 68	poPB1	avPB1	187,4 ↗ 1088,7	5,8	***
15 / 69	poPB1	avPB1	92,8 ↗ 771,7	8,3	*
16 / 70	poPB1	avPB1	67,4 ↗ 595,5	8,8	ns
17 / 71	poPB1	avPB1	109,6 ↗ 647,1	5,9	ns
18 / 72	poPB1	avPB1	182,5 ↗ 1877,4	10,3	***
19 / 73	poPB1	avPB1	234,2 ↗ 1490,3	6,4	***
20 / 74	poPB1	avPB1	271,4 ↗ 1721,2	6,3	***
39 / 66	huPB1	avPB1	203,3 ↗ 1563,4	7,7	***
40 / 67	huPB1	avPB1	173,5 ↗ 1228,2	7,1	***
41 / 68	huPB1	avPB1	228,3 ↗ 1088,7	4,8	***
42 / 69	huPB1	avPB1	106,1 ↗ 771,7	7,3	*
43 / 70	huPB1	avPB1	38,4 ↗ 595,5	15,5	ns

Polym.-Kombination (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
44 / 71	huPB1	avPB1	97,3 ↗ 647,1	6,7	ns
45 / 72	huPB1	avPB1	173,7 ↗ 1877,4	10,8	***
46 / 73	huPB1	avPB1	148,7 ↗ 1490,3	10,0	***
47 / 74	huPB1	avPB1	169,1 ↗ 1721,2	10,2	***
a / b: Vergleich der Polymerase-Kombinationen a mit b; x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung der Polymeraseaktivität von x auf y; x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken der Polymeraseaktivität von x auf y; ns: nicht signifikant; *: signifikant, p≤0,05; **: signifikant, p≤0,01; ***: signifikant, p≤0,001					

#### 4.4.2 Austausch des PB2-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität

Wurde bei Vorhandensein eines porcinen oder humanen PB1-Segments in einem Polymerasekomplex das porcine PB2- (PolK 3-11 bzw. 30-38) gegen das aviäre PB2-Segment (21-29 bzw. 48-56) ausgetauscht, so blieb unabhängig von der Herkunft des PA und NP das Niveau der Polymeraseaktivität unverändert sehr niedrig (Abbildung 10). Der Austausch eines porcinen (PolK 57-65) gegen ein aviäres PB2 (75-83) hat dagegen bei aviärer Herkunft des PB1-Segments und unabhängig von der Herkunft des PA und NP eine nicht signifikante, leichte bis moderate Erhöhung der Polymeraseaktivität um den Faktor 5 bis 25 zur Folge (Abbildung 10, Tabelle 25). Ebenfalls eine nicht signifikante, moderate bis z.T. sehr starke Steigerung der Polymeraseaktivität um den Faktor 10 bis 150 ist bei Polymerasekomplexen mit porcinem oder humanem PB1 zu beobachten, bei denen das porcine (PolK 3-11 und 30-38) oder aviäre PB2 (21-29 und 48-56) gegen das humane PB2 (12-20 bzw. 39-47) ausgetauscht wird. Der Faktor der Steigerung ist unabhängig von der Herkunft des PA und NP (Abbildung 10, Tabelle 25), auch wenn die absoluten Werte der Polymeraseaktivität bei vorhandenem porcinen oder aviärem PA höher sind als bei humanem PA. Ein Austausch des porcinen oder aviären PB2- gegen das humane PB2-Segment führt bei vorhandenem aviären PB1 und unabhängig von der Herkunft des PA und NP zu einer leichten bis außerordentlich starken und häufig signifikanten Erhöhung der Polymeraseaktivität um den Faktor 5 bis 370 (Abbildung 10, Tabelle 25). Eine signifikante Erhöhung der Polymeraseaktivität ist beim Austausch des porcinen

(57-60 und 63-65) oder aviären PB2- (75-78 und 81-83) gegen das humane PB2-Segment (66-69 und 72-74) zu beobachten und erreicht Werte zwischen 1000-facher und beinahe 2000-facher Aktivität. Die Polymerase-Kombinationen 70 und 71 besitzen gegenüber 61, 62 bzw. 79, 80 eine um den Faktor 15 – 330 gesteigerte, bis zu etwa 650-fache Polymeraseaktivität, wobei jedoch die Steigerung nicht signifikant ist (Tabelle 25, Abbildung 10). Bei einem vorhandenen porcinen oder aviären PA-Segment werden nach porcino-humanem und aviär-humanem PB2-Austausch höhere absolute Polymeraseaktivitätswerte erreicht, auch wenn der Faktor der Steigerung gegenüber dem Vorhandensein des humanen PA-Segments vergleichbar ist. In der Gesamtbetrachtung der Folgen eines PB2-Austausches ist besonders auffällig, dass ein Austausch gegen das humane PB2-Protein in allen Fällen zu einer Steigerung der Polymeraseaktivität führt (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PB2-Proteins**

Die Tabelle zeigt die Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch eines einzelnen PB2-Proteins in einem ansonsten unveränderten Polymerasekomplex in absoluten Zahlen [x-fache Aktivität] und als Faktor der Veränderung.

Polym.-Kombination (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
3 / 12	poPB2	huPB2	3,3 ↗ 263,6	79,9	ns
4 / 13	poPB2	huPB2	4,6 ↗ 274,7	59,7	ns
5 / 14	poPB2	huPB2	7,5 ↗ 187,4	25,0	ns
6 / 15	poPB2	huPB2	1,2 ↗ 92,8	77,3	ns
7 / 16	poPB2	huPB2	1,1 ↗ 67,4	61,3	ns
8 / 17	poPB2	huPB2	1,6 ↗ 109,6	68,5	ns
9 / 18	poPB2	huPB2	4,9 ↗ 182,5	37,2	ns
10 / 19	poPB2	huPB2	2,2 ↗ 234,2	106,5	ns
11 / 20	poPB2	huPB2	9,3 ↗ 271,4	29,2	ns
21 / 12	avPB2	huPB2	11,3 ↗ 263,6	23,3	ns
22 / 13	avPB2	huPB2	3,3 ↗ 274,7	83,2	ns
23 / 14	avPB2	huPB2	10,3 ↗ 187,4	18,2	ns
24 / 15	avPB2	huPB2	2,2 ↗ 92,8	42,2	ns
25 / 16	avPB2	huPB2	1,5 ↗ 67,4	44,9	ns
26 / 17	avPB2	huPB2	1,7 ↗ 109,6	64,5	ns
27 / 18	avPB2	huPB2	13,9 ↗ 182,5	13,1	ns

Polym.- Kombi- nation (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Ver- änderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
28 / 19	avPB2	huPB2	4,1 ↗ 234,2	57,1	ns
29 / 20	avPB2	huPB2	13,0 ↗ 271,4	20,9	ns
30 / 39	poPB2	huPB2	1,6 ↗ 203,3	127,1	ns
31 / 40	poPB2	huPB2	1,1 ↗ 173,5	157,7	ns
32 / 41	poPB2	huPB2	1,7 ↗ 228,3	134,3	ns
33 / 42	poPB2	huPB2	2,1 ↗ 106,1	50,5	ns
34 / 43	poPB2	huPB2	1,2 ↗ 38,4	32,0	ns
35 / 44	poPB2	huPB2	1,3 ↗ 97,3	74,8	ns
36 / 45	poPB2	huPB2	2,3 ↗ 173,7	75,5	ns
37 / 46	poPB2	huPB2	2,1 ↗ 148,7	70,8	ns
38 / 47	poPB2	huPB2	2,4 ↗ 169,1	70,5	ns
48 / 39	avPB2	huPB2	18,0 ↗ 203,3	11,3	ns
49 / 40	avPB2	huPB2	1,5 ↗ 173,5	115,7	ns
50 / 41	avPB2	huPB2	7,5 ↗ 228,3	30,4	ns
51 / 42	avPB2	huPB2	1,7 ↗ 106,1	62,4	ns
52 / 43	avPB2	huPB2	1,2 ↗ 38,4	32,0	ns
53 / 44	avPB2	huPB2	2,2 ↗ 97,3	44,2	ns
54 / 45	avPB2	huPB2	2,9 ↗ 173,7	59,9	ns
55 / 46	avPB2	huPB2	2,5 ↗ 148,7	59,5	ns
56 / 47	avPB2	huPB2	5,2 ↗ 169,1	32,5	ns
57 / 66	poPB2	huPB2	22,8 ↗ 1563,4	68,6	***
58 / 67	poPB2	huPB2	4,7 ↗ 1228,2	261,3	***
59 / 68	poPB2	huPB2	29,3 ↗ 1088,7	37,2	***
60 / 69	poPB2	huPB2	2,3 ↗ 771,7	335,5	**
61 / 70	poPB2	huPB2	1,8 ↗ 595,5	330,8	ns
62 / 71	poPB2	huPB2	3,0 ↗ 647,1	215,7	ns
63 / 72	poPB2	huPB2	8,6 ↗ 1877,4	218,3	***
64 / 73	poPB2	huPB2	4,0 ↗ 1490,3	372,6	***
65 / 74	poPB2	huPB2	25,9 ↗ 1721,2	66,5	***
57 / 75	poPB2	avPB2	22,8 ↗ 182,2	8,0	ns
58 / 76	poPB2	avPB2	4,7 ↗ 120,6	25,7	ns
59 / 77	poPB2	avPB2	29,3 ↗ 257,3	8,8	ns
60 / 78	poPB2	avPB2	2,3 ↗ 36,0	15,7	ns
61 / 79	poPB2	avPB2	1,8 ↗ 8,3	4,6	ns
62 / 80	poPB2	avPB2	3,0 ↗ 44,0	14,7	ns
63 / 81	poPB2	avPB2	8,6 ↗ 168,6	19,6	ns
64 / 82	poPB2	avPB2	4,0 ↗ 74,7	18,7	ns

Polym.-Kombination (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘		Veränderung signifikant: ns - ***
				Faktor der Veränderung	
65 / 83	poPB2	avPB2	25,9 ↗ 265,7	10,3	ns
75 / 66	avPB2	huPB2	182,2 ↗ 1563,4	8,6	***
76 / 67	avPB2	huPB2	120,6 ↗ 1228,2	10,2	***
77 / 68	avPB2	huPB2	257,3 ↗ 1088,7	4,2	***
78 / 69	avPB2	huPB2	36,0 ↗ 771,7	21,4	**
79 / 70	avPB2	huPB2	8,3 ↗ 595,5	71,7	ns
80 / 71	avPB2	huPB2	44,0 ↗ 647,1	14,7	ns
81 / 72	avPB2	huPB2	168,6 ↗ 1877,4	11,1	***
82 / 73	avPB2	huPB2	74,7 ↗ 1490,3	20,0	***
83 / 74	avPB2	huPB2	265,7 ↗ 1721,2	6,5	***

a / b: Vergleich der Polymerase-Kombinationen a mit b;  
x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung der Polymeraseaktivität von x auf y;  
x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken der Polymeraseaktivität von x auf y;  
ns: nicht signifikant;  
\*: signifikant, p≤0,05; \*\*: signifikant, p≤0,01; \*\*\*: signifikant, p≤0,001

#### 4.4.3 Austausch des PA-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität

Der Austausch des humanen gegen das porcine oder aviäre PA-Segment führt in allen in Tabelle 26 betrachteten Fällen unabhängig von der Herkunft des PB1, PB2 und NP zu einer leichten bis moderaten und in einigen Fällen signifikanten Steigerung der Polymeraseaktivität (Tabelle 26, Abbildung 10). Eine nicht signifikante Erhöhung ist beim Vergleich der Polymerase-Kombinationen 15-17 mit 12-14 bzw. 18-20; 42-44 mit 39-41 bzw. 45-47; 78-80 mit 75-77 bzw. 81-83 sowie 70-71 mit 67-68 erkennbar. Der Faktor der Steigerung der Polymeraseaktivität liegt dabei mit einer Ausnahme im meist niedrigen, einstelligen Bereich (Tabelle 26). Eine leichte und signifikante Steigerung etwa um den Faktor zwei bis drei ist bei dem Austausch des PA-Segments zwischen den Kombinationen 69 und 66 sowie 69-71 und 72-74 zu beobachten (Tabelle 26). Die Werte der Polymeraseaktivität, die bei diesem Austausch erreicht werden, sind mit bis zu etwa 1900-facher Aktivität jedoch außerordentlich hoch. Ein Austausch des porcinen gegen das aviäre PA-Segment bleibt unabhängig von der Herkunft des PB1-, PB2- und NP-Segments ohne Folgen für das Niveau der Polymeraseaktivität. Die übrigen, an dieser Stelle nicht miteinander verglichenen Polymerase-Kombinationen mit

PA-Segment-Austauschen werden nicht näher betrachtet, da die Polymeraseaktivität im Vergleich zur PK sehr niedrig ist. Insgesamt gesehen verändert ein Austausch des PA-Proteins die Polymeraseaktivität des betreffenden Polymerasekomplexes meist nur gering (Tabelle 26) und deutlich weniger, als es Austausche im PB1- oder PB2-Protein vermögen.

#### 4.4.4 Austausch des NP-Proteins und Einfluss auf die Polymeraseaktivität

Bei einem definierten, unveränderten Polymerasekomplex aus PB1-, PB2- und PA-Protein bewirkt ein Austausch im NP-Segment keine signifikante Veränderung der Polymeraseaktivität (Abbildung 10). Lediglich beim Vergleich der Polymerase-Kombinationen 43 mit 42, 44 sowie 79 mit 78, 80 sowie 82 mit 81, 83 und wenigen weiteren kann zum Teil eine leichte Steigerung der Aktivität beim Austausch des humanen NP- gegen das porcine oder aviäre NP-Segment vermutet werden (Abbildung 10).

**Tabelle 26: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PA-Proteins**

Die Tabelle zeigt die Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch eines einzelnen PA-Proteins in einem ansonsten unveränderten Polymerasekomplex in absoluten Zahlen [x-fache Aktivität] und als Faktor der Veränderung.

Polym.-Kombination (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
15 / 12	huPA	poPA	92,8 ↗ 263,6	2,8	ns
16 / 13	huPA	poPA	67,4 ↗ 274,7	4,1	ns
17 / 14	huPA	poPA	109,6 ↗ 187,4	1,7	ns
15 / 18	huPA	avPA	92,8 ↗ 182,5	2,0	ns
16 / 19	huPA	avPA	67,4 ↗ 234,2	3,5	ns
17 / 20	huPA	avPA	109,6 ↗ 271,4	2,5	ns
42 / 39	huPA	poPA	106,1 ↗ 203,3	1,9	ns
43 / 40	huPA	poPA	38,4 ↗ 173,5	4,5	ns
44 / 41	huPA	poPA	97,3 ↗ 228,3	2,3	ns
42 / 45	huPA	avPA	106,1 ↗ 173,7	1,6	ns
43 / 46	huPA	avPA	38,4 ↗ 148,7	3,9	ns
44 / 47	huPA	avPA	97,3 ↗ 169,1	1,7	ns
69 / 66	huPA	poPA	771,7 ↗ 1563,4	2,0	***

Polym.- Kombi- nation (PolK) Nr.	Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der Polymeraseaktivität		Ver- änderung signifikant: ns - ***
			Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
70 / 67	huPA	poPA	595,5 ↗ 1228,2	2,1	ns
71 / 68	huPA	poPA	647,1 ↗ 1088,7	1,7	ns
69 / 72	huPA	avPA	771,7 ↗ 1877,4	2,4	***
70 / 73	huPA	avPA	595,5 ↗ 1490,3	2,5	***
71 / 74	huPA	avPA	647,1 ↗ 1721,2	2,7	***
78 / 75	huPA	poPA	36,0 ↗ 182,2	5,1	ns
79 / 76	huPA	poPA	8,3 ↗ 120,6	14,5	ns
80 / 77	huPA	poPA	44,0 ↗ 257,3	5,8	ns
78 / 81	huPA	avPA	36,0 ↗ 168,6	4,7	ns
79 / 82	huPA	avPA	8,3 ↗ 74,7	9,0	ns
80 / 83	huPA	avPA	44,0 ↗ 265,7	6,0	ns

a / b: Vergleich der Polymerase-Kombinationen a mit b;  
x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung der Polymeraseaktivität von x auf y;  
x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken der Polymeraseaktivität von x auf y;  
ns: nicht signifikant;  
\*: signifikant, p≤0,05; \*\*: signifikant, p≤0,01; \*\*\*: signifikant, p≤0,001

#### 4.4.5 Vergleich der Polymeraseaktivität von generierten Viren

Im Folgenden soll detailliert die Aktivität nur derjenigen Polymerasekomplexe betrachtet werden, die in den in dieser Arbeit generierten Viren (s. Kap. 4.3) vorkommen. Dies soll mögliche Unterschiede in der Polymeraseaktivität zwischen einzelnen Viren herausstellen und helfen, Änderungen der Polymeraseaktivität mit Änderungen anderer viraler Eigenschaften, die in den nächsten Kapiteln betrachtet werden, in Verbindung zu bringen.

Einige der Viren (s. Kap. 4.3), deren Unterschiede in Tabelle 27 aufgeführt sind, differieren lediglich in den Oberflächenproteinen HA und NA und besitzen einen identischen Polymerasekomplex (K und E; B und A; E und I; A und C; K und I; B und C). Somit ist die im Minigenom-Luciferase-Reporterassay (s. Kap. 3.21) gemessene Polymeraseaktivität für den jeweilig definierten Polymerasekomplex allen entsprechenden Viren zuzuordnen (Tabelle 23, Tabelle 27). Unter den untersuchten Viren finden sich auch mehrere, die sich nur im PB1-Segment (C-D; I-F-R) oder nur im PB1- und einem weiteren Segment (A-D; C-P; C-S; E-F; E-R) unterscheiden (Tabelle 27). Kommt es bei den genannten Viren zu einem Austausch eines humanen oder porcinen PB1-

gegen ein aviäres PB1-Segment, so erhöht sich die Polymeraseaktivität um das etwa 2- bis 470-fache. Diese Steigerung der Aktivität ist nur in einem Fall signifikant (C-P) (Tabelle 27). Viele der generierten Viren unterscheiden sich im PB2- (H-S-O; D-P) und zum Teil zusätzlich im PA- (D-T; D-O; S-T; S-P; D-H; H-T; H-P) oder PB1-Segment (C-P) (Tabelle 27). Dabei beträgt die Steigerung der Polymeraseaktivität, die bei einem Austausch des porcinen oder aviären PB2 gegen das humane PB2 zu beobachten ist, zwischen dem 5- bis 470-fachen und ist in nahezu allen Fällen (außer H-T) signifikant (Tabelle 27). Der Austausch des aviären gegen das porcine PB2 (H-S; H-D) führt hingegen zu einer Verringerung der Polymeraseaktivität (Tabelle 27), die jedoch nicht signifikant ist. Bezüglich des PA-Segments ergibt sich bei der Betrachtung der Viren, bei denen das aviäre oder porcine PA allein (O-T; P-T) oder zusammen mit anderen Polymerasesegmenten (D-T; S-T; H-T) gegen das humane PA ausgetauscht wird, ein widersprüchliches Bild. Bei einem Einzelaustausch (O-T; P-T) erfolgt eine signifikante Senkung der Polymeraseaktivität. Wird zusätzlich das porcine oder aviäre PB2- gegen das humane PB2-Segment ausgetauscht (D-T; S-T; H-T), erfolgt eine teils signifikante Erhöhung der Aktivität (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Vergleich der Polymeraseaktivität von generierten Viren**

Die Tabelle vergleicht die Polymeraseaktivität zweier generierter Viren, die sich in einem oder zwei viralen Proteinen unterscheiden. Die Veränderung der Polymeraseaktivität ist in absoluten Zahlen [x-fache Aktivität] und als Faktor der Veränderung angegeben.

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segment-austausch ... gegen ...		2. Segment-austausch ... gegen ...	Polym.-komplex-Nr.	Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
					Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
<b>K</b> / E	huHA	poHA	-	beide: 43	-	-	-
<b>B</b> / A	poHA	avHA	-	beide: 3	-	-	-
E / I	huNA	poNA	-	beide: 43	-	-	-
A / C	poNA	avNA	-	beide: 3	-	-	-
I-F-R:							
I / F	huPB1	poPB1	-	43 / 16	38,4 ↗ 67,4	1,8	ns
I / R	huPB1	avPB1	-	43 / 70	38,4 ↗ 595,5	15,5	ns
F / R	poPB1	avPB1	-	16 / 70	67,4 ↗ 595,5	8,8	ns
C / D	poPB1	avPB1	-	3 / 57	3,3 ↗ 22,8	6,9	ns

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segmentaustausch ... gegen ...		2. Segmentaustausch ... gegen ...		Polym.-komplex-Nr.	Veränderung der Polymeraseaktivität		Veränderung signifikant: ns - ***
	Werte [x-fache Aktivität] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung						
H-S-O:								
H / S	avPB2	poPB2	-		81 / 63	168,6 ↘ 8,6	19,6	ns
H / O	avPB2	huPB2	-		81 / 72	168,6 ↗ 1877,4	11,1	***
S / O	poPB2	huPB2	-		63 / 72	8,6 ↗ 1877,4	218,3	***
D / P	poPB2	huPB2	-		57 / 66	22,8 ↗ 1563,4	68,6	***
O-P-T:								
O / P	avPA	poPA	-		72 / 66	1877,4 ↘ 1563,4	1,2	ns
O / T	avPA	huPA	-		72 / 69	1877,4 ↘ 771,7	2,4	***
P / T	poPA	huPA	-		66 / 69	1563,4 ↘ 771,7	2,0	***
D / S	poPA	avPA	-		57 / 63	22,8 ↘ 8,6	2,7	ns
<b>K</b> / I	huHA	poHA	huNA	poNA	beide: 43	-		-
<b>B</b> / C	poHA	avHA	poNA	avNA	beide: 3	-		-
E / F	huPB1	poPB1	huNA	poNA	43 / 16	38,4 ↗ 67,4	1,8	ns
E / R	huPB1	avPB1	huNA	poNA	43 / 70	38,4 ↗ 595,5	15,5	ns
A / D	poPB1	avPB1	poNA	avNA	3 / 57	3,3 ↗ 22,8	6,9	ns
C / P	poPB1	avPB1	poPB2	huPB2	3 / 66	3,3 ↗ 1563,4	473,8	***
C / S	poPB1	avPB1	poPA	avPA	3 / 63	3,3 ↗ 8,6	2,6	ns
D / T	poPB2	huPB2	poPA	huPA	57 / 69	22,8 ↗ 771,7	33,8	**
D / O	poPB2	huPB2	poPA	avPA	57 / 72	22,8 ↗ 1877,4	82,3	***
S / T	poPB2	huPB2	avPA	huPA	63 / 69	8,6 ↗ 771,7	89,7	**
S / P	poPB2	huPB2	avPA	poPA	63 / 66	8,6 ↗ 1563,4	181,8	***
D / H	poPB2	avPB2	poPA	avPA	57 / 81	22,8 ↗ 168,6	7,4	ns
H / T	avPB2	huPB2	avPA	huPA	81 / 69	168,6 ↗ 771,7	4,6	ns
H / P	avPB2	huPB2	avPA	poPA	81 / 66	168,6 ↗ 1563,4	9,3	***
C / H	poPB1	avPB1	poPA	avPA	3 / 81	3,3 ↗ 168,6	51,1	ns
	poPB2	avPB2	-					

a / b: Vergleich der Polymerase-Kombinationen a mit b;  
**K, B, L**: humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus;  
x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung der Polymeraseaktivität von x auf y;  
x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken der Polymeraseaktivität von x auf y;  
ns: nicht signifikant;  
\*: signifikant, p≤0,05; \*\*: signifikant, p≤0,01; \*\*\*: signifikant, p≤0,001

## **4.5 Vermehrungseigenschaften von humanen, porcinen und aviären Parentalviren und deren Reassortanten in humanen A549-Lungenzellen**

In den Replikationsversuchen der vorliegenden Arbeit wurden die drei rekombinant hergestellten humanen (Virus K), porcinen (Virus B) und aviären Parentalviren (Virus L) sowie zwölf Reassortanten hinsichtlich ihrer Vermehrungseigenschaften in einem Zellkultursystem analysiert (s. Kap. 3.22.1). Acht Reassortanten besaßen porcine NP-, M- und NS-Segmente, aviäre HA- und zum Teil auch NA-Segmente sowie Polymerasesegmente porcinen, aviären und humanen Ursprungs (A, C, D, S, H, O, P, T) (Tabelle 22). Die übrigen vier untersuchten Reassortanten wiesen humane NP-, M- und NS-Segmente, porcine HA- und größtenteils auch NA-Segmente und humane, porcine und aviäre Polymerasesegmente auf (E, I, R, F) (Tabelle 22).

### **4.5.1 Replikationsverhalten der Viren**

Sowohl die drei Parentalviren als auch die untersuchten zwölf Reassortanten zeigten im Zellkultursystem die Fähigkeit zur Replikation, wobei z.T. deutliche Unterschiede auftraten. Aufgrund der Replikationsrate und des erreichten Virustiters zu einem definierten Zeitpunkt nach der Infektion (p.i.) der Zellen können die untersuchten Viren einer von vier Gruppen zugeordnet werden:

Bei den drei Parentalviren K, B und L wurde eine starke anfängliche Replikation mit einem Titeranstieg von drei bis vier log-Stufen zwischen 12 h und 36 h p.i. beobachtet. Zwischen 36 h und 48 h p.i. ist bei diesen Viren ein Absinken der Replikationsrate festzustellen, gefolgt von einem konstanten (B) oder leicht abfallenden (K, L) Titer zwischen 48 h und 72 h p.i. Die maximalen Titer der Parentalviren liegen zwischen  $10^{6,6}$  und  $10^{7,7}$  pfu/ml (Tabelle 28, Abbildung 11).

Die Reassortanten A, C, D, S und H zeigen mit einer Erhöhung des Titers von mehr als vier log-Stufen zwischen 12 h und 36 h p.i. eine sehr starke anfängliche Replikation. Im weiteren Verlauf kommt es auch bei diesen Viren zwischen 36 h und 48 h p.i. zu einer Abschwächung der Virusvermehrung. Nach 48 h p.i. fällt der Titer leicht ab (A, C, S, H) oder bleibt weitgehend

konstant (D). Insgesamt werden in dieser Gruppe hohe Virustiter zwischen maximal  $10^{7,3}$  und  $10^{8,5}$  pfu/ml erreicht (Tabelle 28, Abbildung 11).

Die Viren P und O weisen ähnlich wie die Parentalvirusgruppe zwar eine anfänglich starke Replikation mit einer Titersteigerung um etwa 2 log-Stufen zwischen 12 h und 24 h p.i. auf, jedoch folgt zwischen 24 h und 36 h p.i. eine sehr deutliche Abschwächung der Replikationsrate. Bereits nach 36 h p.i. kommt es bei beiden Viren zu einem konstanten Abfall des Titers. Aufgrund dieses Replikationsverhaltens werden insgesamt nur niedrige Titer zwischen maximal  $10^{5,2}$  und  $10^{5,5}$  pfu/ml erreicht (Tabelle 28, Abbildung 11).

Eine bereits von Beginn an niedrige Replikationsrate mit einem Titerzuwachs von etwa 1,5 bis 2 log-Stufen zwischen 12 h und 36 h p.i. ist bei den Reassortanten E, R, I, F und T zu beobachten. Diese bereits geringe Replikationsrate schwächt sich zwischen 36 h und 48 h p.i. weiter ab und nach 48 h p.i. ist ein Titerabfall festzustellen. Die Reassortanten dieser Gruppe erreichen insgesamt nur niedrige Titer bis maximal  $10^5$  pfu/ml (Tabelle 28, Abbildung 11).

**Tabelle 28: Titer zu definierten Zeitpunkten nach Infektion**

Virus (Virus-ID)	Titer 12 h p.i. [ $\log_{10}$ Titer]	Titer 24 h p.i. [ $\log_{10}$ Titer]	Titer 36 h p.i. [ $\log_{10}$ Titer]	Titer 48 h p.i. [ $\log_{10}$ Titer]	Titer 72 h p.i. [ $\log_{10}$ Titer]
K	2,3	4,4	6,0	6,7	6,3
B	3,1	4,9	6,7	7,7	7,7
L	2,7	4,6	6,1	6,6	6,3
A	3,0	5,5	7,9	8,5	8,4
C	2,8	5,5	7,6	8,4	8,2
D	1,9	4,4	7,1	7,9	8,0
S	2,3	4,7	6,8	7,3	7,1
H	2,6	5,6	7,1	7,3	7,1
O	2,5	4,7	5,2	4,9	4,4
P	3,3	5,1	5,5	5,1	4,7
T	2,1	2,6	4,1	4,3	3,9
E	2,7	4,0	4,8	5,0	4,9
I	2,9	3,6	4,3	4,5	4,2
R	2,8	3,9	4,7	5,0	4,6
F	2,6	3,5	4,2	4,6	4,3

## Virusreplikation in A549-Zellen

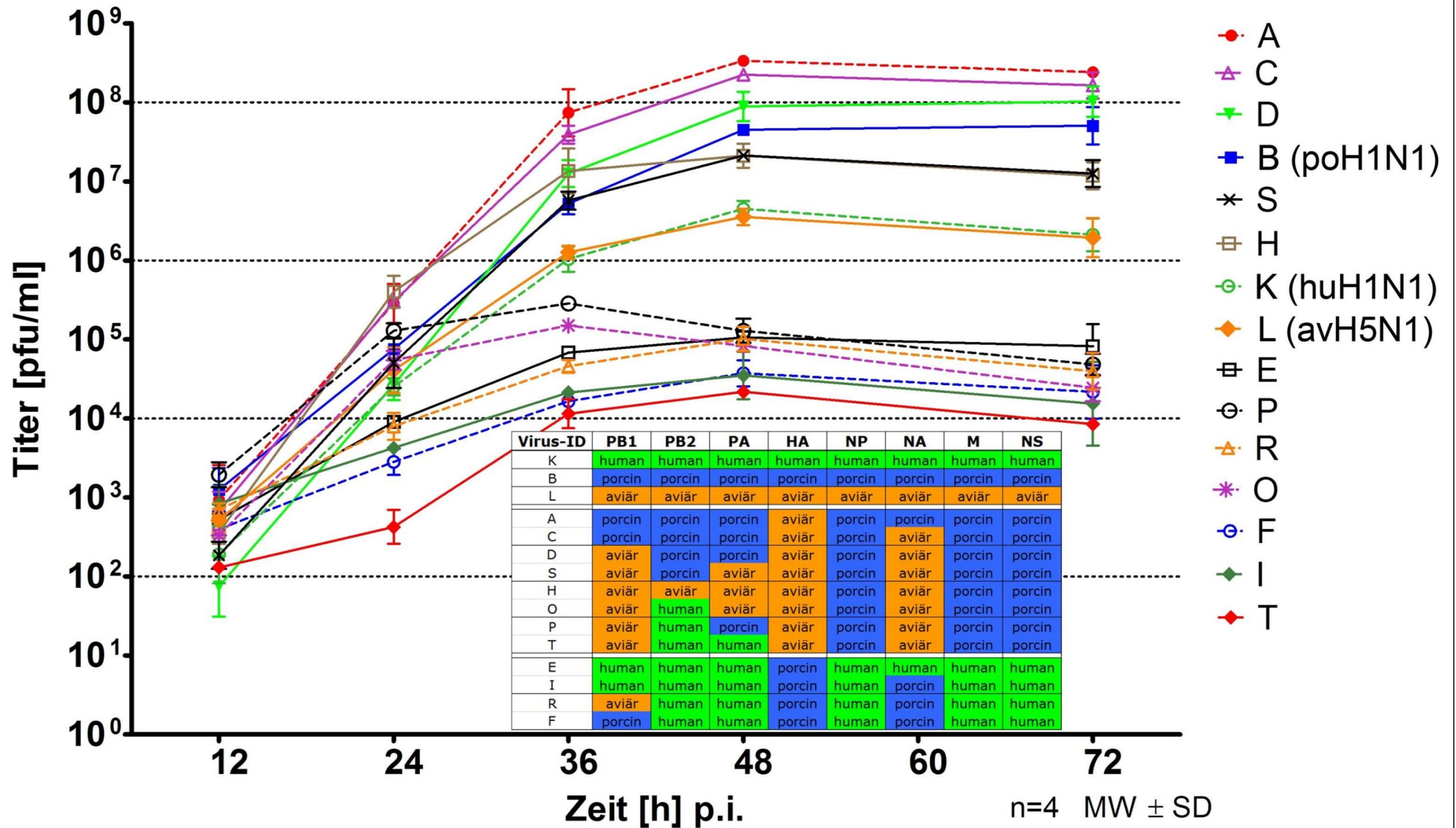
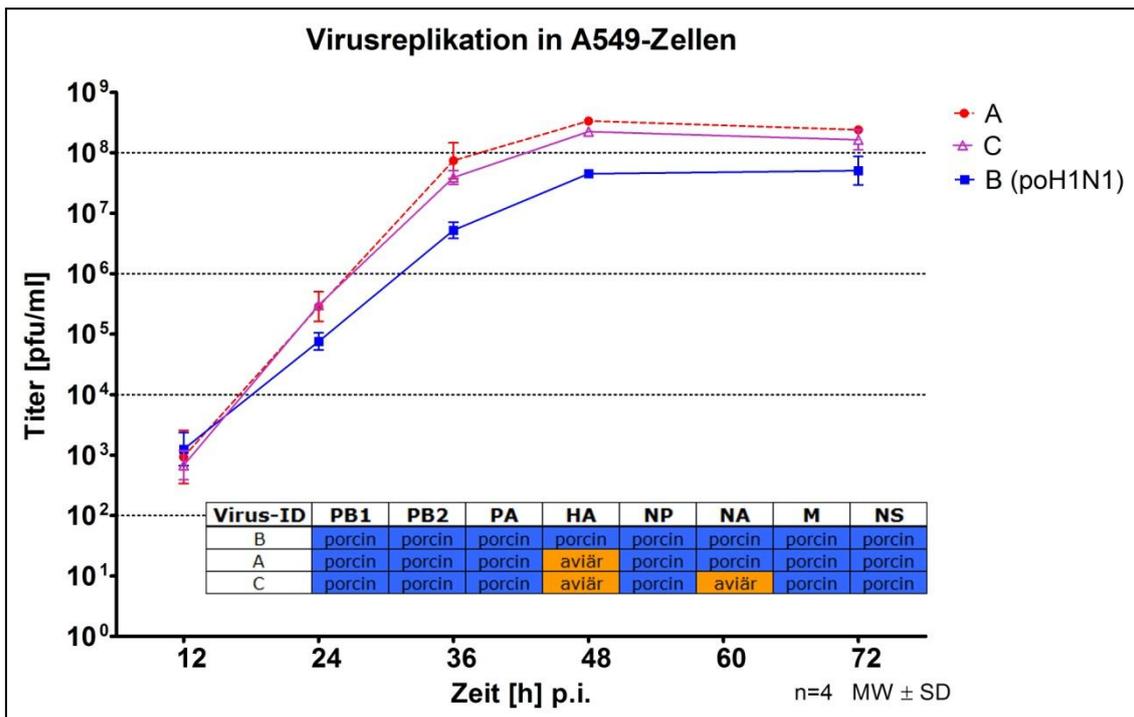


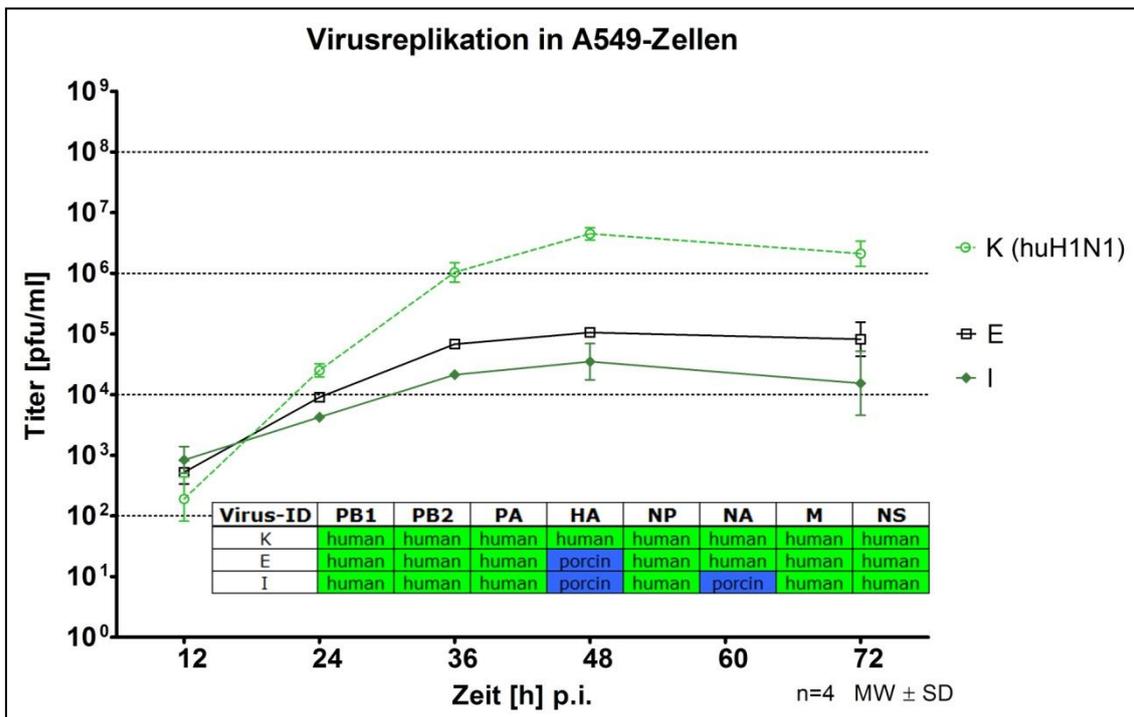
Abbildung 11: Verlauf der Replikation der Parentalviren (K, B, L) und Reassortanten

In den folgenden Abbildungen und Beschreibungen werden Viren, die sich in einem, zwei oder im Einzelfall auch drei Segmenten voneinander unterscheiden, detailliert betrachtet und verglichen. Hierbei liegt der Focus zunächst auf Viren mit porcinem NP-, M- und NS-Segment sowie Polymerasekomplex bzw. humanem NP-, M- und NS-Segment und Polymerasekomplex und jeweils verschiedenen HA- und NA-Oberflächenproteinen. In weiteren Vergleichen wird der Verlauf der Replikation von Viren mit porcinem NP-, M- und NS-Segment, aviären HA- und NA-Proteinen und unterschiedlichen Polymerasekomplexen analysiert. Auch auf die Replikation der Viren mit humanem NP, M und NS, porcinen HA- und NA-Proteinen und verschiedenen Polymerasekomplexen wird eingegangen.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Replikation der Viren A, C, und B, die porcine NP-, M- und NS-Segmente und einen porcinen Polymerasekomplex, jedoch verschiedene HA- und NA-Segmente besitzen (Tabelle 22, Tabelle 28, Tabelle 29). Diese drei Viren weisen 12 h p.i. annähernd den gleichen Titer auf. Die Viren A und C zeigen zwischen 12 h und 36 h p.i. eine sehr starke Replikation, die sich nachfolgend bis 48 h p.i. etwas abschwächt (Tabelle 28, Abbildung 12). Die geringere Replikationsrate des porcinen Parentalvirus B zwischen 12 h und 36 h p.i. führt bereits ab 24 h p.i. zu signifikant niedrigeren Titern gegenüber den Reassortanten A und C (Tabelle 29). Auch die Virusvermehrung von Virus B schwächt sich zwischen 36 h und 48 h p.i. etwas ab. Ein signifikanter Titerunterschied von Virus B gegenüber A und C bleibt bis zum Ende des Replikationsversuches nach 72 h p.i. erhalten (Tabelle 29). Die höchsten Titer von Virus A und C werden mit etwa  $10^{8,5}$  pfu/ml nach 48 h p.i., die von Parentalvirus B mit  $10^{7,7}$  pfu/ml nach 48 h/ 72 h p.i. erreicht (Tabelle 28). Die Reassortanten A und C ähneln sich trotz verschiedener NA-Proteine in ihrem Replikationsverhalten sehr stark: Das gleiche Niveau der anfänglichen Replikation bis 36 h p.i., die darauffolgende leichte Abschwächung der Replikationsrate und das leichte Absinken des Titers zwischen 48 h und 72 h p.i. bei beiden Viren führt dazu, dass während des Replikationsversuchs keine signifikanten Titerunterschiede festgestellt wurden (Tabelle 29, Abbildung 12).



**Abbildung 12: Einfluss der Oberflächenproteine HA und NA auf das Replikationsverhalten**



**Abbildung 13: Einfluss der Oberflächenproteine HA und NA auf das Replikationsverhalten**

In Abbildung 13 ist der Replikationsverlauf aller Viren abgebildet, die ein humanes NP-, M- und NS-Segment, einen vollständigen humanen Polymerasekomplex und unterschiedliche HA- und NA-Segmente besitzen. Das humane Parentalvirus (K) und die Reassortante E unterscheiden sich im HA-Segment (Tabelle 22). Die Titer beider Viren weisen 12 h p.i. einen leichten, jedoch nicht signifikanten Unterschied auf (Tabelle 29, Abbildung 13). Im weiteren Verlauf bis 36 h p.i. zeigt das Parentalvirus K eine starke, die Reassortante E aber nur eine schwache Replikation (Tabelle 28). Da zudem der Virustiter von E ab 36 h p.i. nahezu konstant bleibt, der Titer von Virus K hingegen bis 48 h p.i. steigt und erst danach leicht abfällt, führt dies ab 36 h p.i. zu signifikant höheren Virustitern von Virus K gegenüber E von etwa ein bis anderthalb log-Stufen (Tabelle 29, Abbildung 13). Bei einem Vergleich der Viren K und I, die sich in den Oberflächenproteinen HA und NA unterscheiden (Tabelle 22), ist 12 h p.i. ein signifikant niedrigerer Titer von K gegenüber I feststellbar (Tabelle 29). Aufgrund der starken Replikation von Virus K bis 36 h p.i., die sich bis 48 h p.i. etwas abschwächt, und der durchgehend schwachen Replikation von Virus I zwischen 12 h und 48 h p.i. weist das humane Parentalvirus K bereits ab 24 h p.i. einen signifikant höheren Titer (ein bis zwei log-Stufen) als Virus I auf (Tabelle 29, Abbildung 13). Die beiden Viren E und I, die sich im NA-Segment unterscheiden (Tabelle 22), haben 12 h p.i. annähernd den gleichen Titer (Tabelle 29). Sie zeigen eine nur schwache Replikation bis zu ihrem höchsten Titer 48 h p.i. Da Virus E eine leicht stärkere Replikation als I zwischen 12 h und 36 h p.i. aufweist und I einen größeren Titerabfall zwischen 48 h und 72 h p.i. als E zeigt, sind die Virustiter bei 36 h p.i. und 72 h p.i. signifikant leicht unterschiedlich (Tabelle 29, Abbildung 13).

Die beiden Reassortanten A und D weisen porcine NP-, M- und NS-Segmente und ein aviäres HA auf, unterscheiden sich jedoch sowohl im NA- als auch PB1-Segment (Tabelle 22). Der Verlauf der Replikation ist sehr ähnlich: Beide Viren zeigen zwischen 12 h und 36 h p.i. eine sehr starke Replikation, die sich zwischen 36 h und 48 h p.i. in ähnlichem Maße abschwächt (Tabelle 28, Tabelle 29, Abbildung 11). Da sich 12 h p.i. die Titer beider Viren signifikant unterscheiden, bleibt dieser Unterschied aufgrund des ähnlichen Replikationsverlaufs bis 48 h p.i. erhalten (Tabelle 29). Durch den geringen Titerabfall bei Reassortante A und den geringen Titeranstieg von D nähern sich die Titer 72 h p.i. an und unterscheiden sich nicht mehr signifikant

voneinander (Tabelle 29, Abbildung 11). Der maximale Titer wird mit  $10^{8,5}$  pfu/ml (Virus A) 48 h p.i. bzw.  $10^{8,0}$  pfu/ml (Virus D) 72 h p.i. erreicht (Tabelle 28).

Die Replikation der Viren C, D, S, H, P, O und T, die porcine NP-, M- und NS-Segmente, aviäre HA- und auch NA-Segmente und unterschiedlichste Polymerasekomplexe besitzen, ist in Abbildung 14 gezeigt. Die Reassortanten O, P und T unterscheiden sich ausschließlich in ihrem PA-Segment (Tabelle 22). Die Viren P und O zeigen einen sehr gleichartigen Titerverlauf mit einer anfänglich starken Replikation, die sich ab 24 h p.i. deutlich abschwächt und zu einem niedrigen Maximaltiter von etwa  $10^{5,5}$  pfu/ml führt (Tabelle 28, Abbildung 14). Der Titer der beiden Viren unterscheidet sich 12 h p.i. noch signifikant, dieser Unterschied ist zu späteren Zeitpunkten jedoch kleiner und nicht mehr signifikant (Tabelle 29). Die Reassortante T weist im Vergleich zu Virus O und P ein humanes PA-Segment auf. Der Titerunterschied 12 h p.i. zwischen den Reassortanten P und T ist größer als eine log-Stufe und signifikant, zwischen O und T ist er nicht signifikant (Tabelle 29). Durch die starke Replikation von Virus P und O sowie der schwachen Vermehrung von Reassortante T unterscheiden sich die Titer von P und O gegenüber T nach 24 h p.i. signifikant um mehr als zwei log-Stufen. Aufgrund der deutlichen Abschwächung der Replikation von P und O nach 24 h p.i. wird dieser Titerunterschied geringer, bleibt jedoch bis 48 h (O-T) oder gar 72 h p.i. (P-T) signifikant (Tabelle 29).

Der genetische Unterschied der Viren S, H und O liegt in der Herkunft des PB2-Segments (Tabelle 22). 12 h p.i. zeigen alle drei Reassortanten annähernd den gleichen Titer (Tabelle 28, Abbildung 14). Virus S und O weisen zwischen 12 h und 24 h p.i. annähernd die gleiche, starke Replikationsrate auf, so dass nach 24 h p.i. ein identischer Virustiter nachweisbar war. Virus H repliziert im gleichen Zeitraum S und O gegenüber noch stärker und hat somit 24 h p.i. einen signifikant höheren Titer (eine log-Stufe) als S und O (Tabelle 29, Abbildung 14). Während es bei Virus O, das ein humanes PB2 trägt, zu einer deutlichen Abschwächung der Replikation nach 24 h p.i. kommt und der Titer bis 36 h p.i. nur wenig steigt, haben S und H eine weiterhin sehr hohe Replikationsrate. Im Ergebnis sind die Titer von S und H nach 36 h p.i. vergleichbar hoch und der Virustiter von S und H gegenüber Virus O um

eineinhalb bis zwei log-Stufen signifikant erhöht (Tabelle 29, Abbildung 14). Die Titer von Reassortante H und S erhöhen sich im weiteren Verlauf der Kinetik bis 48 h p.i. noch weiter, um dann bis 72 h p.i. wieder etwas zu fallen. Der Virustiter von O sinkt hingegen bereits nach 36 h p.i. kontinuierlich ab (Tabelle 28). Dadurch besteht am Endpunkt der Kinetik nach 72 h p.i. ein signifikanter Titerunterschied zwischen H und S gegenüber O von etwa 2,5 log-Stufen (Tabelle 29, Abbildung 14).

Die Reassortanten C, D, S und H variieren ausschließlich hinsichtlich der Zusammensetzung ihres Polymerasekomplexes (Tabelle 22). Virus C, das sich im PB1-Segment von Reassortante D unterscheidet, weist 12 h p.i. einen signifikant höheren Titer als D auf (Tabelle 29). Beide Reassortanten gehören zu der Gruppe von Viren, die zwischen 12 h und 36 h p.i. eine sehr hohe Replikationsrate aufweisen, wobei die Vermehrungsrate von D noch etwas höher als von C ist (Tabelle 28, Abbildung 14). Aus diesem Grund sind die Virustiter ab 36 h p.i. nicht mehr signifikant unterschiedlich (Tabelle 29). Zwischen 48 h und 72 h p.i. bleiben die Titer von Virus C und D nahezu konstant und erreichen ihren maximalen Titer mit etwa  $10^8$  bis  $10^{8,5}$  pfu/ml (Tabelle 28, Abbildung 14).

Die Reassortanten C und S, die verschiedene PB1- und PA-Segmente besitzen, zeigen 12 h p.i. einen signifikanten Titerunterschied von einer halben log-Stufe (Tabelle 22, Tabelle 29). Beide Viren weisen von 12 h bis 36 h p.i. eine sehr starke Replikation auf, die sich im Zeitraum 36 h bis 48 h p.i. abschwächt (Tabelle 28, Abbildung 14). Der Titer fällt anschließend bis 72 h p.i. nur wenig ab. Über alle Zeitpunkte hinweg zeigt die Reassortante C einen signifikant höheren Titer als S, wobei der Titerunterschied im Verlauf der Replikation leicht auf eine log-Stufe zunimmt (Tabelle 29, Abbildung 14). Der maximale Titer wird mit  $10^{8,4}$  pfu/ml (Virus C) bzw.  $10^{7,3}$  pfu/ml (Virus S) 48 h p.i. erreicht (Tabelle 28).

Die Reassortanten C und H unterscheiden sich in der Herkunft aller drei Polymerasekomplexsegmente PB1, PB2 und PA (Tabelle 22). 12 h p.i. besitzen die Viren nahezu den gleichen Titer (Tabelle 28, Abbildung 14). Da beide eine sehr starke Replikation zwischen 12 h und 36 h p.i. zeigen, danach der Titer von H im Vergleich zu C jedoch bis 48 h p.i. kaum noch ansteigt,

unterscheiden sich die Titer erst ab 48 h p.i. signifikant um etwa eine log-Stufe (Tabelle 29, Abbildung 14). Virus C weist 48 h p.i. einen Titer von  $10^{8,4}$  pfu/ml, Virus H einen Titer von  $10^{7,3}$  pfu/ml auf (Tabelle 28). Bis 72 h p.i. sinkt der Titer beider Viren nur geringfügig ab.

Die Viren S und H weisen verschiedene PB2-Segmente auf (Tabelle 22). Obwohl sie annähernd den gleichen Titer 12 h p.i. besitzen und bei beiden ein sehr starker Titeranstieg zwischen 12 h und 36 h p.i. zu verzeichnen ist, gibt es bei 24 h p.i. einen signifikanten Unterschied zwischen S und H, da der Titer von Virus H zwischen 12 h und 24 h p.i. besonders stark zunimmt (Tabelle 28, Tabelle 29, Abbildung 14). Nachdem beide Viren eine langsamere Replikation zwischen 36 h und 48 h p.i. zeigen, nähern sich die Virustiter wieder an und sind 48 h p.i. ( $10^{7,3}$  pfu/ml) und 72 h p.i. ( $10^{7,1}$  pfu/ml) identisch (Tabelle 28, Abbildung 14).

Der genetische Unterschied der Reassortanten D und S liegt im PA-Segment (Tabelle 22). Beide Viren zeigen 12 h p.i. einen ähnlich hohen Titer und weisen bis 36 h p.i. eine sehr hohe Replikationsrate auf, wobei der Titerzuwachs von Virus D etwas höher als der von Virus S ist (Tabelle 28, Abbildung 14). Im weiteren Verlauf bis 48 h p.i. ist ein abgeschwächter Titeranstieg festzustellen und 48 h p.i. ein geringer, aber signifikanter Titerunterschied (Tabelle 29, Abbildung 14). Dieser Unterschied vergrößert sich bis 72 h p.i. auf ca. 1 log-Stufe. Den maximalen Titer erreicht Virus D 72 h p.i. ( $10^{8,0}$  pfu/ml) und Virus S 48 h p.i. ( $10^{7,3}$  pfu/ml) (Tabelle 28, Abbildung 14).

Die rekombinanten Viren D, H und T besitzen ein identisches PB1, variieren jedoch in der Herkunft der PB2- und PA-Segmente. Die Reassortanten D und H unterscheiden sich durch porcine bzw. aviäre PB2- und PA-Segmente (Tabelle 22). Zu Beginn des Replikationsverlaufs 12 h und 24 h p.i. weist Virus H einen signifikant leicht höheren Titer im Vergleich zu D auf (Tabelle 29). Beide Viren zeigen im Zeitraum bis 36 h p.i. eine sehr starke Replikation. Da zwischen 36 h und 72 h p.i. der Titer von Virus H nicht weiter ansteigt und D hingegen im gleichen Zeitraum eine deutliche Replikation zeigt, besitzt Reassortante D 48 h und 72 h p.i. einen signifikant höheren Titer von etwa einer halben bzw. einer log-Stufe gegenüber Virus H (Tabelle 29, Abbildung 14). Der höchste

Titer wird von Virus H nach 48 h ( $10^{7,3}$  pfu/ml), von Virus D 72 h p.i. ( $10^{8,0}$  pfu/ml) erreicht (Tabelle 28, Abbildung 14).

Während die Reassortante T ein humanes PB2- und PA-Segment trägt, besitzen die Viren D und H porcine bzw. aviäre PB2- und PA-Segmente (Tabelle 22). Ein Vergleich der Reassortanten D und T bzw. H und T zeigt 12 h p.i. leichte Titerunterschiede, die jedoch nicht signifikant sind (Tabelle 29). Im Zeitraum zwischen 12 h und 36 h p.i. weisen die Viren D und H eine sehr starke Replikation auf, T hingegen zeigt im gleichen Zeitraum eine niedrige Replikationsrate (Tabelle 28, Abbildung 14). Dies hat zur Folge, dass bereits 24 h p.i. der Titer von Virus D zwei log-Stufen, der Titer von H drei log-Stufen über dem von Virus T liegt (Tabelle 29, Abbildung 14). Reassortante D zeigt zwischen 36 h und 72 h p.i. noch eine abgeschwächte Replikation, bei Virus H und T ist kein Titeranstieg in diesem Zeitraum festzustellen. Der signifikante Unterschied zwischen D und T steigt dadurch bis 72 h p.i. auf vier log-Stufen an bzw. bleibt zwischen H und T konstant bei drei log-Stufen (Tabelle 29). Den maximalen Titer erreicht Virus D 72 h p.i. ( $10^{8,0}$  pfu/ml), Virus H 48 h p.i. ( $10^{7,3}$  pfu/ml) und Virus T ebenfalls 48 h p.i. ( $10^{4,3}$  pfu/ml) (Tabelle 28, Abbildung 14).

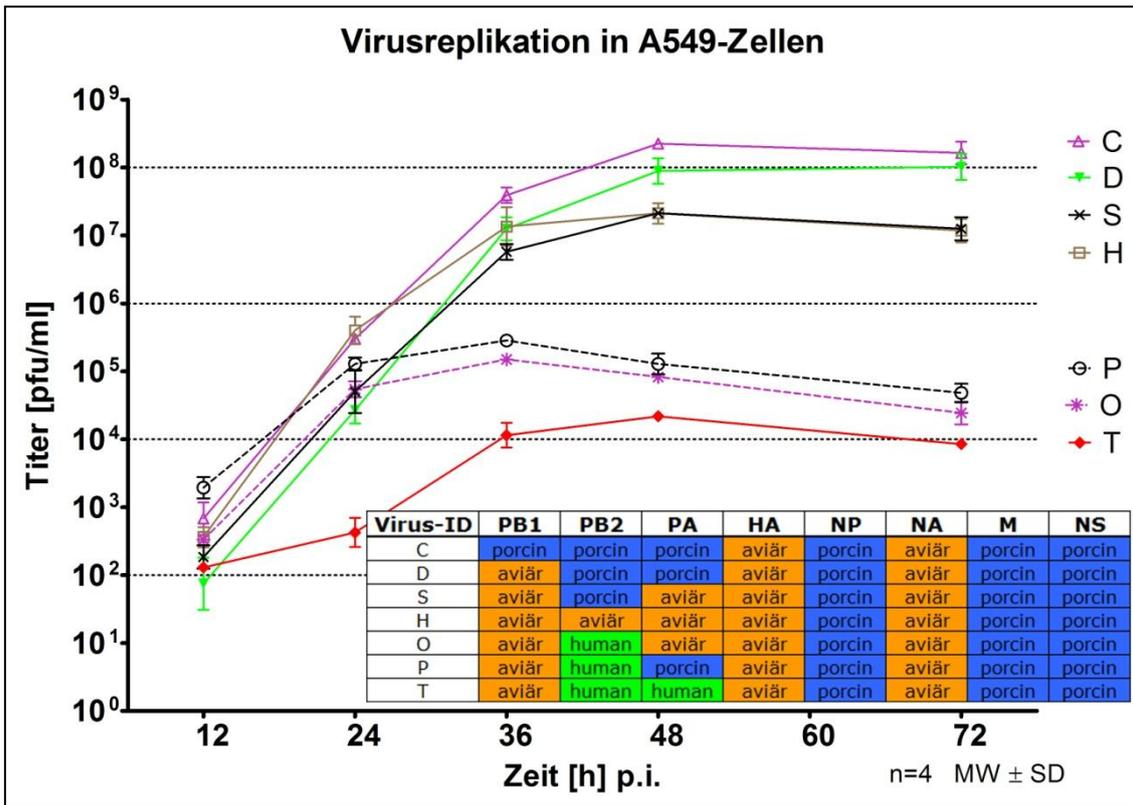
Die Reassortante D unterscheidet sich von P im PB2-Segment, von O im PB2- und PA-Segment (Tabelle 22). 12 h p.i. weisen Virus P und O noch einen signifikant höheren Titer als Virus D auf (Tabelle 29). Da die Reassortante D im weiteren Verlauf bis 36 h p.i. eine gleichbleibend sehr starke Replikation zeigt, die Viren P und O hingegen nur zwischen 12 h und 24 h p.i. eine starke Replikation aufweisen und danach bis 36 h p.i. nur deutlich abgeschwächt replizieren, liegt der Virustiter von D 36 h p.i. signifikant über P und O (Tabelle 29, Abbildung 14). Im weiteren Verlauf der Replikation steigt der Titer von D weiter an, die Titer von P und O fallen hingegen ab (Tabelle 28). Somit vergrößert sich der signifikante Unterschied auf etwa dreieinhalb log-Stufen zum Zeitpunkt 72 h p.i. (Tabelle 29). Der maximale Virustiter wird 72 h p.i. mit  $10^{8,0}$  pfu/ml (Virus D) bzw. 36 h p.i. mit  $10^{5,5}$  pfu/ml (Virus P) und  $10^{5,2}$  pfu/ml (Virus O) erreicht (Tabelle 28, Abbildung 14).

Der genetische Unterschied der Reassortanten C und P liegt in den PB1- und PB2-Segmenten (Tabelle 22). Beide Viren unterscheiden sich 12 h und 24 h

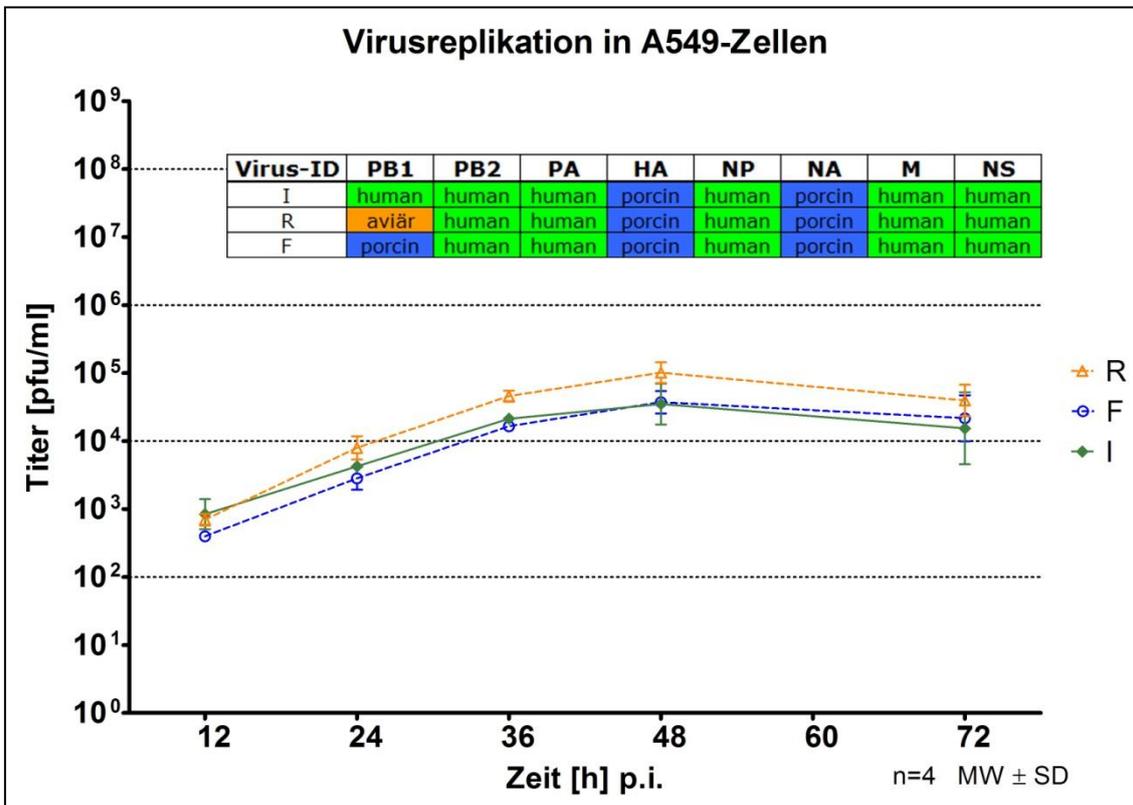
p.i. nicht signifikant in ihrem Titer (Tabelle 29). In diesem Zeitraum weist Virus C eine sehr starke, Virus P eine starke Replikation auf (Tabelle 28, Abbildung 14). Während die Reassortante C die sehr starke Replikation bis 36 h p.i. beibehält und sie erst danach abnimmt, steigt der Titer von P zwischen 24 h und 36 h p.i. kaum noch an und fällt danach bis 72 h p.i. ab. In der Folge unterscheiden sich die Titer von C und P ab dem Zeitpunkt 36 h p.i. signifikant um zwei bis dreieinhalb log-Stufen (Tabelle 29, Abbildung 14). Der höchste Titer wird von Virus C nach 48 h ( $10^{8,4}$  pfu/ml), von Virus P 36 h p.i. ( $10^{5,5}$  pfu/ml) erreicht (Tabelle 28, Abbildung 14).

Die rekombinanten Viren S und H unterscheiden sich gegenüber P in der Herkunft der PB2- und PA-Segmente (Tabelle 22). 12 h nach Infektion weist P einen signifikant erhöhten Titer im Vergleich zu S und H auf (Tabelle 29). Im Verlauf bis 36 h p.i. replizieren die Viren S und H sehr stark. Die Replikation der Reassortante P ist lediglich zwischen 12 h und 24 h p.i. stark und nimmt nach 24 h p.i. deutlich ab (Tabelle 28, Abbildung 14). Dieser Unterschied im Replikationsverhalten führt 36 h p.i. zu einem signifikant erhöhten Titer von S und H gegenüber P (Tabelle 29). Im Zeitraum zwischen 36 h und 72 h p.i. steigt der Titer von S und H kaum oder nicht mehr an, der Virustiter von P nimmt sogar ab. Die signifikante Differenz der Titer von S und H im Vergleich zu P wächst bis 72 h p.i. auf etwa zweieinhalb log-Stufen an (Tabelle 29, Abbildung 14). Der höchste Titer wird von Virus S und H ( $10^{7,3}$  pfu/ml) nach 48 h, von Virus P 36 h p.i. ( $10^{5,5}$  pfu/ml) erreicht (Tabelle 28, Abbildung 14).

Die Reassortanten S und T unterscheiden sich im PB2- und PA-Segment (Tabelle 22). 12 h p.i. besitzen die Viren nahezu den gleichen Titer. Zwischen 12 h und 36 h p.i. zeigt Virus S eine sehr starke Replikation, wohingegen T im gleichen Zeitraum nur eine geringe Replikation aufweist (Tabelle 28, Abbildung 14). Dies führt bereits ab 24 h p.i. zu signifikant und deutlich höheren Virustitern von S im Vergleich zu T (Tabelle 29). Im weiteren Verlauf ab 36 h p.i. ist das Replikationsverhalten von Reassortante S und T ähnlich: Es kommt zu einem leichten Titeranstieg bis 48 h p.i., gefolgt von einem leichten Abfall bis 72 h p.i. (Tabelle 28, Abbildung 14). Der signifikante Titerunterschied von etwa drei log-Stufen bleibt dadurch ab 36 h p.i. bestehen (Tabelle 29). Den maximalen Titer erreichen beide Viren 48 h p.i. (Virus S:  $10^{7,3}$  pfu/ml; Virus T:  $10^{4,3}$  pfu/ml) (Tabelle 28, Abbildung 14).



**Abbildung 14: Einfluss des Polymerasekomplexes auf das Replikationsverhalten**



**Abbildung 15: Einfluss des Polymerasekomplexes auf das Replikationsverhalten**

Die Reassortanten F, R und E weisen humane NP-, M- und NS-Segmente und ein porcines HA auf, unterscheiden sich jedoch z.T. im NA- und PB1-Segment (Tabelle 22). Die drei Viren besitzen 12 h p.i. beinahe den gleichen Titer (Tabelle 28, Tabelle 29, Abbildung 11). Obwohl sich alle drei Reassortanten in ihrem Replikationsverhalten ähneln und zwischen 12 h und 36 h p.i. nur eine niedrige Replikationsrate besitzen, die sich zwischen 36 h und 48 h p.i. weiter abschwächt, führen kleine Unterschiede in der Höhe der Replikation zu einem signifikanten Titerunterschied zwischen F und E zum Zeitpunkt 24 h, 36 h und 72 h p.i. (Tabelle 29, Abbildung 11). Die höchsten Titer werden 48 h p.i. erreicht (F:  $10^{4,6}$  pfu/ml; R:  $10^{5,0}$  pfu/ml; E:  $10^{5,0}$  pfu/ml), bevor der Virustiter bis 72 h p.i. bei allen Reassortanten leicht abfällt (Tabelle 28, Abbildung 11).

In Abbildung 15 ist der Replikationsverlauf aller Viren gezeigt, die ein humanes NP-, M- und NS-Segment, porcine HA- und auch NA-Segmente und unterschiedlich zusammengesetzte Polymerasekomplexe besitzen. Die drei Viren R, F und I unterscheiden sich lediglich in der Herkunft ihres PB1-Segments (Tabelle 22). Alle Viren weisen 12 h p.i. einen annähernd gleichen Titer und eine schwache Replikation bis 48 h p.i. auf (Tabelle 28, Abbildung 15). Zwischen 48 h p.i. und 72 h p.i. ist bei allen drei Reassortanten ein leichter Titerabfall zu beobachten (Tabelle 28). Zwischen den Viren gibt es trotz der Unterschiede im PB1-Segment zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Titerunterschied (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Vergleich des Replikationsverhaltens von Parentalviren und Reassortanten**

Virenvergleich (Virus-IDs)	1. Segmentaustausch ... gegen ...		2. Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung des Titers 12 h p.i.		Veränderung des Titers 24 h p.i.		Veränderung des Titers 36 h p.i.		Veränderung des Titers 48 h p.i.		Veränderung des Titers 72 h p.i.	
	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***	Titer [ $\log_{10}$ Titer] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘, ↙	Veränderung signifikant: ns - ***
<b>K</b> / E	huHA	poHA	-		2,3 ↗ 2,7	ns	4,4 ↘ 4,0	ns	6,0 ↘ 4,8	***	6,7 ↘ 5,0	***	6,3 ↘ 4,9	***
<b>B</b> / A	poHA	avHA	-		3,1 ↘ 3,0	ns	4,9 ↗ 5,5	*	6,7 ↗ 7,9	***	7,7 ↗ 8,5	***	7,7 ↗ 8,4	**
E / I	huNA	poNA	-		2,7 ↗ 2,9	ns	4,0 ↘ 3,6	ns	4,8 ↘ 4,3	*	5,0 ↘ 4,5	ns	4,9 ↘ 4,2	**
A / C	poNA	avNA	-		3,0 ↘ 2,8	ns	5,5 → 5,5	ns	7,9 ↘ 7,6	ns	8,5 ↘ 8,4	ns	8,4 ↘ 8,2	ns
I-F-R:														
I / F	huPB1	poPB1	-		2,9 ↘ 2,6	ns	3,6 ↘ 3,5	ns	4,3 ↘ 4,2	ns	4,5 ↗ 4,6	ns	4,2 ↗ 4,3	ns
I / R	huPB1	avPB1	-		2,9 ↘ 2,8	ns	3,6 ↗ 3,9	ns	4,3 ↗ 4,7	ns	4,5 ↗ 5,0	ns	4,2 ↗ 4,6	ns
F / R	poPB1	avPB1	-		2,6 ↗ 2,8	ns	3,5 ↗ 3,9	ns	4,2 ↗ 4,7	ns	4,6 ↗ 5,0	ns	4,3 ↗ 4,6	ns
C / D	poPB1	avPB1	-		2,8 ↘ 1,9	***	5,5 ↘ 4,4	***	7,6 ↘ 7,1	ns	8,4 ↘ 7,9	ns	8,2 ↘ 8,0	ns
H-S-O:														
H / S	avPB2	poPB2	-		2,6 ↘ 2,3	ns	5,6 ↘ 4,7	***	7,1 ↘ 6,8	ns	7,3 → 7,3	ns	7,1 → 7,1	ns
H / O	avPB2	huPB2	-		2,6 ↘ 2,5	ns	5,6 ↘ 4,7	***	7,1 ↘ 5,2	***	7,3 ↘ 4,9	***	7,1 ↘ 4,4	***
S / O	poPB2	huPB2	-		2,3 ↗ 2,5	ns	4,7 → 4,7	ns	6,8 ↘ 5,2	***	7,3 ↘ 4,9	***	7,1 ↘ 4,4	***
D / P	poPB2	huPB2	-		1,9 ↗ 3,3	***	4,4 ↗ 5,1	**	7,1 ↘ 5,5	***	7,9 ↘ 5,1	***	8,0 ↘ 4,7	***
O-P-T:														
O / P	avPA	poPA	-		2,5 ↗ 3,3	***	4,7 ↗ 5,1	ns	5,2 ↗ 5,5	ns	4,9 ↗ 5,1	ns	4,4 ↗ 4,7	ns
O / T	avPA	huPA	-		2,5 ↘ 2,1	ns	4,7 ↘ 2,6	***	5,2 ↘ 4,1	***	4,9 ↘ 4,3	*	4,4 ↘ 3,9	ns
P / T	poPA	huPA	-		3,3 ↘ 2,1	***	5,1 ↘ 2,6	***	5,5 ↘ 4,1	***	5,1 ↘ 4,3	***	4,7 ↘ 3,9	***
D / S	poPA	avPA	-		1,9 ↗ 2,3	ns	4,4 ↗ 4,7	ns	7,1 ↘ 6,8	ns	7,9 ↘ 7,3	**	8,0 ↘ 7,1	***
<b>K</b> / I	huHA	poHA	huNA	poNA	2,3 ↗ 2,9	**	4,4 ↘ 3,6	***	6,0 ↘ 4,3	***	6,7 ↘ 4,5	***	6,3 ↘ 4,2	***
<b>B</b> / C	poHA	avHA	poNA	avNA	3,1 ↘ 2,8	ns	4,9 ↗ 5,5	*	6,7 ↗ 7,6	***	7,7 ↗ 8,4	**	7,7 ↗ 8,2	*
E / F	huPB1	poPB1	huNA	poNA	2,7 ↘ 2,6	ns	4,0 ↘ 3,5	*	4,8 ↘ 4,2	**	5,0 ↘ 4,6	ns	4,9 ↘ 4,3	*
E / R	huPB1	avPB1	huNA	poNA	2,7 ↗ 2,8	ns	4,0 ↘ 3,9	ns	4,8 ↘ 4,7	ns	5,0 → 5,0	ns	4,9 ↘ 4,6	ns
A / D	poPB1	avPB1	poNA	avNA	3,0 ↘ 1,9	***	5,5 ↘ 4,4	***	7,9 ↘ 7,1	***	8,5 ↘ 7,9	*	8,4 ↘ 8,0	ns
C / P	poPB1	avPB1	poPB2	huPB2	2,8 ↗ 3,3	ns	5,5 ↘ 5,1	ns	7,6 ↘ 5,5	***	8,4 ↘ 5,1	***	8,2 ↘ 4,7	***
C / S	poPB1	avPB1	poPA	avPA	2,8 ↘ 2,3	*	5,5 ↘ 4,7	***	7,6 ↘ 6,8	***	8,4 ↘ 7,3	***	8,2 ↘ 7,1	***
D / T	poPB2	huPB2	poPA	huPA	1,9 ↗ 2,1	ns	4,4 ↘ 2,6	***	7,1 ↘ 4,1	***	7,9 ↘ 4,3	***	8,0 ↘ 3,9	***
D / O	poPB2	huPB2	poPA	avPA	1,9 ↗ 2,5	**	4,4 ↗ 4,7	ns	7,1 ↘ 5,2	***	7,9 ↘ 4,9	***	8,0 ↘ 4,4	***
S / T	poPB2	huPB2	avPA	huPA	2,3 ↘ 2,1	ns	4,7 ↘ 2,6	***	6,8 ↘ 4,1	***	7,3 ↘ 4,3	***	7,1 ↘ 3,9	***
S / P	poPB2	huPB2	avPA	poPA	2,3 ↗ 3,3	***	4,7 ↗ 5,1	ns	6,8 ↘ 5,5	***	7,3 ↘ 5,1	***	7,1 ↘ 4,7	***
D / H	poPB2	avPB2	poPA	avPA	1,9 ↗ 2,6	**	4,4 ↗ 5,6	***	7,1 → 7,1	ns	7,9 ↘ 7,3	**	8,0 ↘ 7,1	***
H / T	avPB2	huPB2	avPA	huPA	2,6 ↘ 2,1	ns	5,6 ↘ 2,6	***	7,1 ↘ 4,1	***	7,3 ↘ 4,3	***	7,1 ↘ 3,9	***
H / P	avPB2	huPB2	avPA	poPA	2,6 ↗ 3,3	**	5,6 ↘ 5,1	ns	7,1 ↘ 5,5	***	7,3 ↘ 5,1	***	7,1 ↘ 4,7	***
C / H	poPB1	avPB1	poPA	avPA	2,8 ↘ 2,6	ns	5,5 ↗ 5,6	ns	7,6 ↘ 7,1	ns	8,4 ↘ 7,3	***	8,2 ↘ 7,1	***
	poPB2	avPB2	-											

a / b: Vergleich der Viren a und b; **K**, **B**, **L**: humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus; x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung des Titers von x auf y; x → y: nach Segmentaustausch keine Veränderung des Titers; x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken des Titers von x auf y; ns: nicht signifikant; \*: signifikant, p≤0,05; \*\*: signifikant, p≤0,01; \*\*\*: signifikant, p≤0,001

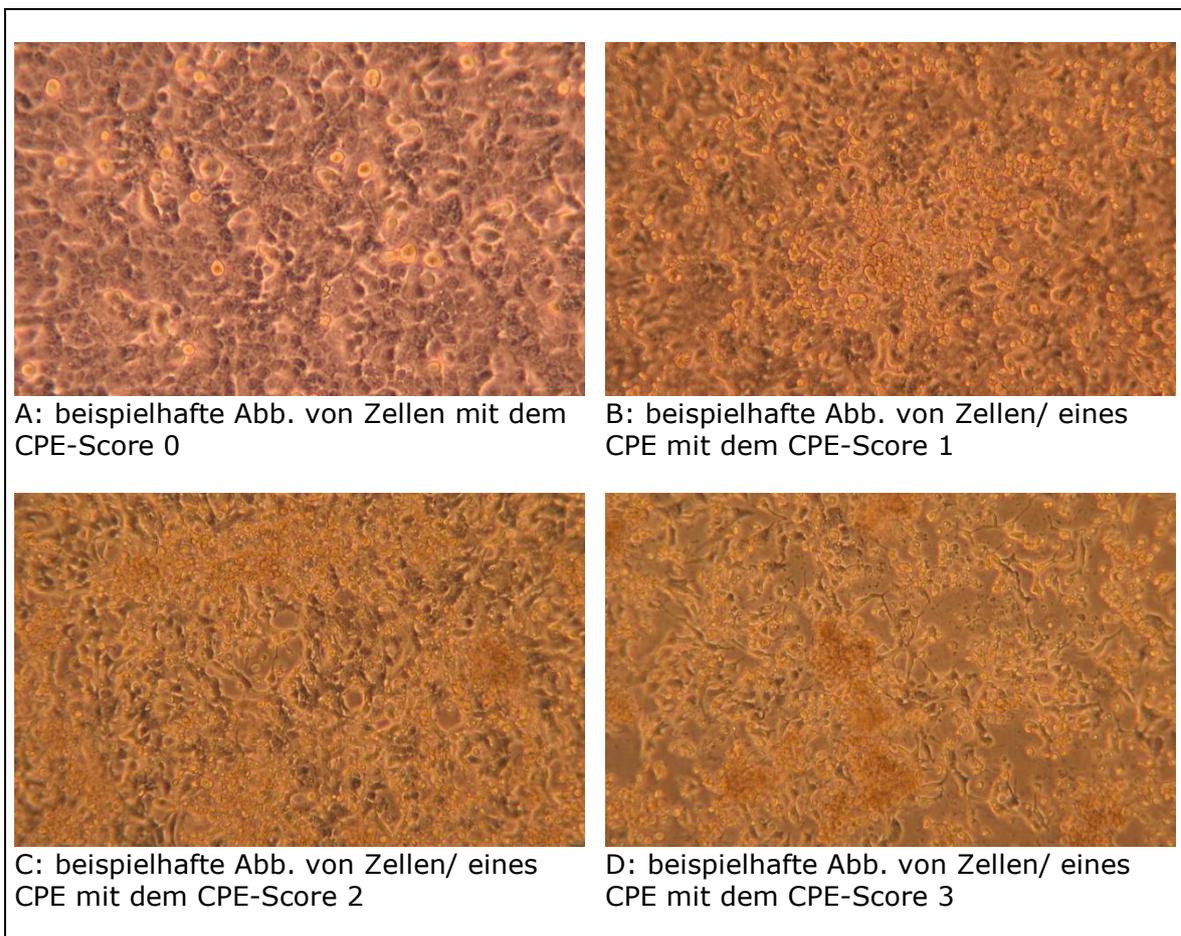
#### **4.5.2 Cytopathischer Effekt (CPE)**

Nach der viralen Infektion einer Zelle kommt es u.a. bedingt durch die virale Replikation und die Veränderungen in der zellulären Proteinbiosynthese zu strukturellen Veränderungen der Wirtszelle, die mikroskopisch als cytopathischer Effekt (CPE) sichtbar werden. Der im Verlauf der Virusreplikation auftretende CPE wurde, wie in Kap. 3.22.2 beschrieben, fotografisch dokumentiert, bewertet und klassifiziert (Abbildung 16, Tabelle 30). Für jedes Virus und jeden Zeitpunkt wurde aus zwei CPE-Scorewerten aus der Beurteilung zweier zeitlich unabhängig voneinander durchgeführter Replikationskinetiken ein Mittelwert berechnet (Tabelle 30).

Die A549-Zellen, die mit den Parentalviren K, B oder L infiziert wurden, bilden im Verlauf der Replikation einen deutlichen CPE aus. Der Zeitpunkt, ab dem ein CPE sichtbar wird oder sich verstärkt, variiert jedoch (Tabelle 30). Ein deutlicher CPE ist bei der Replikationskinetik des humanen Parentalvirus K 48 h p.i., insbesondere aber 72 h p.i., festzustellen (Tabelle 30). Die Zellen, die mit dem porcinen Parentalvirus B infiziert wurden, zeigen erst 72 h p.i. einen deutlichen CPE. Das aviäre Parentalvirus L verursacht in den A549-Zellen 36 h p.i. einen leichten CPE, der ab 48 h p.i. deutlicher zu sehen ist (Tabelle 30).

Die Reassortanten A, C, D, S, H, O, P und T, die ein porcines NP-, M- und NS-Segment besitzen und sich voneinander vor allem im Polymerasekomplex unterscheiden, verursachen bis auf eine Ausnahme (Virus T) spätestens 72 h p.i. einen stark ausgeprägten CPE (Tabelle 22, Tabelle 30). Reassortanten, die im Vergleich zum porcinen Parentalvirus B ein aviäres HA (Virus A) oder aviäres HA und NA (Virus C) aufweisen, lösen bereits 48 h p.i. einen leichten CPE aus, der 24 h später (72 h p.i.) eine stärkere Ausprägung im Vergleich zu Parentalvirus B erreicht (Tabelle 22, Tabelle 30). Werden ergänzend zu den vorhandenen aviären HA- und NA-Segmenten (Virus C) zunehmend porcine gegen aviäre Polymerasesegmente (PB1, PB2, PA) ausgetauscht (Virus C, D, S, H), so tritt mit jedem zusätzlichen aviären Polymerasesegment der CPE früher und/ oder stärker ein (Tabelle 22, Tabelle 30). Wird vor dem Hintergrund eines aviären PB1- und PA-Polymerasesegments das aviäre (Virus H) oder porcine PB2 (Virus S) gegen das humane PB2 (Virus O) ausgetauscht,

so tritt bereits nach 24 h p.i. ein starker CPE in den infizierten A549-Zellen auf. Der gleiche frühe, starke CPE wird beobachtet, wenn bei aviärem PB1- und porcine PA-Polymerasesegment das porcine (Virus D) gegen das humane PB2 (Virus P) ausgetauscht wird (Tabelle 22, Tabelle 30). Dieser Effekt des starken CPEs 24 h p.i. tritt nur bei Reassortante O und P auf, die neben dem aviären PB1 und humanen PB2 ein aviäres (Virus O) oder porcines PA (Virus P) besitzen. Virus T, das demgegenüber neben dem aviären PB1 und dem humanen PB2 auch ein humanes PA trägt, zeigt einen schwächeren und späteren CPE im Replikationsverlauf (Tabelle 22, Tabelle 30).



**Abbildung 16 A-D: beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Zellen/ CPE**

Werden A549-Zellen mit den Reassortanten E, I, R und F, die ein humanes NP-, M- und NS-Segment tragen und sich meist im Polymerasekomplex unterscheiden, infiziert, so bilden die Zellen im Verlauf der Viruskinetik höchstens einen leichten CPE aus (Tabelle 22, Tabelle 30). Reassortanten, die im Vergleich zum humanen Parentalvirus K ein porcines HA (Virus E) bzw. ein porcines HA und NA (Virus I) aufweisen, zeigen nach 72 h bzw. 48 h p.i. einen

CPE, der im Gegensatz zu Virus K nur leicht ausgeprägt ist (Tabelle 22, Tabelle 30). Ein Austausch des PB1-Segments zwischen den Reassortanten I, R und F verändert den Grad des CPEs nicht. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens des CPEs variiert jedoch zwischen 48 h (Virus I und R) und 72 h p.i. (Virus F) (Tabelle 22, Tabelle 30).

**Tabelle 30: Zellzustand/ Grad des CPEs zu definierten Zeitpunkten der Replikationskinetik**

Virus (Virus-ID)	Zeitpunkt p.i./ CPE-Score						
	0 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
K (huH1N1)	0	0	0	0	0	1,5	2
B (poH1N1)	0	0	0	0	0	0	1,5
L (avH5N1)	0	0	0	0	1	2	2
A	0	0	0	0	0	1	2,5
C	0	0	0	0	0	1	2,5
D	0	0	0	0	0,5	3	3
S	0	0	0	0	1,5	3	3
H	0	0	0	0	2	3	3
O	0	0	0	3	3	3	3
P	0	0	0	3	3	2,5	3
T	0	0	0	0	1,5	2	1,5
E	0	0	0	0	0	0	1
I	0	0	0	0	0	0,5	1
R	0	0	0	0	0	0,5	1
F	0	0	0	0	0	0	1
NK (ohne Virus; Infektionsmedium - A549)	0	0	0	0	0	0	0
NK (DMEM ohne Zusätze)	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 31: Beschreibung des Zellzustandes/ CPEs und Zuordnung zu einem Scorewertebereich**

Zellzustand/ CPE	CPE-Score
kein CPE	0 bis <0,5
sichtbarer (leichter) CPE	0,5 bis <1,5
deutlicher CPE	1,5 bis <2,5
(sehr) starker CPE	2,5 bis 3

## **4.6 Interferonsekretion von A549-Zellen nach Infektion mit Parentalviren und Reassortanten**

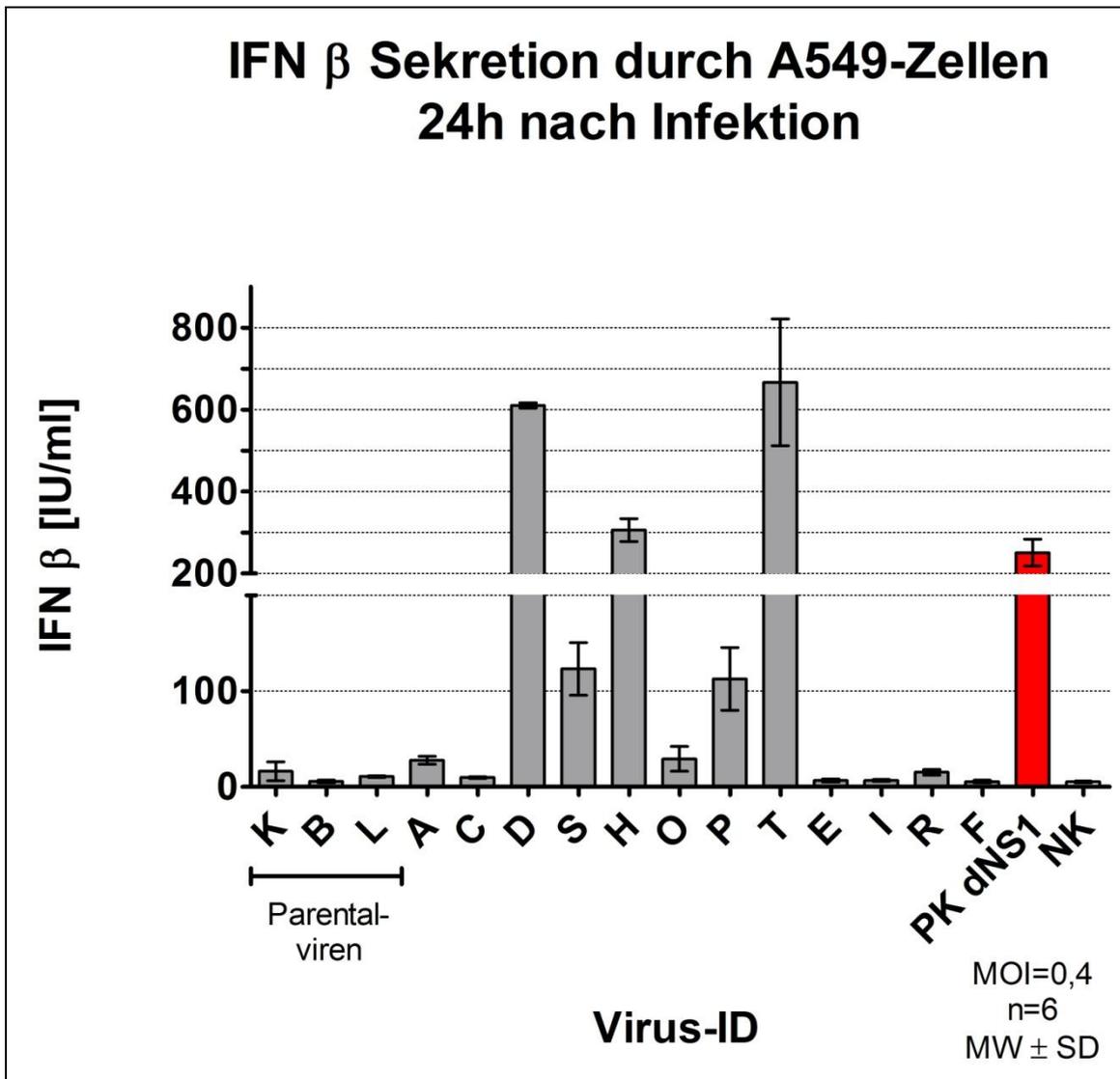
Die Sekretion von IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 2 durch humane A549-Lungenzellen wurde 24 h nach deren Infektion mit humanen, porcinen und aviären Parentalviren und deren Reassortanten analysiert (s. Kap. 3.23). Die Quantifizierung des IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 2 im Zellkulturüberstand wurde wie in Kapitel 3.23.1 und 3.23.2 beschrieben mittels ELISA durchgeführt.

### **4.6.1 Sekretion von IFN- $\beta$**

Die IFN- $\beta$  Konzentration im Zellkulturüberstand der mit den jeweiligen Viren infizierten A549-Zellen bzw. der nicht infizierten Zellkontrolle (NK) ist in Tabelle 32 aufgeführt. Zellen, die mit den porcinen und aviären Parentalviren B und L oder den Reassortanten C, E, I oder F infiziert wurden, zeigen eine sehr niedrige IFN- $\beta$  Sekretion auf dem Niveau der nicht infizierten Zellkontrolle (NK) (Tabelle 32, Abbildung 17). Eine Infektion mit dem humanen Parentalvirus K oder den Reassortanten A, O oder R bewirkt eine niedrige IFN- $\beta$  Sekretion, die nur sehr wenig und nicht signifikant über der Sekretion der nicht infizierten Zellkontrolle (NK) liegt (Tabelle 32, Tabelle 33, Abbildung 17). Die Infektion der A549-Zellen mit den Reassortanten S und P verursacht eine IFN- $\beta$  Konzentration von etwa 110 bis 125 IU/ml im Überstand (Tabelle 32, Abbildung 17). Diese Werte unterscheiden sich zwar in ihrer Tendenz, nicht aber signifikant von der IFN- $\beta$  Sekretion durch nicht infizierte Zellen (NK) oder infizierten A549-Zellen mit sehr niedrigem bzw. niedrigem IFN- $\beta$  Sekretionsniveau (K, B, L, A, C, O, E, I, R, F) (Tabelle 33). Zellen, die mit der Reassortante H infiziert wurden, geben etwa 300 IU IFN- $\beta$  pro Milliliter Kulturüberstand ab. Sie sekretieren somit hohe, vergleichbare Mengen wie die mit A/PR/8/1934 delta NS1 infizierten A549-Zellen (PK dNS1) (Tabelle 32, Abbildung 17). Die Höhe der Sekretion ist dabei signifikant unterschiedlich zu allen anderen gemessenen IFN- $\beta$  Konzentrationen außer der PK dNS1 (Tabelle 33). Eine Infektion der A549-Zellen mit den Reassortanten D und T verursacht eine gegenüber allen anderen Viren sehr stark und signifikant erhöhte IFN- $\beta$  Sekretion von über 600 IU/ml (Tabelle 32, Tabelle 33, Abbildung 17).

**Tabelle 32: IFN- $\beta$  Sekretion von A549-Zellen nach Infektion**

Virus-ID	IFN- $\beta$ Sekretion [IU/ml]	Virus-ID	IFN- $\beta$ Sekretion [IU/ml]
K (huH1N1)	16,4	E	6,7
B (poH1N1)	5,8	I	6,8
L (avH5N1)	10,9	R	15,3
A	27,7	F	5,6
C	9,9	PK dNS1	251,3
D	610,4	NK	5,2
S	123,3		
H	306,1		
O	29,3		
P	112,8		
T	666,6		



**Abbildung 17: IFN- $\beta$  Sekretion von A549-Zellen 24 h nach Infektion**

**Tabelle 33: Signifikanzniveau der IFN- $\beta$  Sekretion von A549-Zellen nach Infektion**

	<b>K</b>	<b>B</b>	<b>L</b>	A	C	D	S	H	O	P	T	E	I	R	F	PK dNS1
<b>K</b>																
<b>B</b>	ns															
<b>L</b>	ns	ns														
A	ns	ns	ns													
C	ns	ns	ns	ns												
D	***	***	***	***	***											
S	ns	ns	ns	ns	ns	***										
H	***	***	***	***	***	***	***									
O	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***								
P	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns							
T	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	***						
E	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***					
I	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns				
R	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns	ns			
F	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	ns		
PK dNS1	***	***	***	***	***	***	ns	ns	***	*	***	***	***	***	***	
NK	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	***

**K, B, L:** humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus;

ns: nicht signifikant;

\*: signifikant,  $p \leq 0,05$ ; \*\*: signifikant,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*: signifikant,  $p \leq 0,001$

#### 4.6.1.1 Einfluss des Austausches der Oberflächenproteine HA und NA auf die IFN- $\beta$ Sekretion

Austausche in den Oberflächenproteinen HA und NA zwischen dem humanen Parentalvirus K und den Reassortanten E und I, die porcine HA- bzw. porcine HA- und NA-Proteine tragen, haben nur eine geringfügige, nicht signifikante Absenkung der IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen zur Folge. Wird nur das humane gegen das porcine NA ausgetauscht (Virus E zu I), bleibt die IFN- $\beta$  Sekretion unverändert (Tabelle 32, Tabelle 33, Tabelle 34, Abbildung 17).

Werden die Oberflächenproteine des porcinen Parentalvirus B gegen ein aviäres HA- (Virus A) bzw. HA- und NA-Protein (Virus C) ausgetauscht, so führt dies zu einer Steigerung der IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen, die jedoch nicht signifikant ist. Ein Austausch nur des porcinen gegen das aviäre NA

(Virus A zu C) führt zu einem nicht signifikanten, leichten Abfall der IFN- $\beta$  Sekretion (Tabelle 32, Tabelle 33, Tabelle 34, Abbildung 17).

In der Gesamtbetrachtung hat der Austausch eines oder beider Oberflächenproteine keine signifikanten Auswirkungen auf die IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Wirtszellen.

#### **4.6.1.2 Einfluss des Austausches der Polymeraseproteine auf die IFN- $\beta$ Sekretion**

Die Reassortanten C, D, S, H, O, P und T unterscheiden sich ausschließlich in der Zusammensetzung ihres Polymerasekomplexes und weisen im Übrigen aviäre Oberflächenproteine und porcine NP-, M- und NS-Segmente auf (Tabelle 22). Wie in Tabelle 32 und Abbildung 17 deutlich wird, hat die Zusammensetzung des Polymerasekomplexes dabei einen sehr großen Einfluss auf das Maß der IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen. Die identifizierten Unterschiede sind dabei häufig signifikant (Tabelle 33, Tabelle 34). Das gemeinsame Merkmal der Reassortanten D, S, H, P und T, die eine mittlere bis sehr hohe IFN- $\beta$  Sekretion verursachen, ist das Vorhandensein eines aviären PB1-Proteins im Polymerasekomplex. Nur in einem Fall (Reassortante O) führt das aviäre PB1 nicht zu einer hohen IFN- $\beta$  Sekretion. Die Reassortanten mit aviärem PB1 und gleichartigem, d.h. porcinem, aviärem oder humanem PB2 und PA (Virus D, H, T) verursachen gegenüber anderen Viren mit aviärem PB1 eine besonders hohe IFN- $\beta$  Sekretion in infizierten Zellen (Tabelle 32, Abbildung 17).

Die Reassortanten I, R und F weisen porcine Oberflächenproteine HA und NA und humane NP-, M- und NS-, aber auch humane PB2- und PA-Segmente auf. Der einzige Unterschied ist daher die Herkunft des PB1-Proteins (Tabelle 22). Es konnte festgestellt werden, dass im Fall dieser drei Reassortanten die unterschiedliche Herkunft des PB1 und somit die Zusammensetzung des Polymerasekomplexes keine signifikanten Unterschiede in der IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen verursacht (Tabelle 32, Tabelle 33, Tabelle 34, Abbildung 17).

Auch wenn nicht in jedem betrachteten Fall ein Einfluss der Zusammensetzung des Polymerasekomplexes auf die IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Wirtszellen

gezeigt werden konnte, so führt offensichtlich doch das Vorhandensein bestimmter Polymeraseproteine, beispielsweise des aviären PB1, im Vergleich häufig zu einer signifikant höheren IFN- $\beta$  Sekretion (Tabelle 34).

**Tabelle 34: Vergleich der IFN- $\beta$  Sekretion nach Infektion mit generierten Viren**

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segment-austausch ... gegen ...		2. Segment-austausch ... gegen ...		Veränderung der IFN- $\beta$ Sekretion		Veränderung signifikant: ns - ***
					Werte [IU/ml] und Richtung der Veränderung: $\nearrow, \searrow$	Faktor der Veränderung	
<b>K</b> / E	huHA	poHA	-	-	16,4 $\searrow$ 6,7	2,4	ns
<b>B</b> / A	poHA	avHA	-	-	5,8 $\nearrow$ 27,7	4,8	ns
E / I	huNA	poNA	-	-	6,7 $\nearrow$ 6,8	1,0	ns
A / C	poNA	avNA	-	-	27,7 $\searrow$ 9,9	2,8	ns
I-F-R:							
I / F	huPB1	poPB1	-	-	6,8 $\searrow$ 5,6	1,2	ns
I / R	huPB1	avPB1	-	-	6,8 $\nearrow$ 15,3	2,3	ns
F / R	poPB1	avPB1	-	-	5,6 $\nearrow$ 15,3	2,7	ns
C / D	poPB1	avPB1	-	-	9,9 $\nearrow$ 610,4	61,7	***
H-S-O:							
H / S	avPB2	poPB2	-	-	306,1 $\searrow$ 123,3	2,5	***
H / O	avPB2	huPB2	-	-	306,1 $\searrow$ 29,3	10,4	***
S / O	poPB2	huPB2	-	-	123,3 $\searrow$ 29,3	4,2	ns
D / P	poPB2	huPB2	-	-	610,4 $\searrow$ 112,8	5,4	***
O-P-T:							
O / P	avPA	poPA	-	-	29,3 $\nearrow$ 112,8	3,8	ns
O / T	avPA	huPA	-	-	29,3 $\nearrow$ 666,6	22,8	***
P / T	poPA	huPA	-	-	112,8 $\nearrow$ 666,6	5,9	***
D / S	poPA	avPA	-	-	610,4 $\searrow$ 123,3	5,0	***
<b>K</b> / I	huHA	poHA	huNA	poNA	16,4 $\searrow$ 6,8	2,4	ns
<b>B</b> / C	poHA	avHA	poNA	avNA	5,8 $\nearrow$ 9,9	1,7	ns
E / F	huPB1	poPB1	huNA	poNA	6,7 $\searrow$ 5,6	1,2	ns
E / R	huPB1	avPB1	huNA	poNA	6,7 $\nearrow$ 15,3	2,3	ns
A / D	poPB1	avPB1	poNA	avNA	27,7 $\nearrow$ 610,4	22,0	***
C / P	poPB1	avPB1	poPB2	huPB2	9,9 $\nearrow$ 112,8	11,4	ns
C / S	poPB1	avPB1	poPA	avPA	9,9 $\nearrow$ 123,3	12,5	ns
D / T	poPB2	huPB2	poPA	huPA	610,4 $\nearrow$ 666,6	1,1	ns
D / O	poPB2	huPB2	poPA	avPA	610,4 $\searrow$ 29,3	20,8	***
S / T	poPB2	huPB2	avPA	huPA	123,3 $\nearrow$ 666,6	5,4	***
S / P	poPB2	huPB2	avPA	poPA	123,3 $\searrow$ 112,8	1,1	ns
D / H	poPB2	avPB2	poPA	avPA	610,4 $\searrow$ 306,1	2,0	***

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segmentaustausch ... gegen ...		2. Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der IFN- $\beta$ Sekretion		Veränderung signifikant: ns - ***
					Werte [IU/ml] und Richtung der Veränderung: $\nearrow, \searrow$	Faktor der Veränderung	
H / T	avPB2	huPB2	avPA	huPA	306,1 $\nearrow$ 666,6	2,2	***
H / P	avPB2	huPB2	avPA	poPA	306,1 $\searrow$ 112,8	2,7	***
C / H	poPB1	avPB1	poPA	avPA	9,9 $\nearrow$ 306,1	30,9	***
	poPB2	avPB2	-				

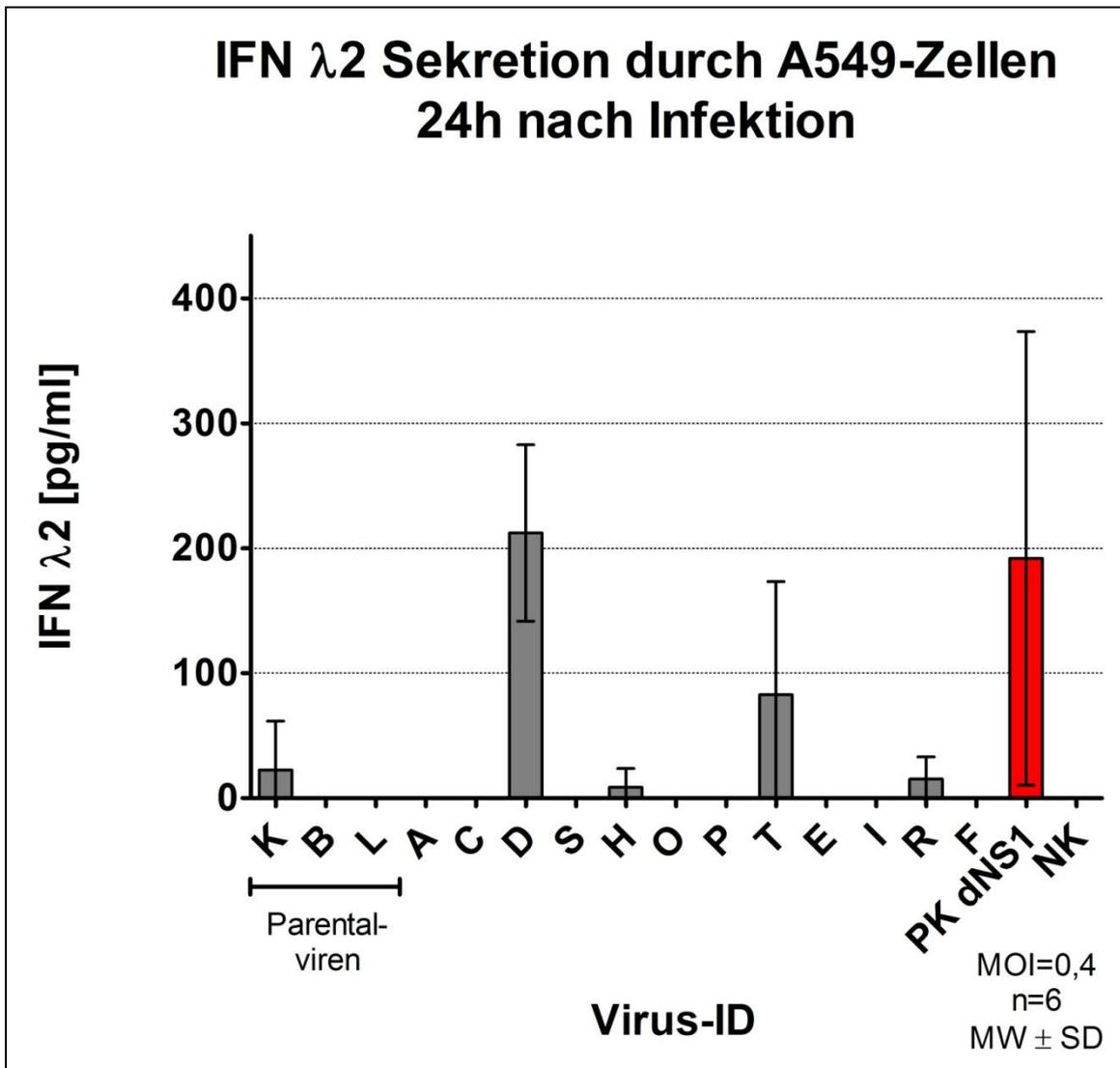
a / b: Vergleich der Viren a und b;  
**K, B, L**: humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus;  
x  $\nearrow$  y: nach Segmentaustausch Steigerung der IFN- $\beta$  Sekretion von x auf y;  
x  $\searrow$  y: nach Segmentaustausch Absinken der IFN- $\beta$  Sekretion von x auf y;  
ns: nicht signifikant;  
\*: signifikant,  $p \leq 0,05$ ; \*\*: signifikant,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*: signifikant,  $p \leq 0,001$

#### 4.6.2 Sekretion von IFN- $\lambda$ 2

Die Konzentration des IFN- $\lambda$ 2 im Zellkulturüberstand infizierter A549-Zellen bzw. nicht infizierter Zellen (NK) ist in Tabelle 35 und Abbildung 18 dargestellt. Nach der Infektion der A549-Zellen mit den porcinen oder aviären Parentalviren B oder L oder den Reassortanten A, C, S, O, P, E, I oder F konnte das IFN- $\lambda$ 2 im Zellkulturüberstand nicht quantifiziert werden, da die IFN-Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten IFN- $\lambda$ 2 ELISAs lag. Auch die Quantifizierung des IFN- $\lambda$ 2 im Zellkulturüberstand der nicht infizierten Zellkontrolle (NK) war aus demselben Grund nicht möglich (Tabelle 35, Abbildung 18). Im Zellkulturüberstand der mit dem humanen Parentalvirus K oder den Reassortanten H oder R infizierten Zellen konnte eine geringe Menge des sekretierten IFN- $\lambda$ 2 nachgewiesen werden (Tabelle 35, Abbildung 18). Signifikante Unterschiede zu den Proben ohne quantifizierbare IFN- $\lambda$ 2 Konzentration waren dabei nicht feststellbar (Tabelle 36). Die Infektion der A549-Zellen mit der Reassortante T hat eine mittelmäßige IFN- $\lambda$ 2 Konzentration von etwa 80 pg pro Milliliter Überstand zur Folge (Tabelle 35). Das Maß der IFN Sekretion liegt somit zwischen der niedrigen IFN- $\lambda$ 2 Sekretion, verursacht durch die Viren K, H und R und der hohen IFN- $\lambda$ 2 Sekretion, ausgelöst durch Infektionen mit der Reassortante D und der PK dNS1, ohne dass diese Unterschiede signifikant wären (Tabelle 35, Tabelle 36, Abbildung 18). Zellen, die mit der Reassortante D infiziert wurden, zeigen eine

**Tabelle 35: IFN-λ2 Sekretion von A549-Zellen nach Infektion**

Virus-ID	IFN-λ2 Sekretion [pg/ml]	Virus-ID	IFN-λ2 Sekretion [pg/ml]
K (huH1N1)	22,6	E	0
B (poH1N1)	0	I	0
L (avH5N1)	0	R	15,2
A	0	F	0
C	0	PK dNS1	191,9
D	212,2	NK	0
S	0		
H	8,7		
O	0		
P	0		
T	82,8		



**Abbildung 18: IFN-λ2 Sekretion von A549-Zellen 24 h nach Infektion**

hohe IFN- $\lambda$ 2 Sekretion auf dem Niveau der mit A/PR/8/1934 delta NS1 (PK dNS1) infizierten A549-Zellen (Tabelle 35). Die Unterschiede in der IFN- $\lambda$ 2 Konzentration im Kulturüberstand im Vergleich zu allen anderen virusinfizierten Zellen sind deutlich und mit Ausnahme des Virus T signifikant (Tabelle 36, Abbildung 18).

**Tabelle 36: Signifikanzniveau der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion von A549-Zellen nach Infektion**

	<b>K</b>	<b>B</b>	<b>L</b>	A	C	D	S	H	O	P	T	E	I	R	F	PK dNS1
<b>K</b>																
<b>B</b>	ns															
<b>L</b>	ns	ns														
A	ns	ns	ns													
C	ns	ns	ns	ns												
D	**	**	**	**	**											
S	ns	ns	ns	ns	ns	**										
H	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns									
O	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns								
P	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns							
T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
E	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns					
I	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
R	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns									
F	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns									
PK dNS1	*	**	**	**	**	ns	**	*	**	**	ns	**	**	*	**	
NK	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	**								

**K, B, L:** humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus;

ns: nicht signifikant;

\*: signifikant,  $p \leq 0,05$ ; \*\*: signifikant,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*: signifikant,  $p \leq 0,001$

#### 4.6.2.1 Einfluss des Austausches der Oberflächenproteine HA und NA auf die IFN- $\lambda$ 2 Sekretion

Werden die Oberflächenproteine HA und NA zwischen dem humanen Parentalvirus K und den Reassortanten E und I, die porcine HA- bzw. porcine HA- und NA-Proteine tragen, ausgetauscht, so kommt es nur zu einem geringen, nicht signifikanten Abfall der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Zellen. Der Austausch des humanen gegen das porcine NA (Virus E zu I) hat keine

Veränderung der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion zur Folge (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18).

Das porcine Parentalvirus B und die Reassortanten A und C unterscheiden sich in den Oberflächenproteinen HA und NA (Tabelle 22). Trotz der genetischen Unterschiede zwischen den drei Viren ist keine Veränderung der durch sie ausgelösten IFN- $\lambda$ 2 Sekretion nachweisbar (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18).

Insgesamt betrachtet hat der Austausch der Oberflächenproteine HA und NA keine signifikanten Änderungen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Wirtszellen zur Folge.

#### **4.6.2.2 Einfluss des Austausches der Polymeraseproteine auf die IFN- $\lambda$ 2 Sekretion**

Die Reassortanten C, D, S, H, O, P und T tragen verschiedene Polymerasekomplexe und weisen aviäre Oberflächenproteine und porcine NP-, M- und NS-Segmente auf (Tabelle 22). Bei einem Vergleich der Reassortante C mit D wird deutlich, dass bereits der Austausch eines aviären PB1-Proteins die IFN- $\lambda$ 2 Sekretion deutlich und signifikant erhöhen kann (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18). Generell konnten messbare IFN- $\lambda$ 2 Konzentrationen nur bei den Reassortanten D, H und T, die neben einem aviären PB1 gleichartige, d.h. porcine, aviäre oder humane PB2 und PA-Segmente aufweisen, nachgewiesen werden. Zwischen den Reassortanten D und H, die sich in den porcinen (Virus D) und aviären (Virus H) PB2- und PA-Proteinen unterscheiden, sind die Unterschiede in der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Zellen deutlich und signifikant (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18). Im Übrigen hingegen führen einzelne Austausche im PB2- (Virus S, H, O) aber auch PA-Segment (Virus O, P, T) nicht zu signifikanten Änderungen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18).

Die Reassortanten I, R und F weisen neben den porcinen Oberflächenproteinen HA und NA humane NP-, M- und NS-, aber auch humane PB2- und PA-Segmente auf. Sie unterscheiden sich daher ausschließlich in der Herkunft des

PB1-Segments, wobei diese Unterschiede nicht zu signifikanten Änderungen in der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Wirtszellen führen (Tabelle 35, Tabelle 36, Tabelle 37, Abbildung 18).

In der Gesamtbetrachtung konnte das aviäre PB1-Protein nur zum Teil mit einer signifikant höheren IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Wirtszellen in Verbindung gebracht werden.

**Tabelle 37: Vergleich der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion nach Infektion mit generierten Viren**

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segment-austausch ... gegen ...		2. Segment-austausch ... gegen ...		Veränderung der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion		Veränderung signifikant: ns - ***
					Werte [pg/ml] und Richtung der Veränderung: $\nearrow, \searrow$	Faktor der Veränderung	
<b>K</b> / E	huHA	poHA	-	-	22,6 $\searrow$ 0	-	ns
<b>B</b> / A	poHA	avHA	-	-	beide: 0	-	ns
E / I	huNA	poNA	-	-	beide: 0	-	ns
A / C	poNA	avNA	-	-	beide: 0	-	ns
I-F-R:							
I / F	huPB1	poPB1	-	-	beide: 0	-	ns
I / R	huPB1	avPB1	-	-	0 $\nearrow$ 15,2	-	ns
F / R	poPB1	avPB1	-	-	0 $\nearrow$ 15,2	-	ns
C / D	poPB1	avPB1	-	-	0 $\nearrow$ 212,2	-	**
H-S-O:							
H / S	avPB2	poPB2	-	-	8,7 $\searrow$ 0	-	ns
H / O	avPB2	huPB2	-	-	8,7 $\searrow$ 0	-	ns
S / O	poPB2	huPB2	-	-	beide: 0	-	ns
D / P	poPB2	huPB2	-	-	212,2 $\searrow$ 0	-	**
O-P-T:							
O / P	avPA	poPA	-	-	beide: 0	-	ns
O / T	avPA	huPA	-	-	0 $\nearrow$ 82,8	-	ns
P / T	poPA	huPA	-	-	0 $\nearrow$ 82,8	-	ns
D / S	poPA	avPA	-	-	212,2 $\searrow$ 0	-	**
<b>K</b> / I	huHA	poHA	huNA	poNA	22,6 $\searrow$ 0	-	ns
<b>B</b> / C	poHA	avHA	poNA	avNA	beide: 0	-	ns
E / F	huPB1	poPB1	huNA	poNA	beide: 0	-	ns
E / R	huPB1	avPB1	huNA	poNA	0 $\nearrow$ 15,2	-	ns
A / D	poPB1	avPB1	poNA	avNA	0 $\nearrow$ 212,2	-	**
C / P	poPB1	avPB1	poPB2	huPB2	beide: 0	-	ns
C / S	poPB1	avPB1	poPA	avPA	beide: 0	-	ns
D / T	poPB2	huPB2	poPA	huPA	212,2 $\searrow$ 82,8	2,6	ns

Vergleich der Viren (Virus-IDs)	1. Segmentaustausch ... gegen ...		2. Segmentaustausch ... gegen ...		Veränderung der IFN-λ2 Sekretion		Veränderung signifikant: ns - ***
					Werte [pg/ml] und Richtung der Veränderung: ↗, ↘	Faktor der Veränderung	
D / O	poPB2	huPB2	poPA	avPA	212,2 ↘ 0	-	**
S / T	poPB2	huPB2	avPA	huPA	0 ↗ 82,8	-	ns
S / P	poPB2	huPB2	avPA	poPA	beide: 0	-	ns
D / H	poPB2	avPB2	poPA	avPA	212,2 ↘ 8,7	24,4	**
H / T	avPB2	huPB2	avPA	huPA	8,7 ↗ 82,8	9,5	ns
H / P	avPB2	huPB2	avPA	poPA	8,7 ↘ 0	-	ns
C / H	poPB1	avPB1	poPA	avPA	0 ↗ 8,7	-	ns
	poPB2	avPB2	-				

a / b: Vergleich der Viren a und b;

**K, B, L**: humanes (K), porcines (B) und aviäres (L) Parentalvirus;

x ↗ y: nach Segmentaustausch Steigerung der IFN-λ2 Sekretion von x auf y;

x ↘ y: nach Segmentaustausch Absinken der IFN-λ2 Sekretion von x auf y;

ns: nicht signifikant;

\*: signifikant,  $p \leq 0,05$ ; \*\*: signifikant,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*: signifikant,  $p \leq 0,001$

# Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte u.a. die genetische Kompatibilität zwischen humanen H1N1-, porcinen H1N1- und aviären H5N1-Inflenzaviren untersucht werden. Als humanes Parentalvirus wurde der humane H1N1-Stamm A/NewCaledonia/20/99 verwendet, der 1999 isoliert und darauffolgend als Impfstoffkomponente eingesetzt wurde. Das porcine H1N1-Isolat A/NSA/58/2007 gehört zur aviären Linie der porcinen H1N1-Viren und ist mit Inflenzaviren verwandt, die sich seit dem Ende der 1970er Jahre in der Schweinepopulation Europas verbreiteten. Als aviäres Parentalvirus wurde das hochpathogene H5N1-Isolat A/whooperswan/R65/2006 verwendet, das eine multibasische Spaltstelle im HA trägt.

## **5.1 Genetische Kompatibilität humaner H1N1, porciner H1N1 und aviärer H5N1 Influenza A-Viren**

Die Kompatibilität der Genomsegmente verschiedener Inflenzaviren im Hinblick auf den Erhalt der viralen Fitness wird sowohl durch strukturelle Abhängigkeiten, also direkte Protein-Protein-Interaktionen, als auch rein funktionelle Abhängigkeiten der Proteine bestimmt (s. Kap. 1.2.2) [84, 85, 244, 259-263]. Zu den strukturellen Abhängigkeiten gehört die direkte Interaktion der Proteine PB1 mit PB2 sowie PB1 mit PA, so dass ein heterotrimerer Polymerasekomplex gebildet wird (s. Kap. 1.2.2). Eine Störung in der Interaktion der Proteine hätte zur Folge, dass die Polymerasefunktionen beeinträchtigt wären oder es nicht zur Bildung des Polymerasekomplexes kommt. Somit wäre die Replikationsfähigkeit der Viren eingeschränkt, oder die gebildeten Reassortanten wären replikationsinkompetent [244, 259, 260, 263]. Um die Funktionsfähigkeit der Polymerasekomplexe, die aus den PB1-, PB2- und PA-Proteinen der drei in dieser Arbeit verwendeten Parentalviren zusammengesetzt sind, isoliert bewerten zu können, wurde die Polymeraseaktivität unabhängig von einer Virusreplikation untersucht (s. Kap. 4.4). Funktionelle Abhängigkeiten ohne direkte Protein-Protein-Interaktionen betreffen das Zusammenwirken der Oberflächenproteine HA und NA. Eine hohe HA-Aktivität ist verbunden mit einer hohen Bindungsfähigkeit der Viruspartikel an geeignete zelluläre Oberflächenrezeptoren, während eine hohe

NA-Aktivität zu einer hohen Spaltungsrate der zellulären Oberflächenrezeptoren und somit einer hohen Ablöserate der Virionen von der Zelloberfläche führt. Ist eine von beiden Aktivitäten im Vergleich zur anderen stark erhöht, so resultiert dies entweder in einer verminderten Ablösung neu gebildeter Viruspartikel von der Wirtszelloberfläche und Viruspartikelaggregation oder in einer geringen Anheftung von Virionen an die Zielzellen. Beide Prozesse – Anheftung und Ablösung der Viruspartikel – müssen demnach hinsichtlich ihres Aktivitätsgrades in einer Balance sein, da andernfalls die virale Fitness vermindert ist [84, 85, 261, 262]. Zusätzlich gab es in den letzten Jahren starke Hinweise, dass es vor und während des Assembly neuer Viruspartikel zur Zusammenlagerung von vRNPs kommt, wodurch eine gerichtete Verpackung der Genomsegmente in die Viruspartikel erreicht wird. Die hierfür notwendigen vRNA-vRNA Wechselwirkungen werden maßgeblich durch spezifische Verpackungssignale an den Enden der vRNA beeinflusst [264-275]. Da diese Verpackungssignale zwischen verschiedenen Influenzaviren Unterschiede aufweisen und offenbar nicht zwingend kompatibel sind, werden bei einer Koinfektion einer Wirtszelle bei der Verpackung der vRNPs bestimmte Segmentkonstellationen bevorzugt [259, 264, 269, 276, 277]. Zudem führen die genannten, notwendigen Interaktionen und Wechselwirkungen in ihrer Summe dazu, dass einige Segmentkombinationen auch mittels reverser Genetik aufgrund von Inkompatibilitäten nicht erzeugt werden können [278, 279].

### **5.1.1 Genetische Kompatibilität der Polymerase- und NP-Proteine**

Die verschiedenen Funktionen der viralen Polymerase, die in ihrer Gesamtheit erst die Neusynthese von cRNA- und vRNA-Strängen ermöglichen, werden durch drei Polymeraseproteine bereitgestellt (s. Kap. 1.2.2). Zudem ist die Interaktion der NP-Proteine mit dem PB1- und PB2-Protein für die vollständige Transkription und Replikation des viralen Genoms essentiell [89, 90, 100]. Inkompatibilitäten der Interaktionsdomänen der Polymeraseproteine und des NP-Proteins führen zu Störungen der Interaktion und somit zu Einschränkungen in der Funktion der Polymerase. Durch die isolierte Messung der Gesamt-Polymeraseaktivität (s. Kap. 3.21, 4.4) kann direkt auf das Maß

der Kompatibilität der Polymerase- und NP-Proteine von unterschiedlichen Influenzaviren geschlossen werden.

Die überwiegende Anzahl der Studien, in denen die Aktivität von (reassortierten) heterologen Polymerasekomplexen untereinander und mit den homologen Parentalvirus-Polymerasekomplexen verglichen wird, basieren auf der Kombination von Segmenten aus zwei Parentalviren [251, 259, 280-285]. Auf diese Weise kann die Polymeraseaktivität von bis zu 16 verschiedenen Polymerase-Kombinationen (aus PB1-, PB2-, PA- und NP-Proteinen) untersucht werden. Diese Studien liefern wichtige Hinweise auf Interaktionen zwischen den einzelnen Polymeraseproteinen, die sich in den unterschiedlich starken Änderungen der Polymeraseaktivität bei Austausch von Einzelsegmenten zeigen. Da jedoch die Entstehung von Triple-Reassortanten durch aufeinanderfolgende Reassortmentereignisse in der Natur nicht nur denkbar, sondern bewiesen ist, sollten in der vorliegenden Studie alle 81 Polymerase-Kombinationen bezüglich ihrer Aktivität analysiert werden, die sich aus der Kombination der Segmente von drei Parentalviren ergeben.

Die Bandbreite der Polymeraseaktivität ist in der vorliegenden Arbeit und den anderen zitierten Studien häufig sehr groß. Die Polymeraseaktivität zumindest eines homologen Parentalvirus-Polymerasekomplexes ist dabei bei vielen Untersuchungen höher oder zumindest ähnlich hoch wie die Aktivität des aktivsten (reassortierten) heterologen Polymerasekomplexes [243, 251, 259, 280, 281]. In der vorliegenden Arbeit und weiteren Studien zeigten bestimmte heterologe Polymerasekomplexe eine z.T. deutlich höhere Aktivität als die homologen Parentalvirus-Polymerasekomplexe [282-285].

In den folgenden Abschnitten sollen die zum Teil großen Auswirkungen der Einzel-Segmentaustausche im Polymerasekomplex auf die Polymeraseaktivität - auch unter Berücksichtigung von jeweiligen Interaktionspartnern - diskutiert werden. Ebenso werden mögliche Auswirkungen der Polymorphismen der einzelnen Segmente (s. Kap. 4.1, Anhang) auf die Polymeraseaktivität betrachtet:

Das PB1-Protein interagiert innerhalb des Polymerasekomplexes über seinen C-terminus mit dem PB2- und über seinen N-terminus mit dem PA-Protein [40, 41]. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes sind die Ergebnisse der

umfangreichen Polymeraseaktivitäts-Untersuchungen bezüglich des PB1-Austausches (s. Kap. 4.4.1, Tabelle 24) zu betrachten, da gezeigt werden konnte, dass das Maß der Veränderung der Polymeraseaktivität bei einem Austausch des PB1-Segments auch von der Herkunft des PB2-Segments abhängt: Wird das porcine oder humane PB1- gegen das aviäre PB1-Segment ausgetauscht, so unterscheidet sich sowohl der Faktor der Aktivitätssteigerung als auch die maximal erreichte Polymeraseaktivität zwischen Polymerasekomplexen mit aviärem, humanem oder porcinem PB2. Der höhere Faktor der Steigerung (5 – 80-fach) ist bei gleichzeitiger Existenz eines aviären PB2 gezeigt worden, ausgehend von einem sehr niedrigen Polymeraseaktivitätsniveau und ansteigend auf ein mit der PK vergleichbares Niveau (etwa 260-fache Aktivität). Demgegenüber steht ein niedrigerer Steigerungsfaktor bei humanem PB2 (5 – 15-fach), allerdings bereits ausgehend von einem mit der PK vergleichbaren Niveau auf sehr hohe Polymeraseaktivitäts-Werte (650 - 1900fache Aktivität). Im Gegensatz dazu ist bei einem gleichzeitig vorhandenen porcinen PB2-Segment eine Veränderung der Polymeraseaktivität – ausgelöst durch den Austausch des porcinen bzw. humanen PB1- gegen das aviäre PB1 – nicht belegbar. Auch der Austausch des porcinen gegen das humane PB1-Segment führt nicht zu einer veränderten Polymeraseaktivität (s. Kap. 4.4.1, Abbildung 10). Bei einer potentiellen Polymeraseaktivitätsveränderung eventuell vorhandene Abhängigkeiten von der Herkunft des PB2-Segments sind daher nicht sichtbar. Die Bedeutung der PB1-PB2-Interaktion für die Höhe der Polymeraseaktivität wurde auch in anderen Studien bewertet [243, 280, 282]. Dabei zeigte sich beispielsweise, dass die Polymeraseaktivität zwar in jedem Fall stieg, sobald ein aviäres PB1-Segment im Polymerasekomplex vorhanden war, die Höhe der Steigerung jedoch - ebenso wie in der vorliegenden Studie - vom Ursprung des PB2-Segments abhängig war [243]. Ähnliche Abhängigkeiten wurden auch in den anderen genannten Arbeiten identifiziert [280, 282]. Interessanterweise wiesen in einer Studie die Polymerasekomplexe aus aviärem H5N1-PB1 und humanem H1N1-PB2 die höchsten Polymeraseaktivitäten auf und übertrafen dabei sogar die Aktivitäten der parental Polymerasekomplexe [282]. Dieses Ergebnis weist somit deutliche Parallelen zur vorliegenden Arbeit auf. Trotz der direkten Interaktion des PB1- mit dem PA-Protein [40, 41] ist ein Einfluss der PA-Herkunft auf das Maß der durch die PB1-Austausche hervorgerufenen

Änderung der Polymeraseaktivität mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu belegen (s. Kap. 4.4.1, Abbildung 10). Offenbar liegt die Qualität der Interaktion der jeweiligen PB1- mit den jeweiligen PA-Proteinen auf einem ähnlichen Niveau. In anderen Arbeiten wurden Hinweise auf derartige Abhängigkeiten vom PA-Segment bei einem PB1-Austausch zwar identifiziert, die Effekte waren aber gering und nicht immer signifikant [243, 280, 282]. Trotz der Interaktionen der PB1- mit den NP-Proteinen wurden in der vorliegenden Arbeit keine Abhängigkeiten bei einem PB1-Austausch festgestellt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Resultaten anderer Arbeiten [243, 280].

Veränderungen der Polymeraseaktivität bei einem PB1-Austausch können nicht nur durch differierende Interaktionsbedingungen mit den unterschiedlichen PB2-Segmenten, sondern auch durch Polymorphismen verursacht werden. Für das PB1-Segment sind mehrere Polymorphismen beschrieben, die sich erhöhend oder erniedrigend auf die Polymeraseaktivität auswirken: das PB1-N40-Protein [30, 57] und die Polymorphismen L13P [201, 251], L473V [286], L598P [286] und S678N [251] (s. Anhang). Bei der Prüfung des porcinen, humanen und aviären Parentalvirus-PB1 auf die genannten Polymorphismen wurde festgestellt, dass das PB1-N40-Protein und der L13P-Polymorphismus bei allen drei Parentalviren vorhanden ist. Die Polymorphismen L598P und S678N sind hingegen in keinem der drei Parentalviren nachweisbar (s. Anhang). Diese Faktoren können somit eventuelle Unterschiede in der Polymeraseaktivität nicht erklären. Hinsichtlich des L473V-Polymorphismus unterscheiden sich die drei Viren jedoch: Während das porcine und aviäre Parentalvirus PB1-L473V aufweisen, fehlt dem humanen Virus dieses Merkmal (s. Anhang), das bezüglich der Polymeraseaktivität in Säugerzellen für das Fehlen des 627K-Virulenzfaktors auf dem PB2-Segment kompensieren soll [286]. Der 627K-Polymorphismus ist im humanen und aviären PB2-Segment vorhanden, während er im porcinen PB2 fehlt (s. Kap. 4.1, Anhang). Die beschriebenen kompensatorischen Eigenschaften von PB1-L473V [286] können anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden, da alle Polymerase-Kombinationen mit porcinem PB2 (ohne 627K; PolK 3-11; 30-38; 57-65) unabhängig vom Vorhandensein des porcinen oder aviären PB1 (mit L473V) bzw. humanem PB1 (ohne L473V) eine ähnliche, sehr niedrige Polymeraseaktivität aufweisen. Das porcine und aviäre Parentalvirus codieren

im Gegensatz zum humanen Parentalvirus für das PB1-F2-Protein (s. Kap. 4.1, Anhang), das als Virulenzfaktor beschrieben ist, bei dem ein Fehlen dieses Proteins die Polymeraseaktivität senken soll [287]. Andere Forschungsarbeiten haben jedoch gezeigt, dass der Verlust der PB1-F2-Expression keine Auswirkung auf die Polymeraseaktivität hat [57]. Bei allen übrigen Polymorphismen aus Tabelle 38 das PB1-Segment betreffend sind keine Auswirkungen auf die Polymeraseaktivität beschrieben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Austausche im PB1-Segment einen sehr deutlichen Einfluss auf die Polymeraseaktivität haben können. Die beobachteten Änderungen der Polymeraseaktivität nach PB1-Austausch wurden in der vorliegenden Arbeit sehr wahrscheinlich nicht durch bekannte PB1-Polymorphismen hervorgerufen. Sie wurden vielmehr durch unterschiedliche Kompatibilitäten der drei verschiedenen PB1- mit den PB2-Segmenten verursacht, die die Qualität der Interaktion der Proteine und somit die Polymeraseaktivität beeinflussen.

Das PB2-Protein interagiert innerhalb des Polymerasekomplexes mit dem C-terminalen Bereich des PB1-Proteins [40, 41]. Die Ergebnisse der Polymeraseaktivitäts-Untersuchungen vor und nach Austausch des PB2-Segments (s. Kap. 4.4.2, Tabelle 25) sind auch unter Beachtung dieser bekannten PB1-PB2-Interaktion zu betrachten, da gezeigt werden konnte, dass die Stärke der Änderung der Polymeraseaktivität bei einem PB2-Austausch auch von der Herkunft des PB1-Segments abhängt: Diese Abhängigkeit zeigt sich bei einem Austausch des porcinen gegen das aviäre PB2- aber auch beim Austausch des porcinen bzw. aviären PB2- gegen das humane PB2-Segment. Beeinflusst wird die Änderung der Polymeraseaktivität sowohl hinsichtlich des Faktors der Aktivitäts-Steigerung als auch der maximal erreichten Polymeraseaktivität. Nur bei gleichzeitig vorhandenem aviären PB1 erhöht sich bei einem porcini-aviären PB2-Austausch die Polymeraseaktivität um den Faktor 5 – 25 auf ein mit der PK vergleichbares Niveau. Bei vorhandenem porcinem oder humanem PB1 verharrt die Aktivität bei diesem PB2-Austausch dagegen auf einem sehr niedrigen Niveau. Deutlich höhere Steigerungen der Polymeraseaktivität und auch außerordentlich hohe

Polymeraseaktivitäts-Werte werden bei Austausch des porcinen oder aviären gegen das humane PB2-Segment beobachtet: Finden diese Austausche vor dem Hintergrund eines porcinen oder humanen PB1 statt, so beträgt der Steigerungsfaktor 10 – 150 auf PK-ähnliche Aktivitätswerte. Bei aviärem PB1 steigert sich die Polymeraseaktivität mit einem Faktor von 5 – 370 nochmals stärker und auf Werte zwischen 1000- und fast 2000-facher Aktivität – die höchsten in dieser Arbeit gemessenen Aktivitätswerte. Die beobachteten Unterschiede bei einem Vergleich der Steigerungsfaktoren sind ein Hinweis darauf, dass Änderungen der Polymeraseaktivität bei einem PB2-Austausch nicht nur durch Faktoren auf dem PB2-Segment selbst bedingt sind, sondern auch durch Interaktion der verschiedenen PB2- mit den verschiedenen PB1-Proteinen beeinflusst werden können. Derartige Interaktionen und die resultierenden Veränderungen der Polymeraseaktivität bei einem PB2-Austausch wurden auch in anderen Studien untersucht [243, 280, 282, 285]. Dabei wurde in fast allen Fällen die Abhängigkeit der Polymeraseaktivitätsveränderung bei einem PB2-Austausch von der Herkunft des PB1 bestätigt [243, 280, 282]. Die Kombination aus aviärem H5N1-PB1 und humanem H1N1-PB2 [282] bzw. bereits das Vorkommen eines humanen PB2 statt eines aviären PB2 [243, 284] führte in den genannten Studien zu sehr hohen Polymeraseaktivitäten – ein Ergebnis das auch in der vorliegenden Studie gewonnen werden konnte. Ein Einfluss der Herkunft des PA-Segmentes auf die Höhe der durch die PB2-Austausche hervorgerufenen Änderung der Polymeraseaktivität ist anhand der Ergebnisse nicht zu belegen, auch wenn die absolute Höhe der Polymeraseaktivität bei vorhandenem porcinen und aviären PA regelmäßig höher ist als bei einem humanen PA im Polymerasekomplex (s. Kap. 4.4.2, Abbildung 10). Dies steht im Einklang mit der nicht vorhandenen direkten Interaktion der PA- mit den PB2-Proteinen. Während in der vorliegenden Arbeit der Ursprung des NP-Segmentes keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der durch die PB2-Austausche hervorgerufenen Änderung der Polymeraseaktivität hat, ist die Existenz dieses Zusammenhangs in der Literatur nicht abschließend geklärt [243, 280, 282], da nur zum Teil begrenzte derartige Abhängigkeiten vermutet werden [243, 282].

Die durch einen PB2-Austausch hervorgerufenen Veränderungen der Polymeraseaktivität können einerseits durch unterschiedliche Interaktionsbedingungen mit den verschiedenen PB1-Proteinen oder

andererseits durch Polymorphismen verursacht werden. Für das PB2-Segment ist eine große Zahl von Polymorphismen beschrieben, die mit der Erhöhung oder Senkung der Polymeraseaktivität in Verbindung gebracht werden: L89V [240], E158G [288], D253N [259, 289], (T)271A [232], G309D [240], T333I [251], T339K [240], R477G [240], I495V [240], G590S [290], Q591KR [289, 290], E627K [232, 240, 242, 243], A676T [240], D701N [250, 251], S714I [250] und S714R [250, 251] (s. Anhang). Bei der Analyse des porcinen, humanen und aviären Parentalvirus-PB2 wurde festgestellt, dass die Polymorphismen L89V, G309D, R477G, I495V und A676T in allen drei Parentalviren vorhanden sind. Die Polymorphismen E158G, D253N, T333I, G590S, Q591KR, S714I und S714R konnten hingegen in keinem der drei Parentalviren nachgewiesen werden (s. Anhang). Diese Polymorphismen können somit nicht die Ursache für eventuelle Unterschiede in der Polymeraseaktivität sein. Demgegenüber unterscheiden sich die drei Viren hinsichtlich der (T)271A-, T339K- und vor allem in den häufig beschriebenen E627K- [232-248, 291] und D701N-Polymorphismen [242, 249-255]: Sowohl der (T)271A-, der nur im humanen PB2, als auch der T339K-Polymorphismus, der im porcinen und humanen PB2-Segment vorhanden ist, erhöhen laut Literatur [232, 240] die Polymeraseaktivität in humanen Zellen. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Polymeraseaktivitäts-Untersuchungen weisen alle Polymerasekomplexe mit porcinem PB2 generell nur eine sehr niedrige Polymeraseaktivität auf. Die beschriebene Wirkung des T339K-Polymorphismus kann somit anhand von aviär-porcinen PB2-Austauschen nicht bestätigt werden (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu erhöht sich bei jedem Austausch eines aviären PB2- gegen ein humanes PB2-Segment die Polymeraseaktivität - wenn auch nicht immer signifikant (s. Kap. 4.4.2, Tabelle 25, Abbildung 10). Der T339K-Polymorphismus könnte demzufolge wie in [240] angeführt einen Beitrag zur Steigerung der Polymeraseaktivität leisten. Die beschriebene [232] Wirkung des (T)271A-Polymorphismus könnte die teilweise enormen Steigerungen der Polymeraseaktivität erklären, die bei allen porcinen-humanen und aviären-humanen PB2-Austauschen in der vorliegenden Arbeit auftraten (s. Kap. 4.4.2, Tabelle 25, Abbildung 10). Der E627K-Polymorphismus konnte im humanen und aviären PB2-Segment nachgewiesen werden, nicht jedoch im porcinen (s. Kap. 4.1, Anhang). E627K führt gleichfalls zu einer Erhöhung der Aktivität der Polymerase in humanen [242]

bzw. Säugerzellen [232, 240, 243]. Der E627K-Polymorphismus leistet der angeführten Literatur zufolge sehr wahrscheinlich einen entscheidenden Beitrag für die Höhe der Polymeraseaktivität von Polymerasekomplexen mit humanem PB2 (s. Kap. 4.4.2, Abbildung 10). Warum bei Polymerasen mit aviärem PB2 dieser Effekt nicht im gleichen Maße zu beobachten ist, bleibt dagegen unklar. Dennoch kann das Fehlen von E627K im porcinen PB2-Segment möglicherweise die stets sehr niedrige Polymeraseaktivität in den betreffenden Polymerasekomplexen erklären (s. Kap. 4.4.2, Tabelle 25, Abbildung 10). Der D701N-Polymorphismus, für den ebenso eine Steigerung der Polymeraseaktivität in Säugerzellen beschrieben ist [250, 251], wurde nur im porcinen PB2 nachgewiesen (s. Kap. 4.1, Anhang). Offenbar ist das Vorhandensein dieses Virulenzfaktors im porcinen PB2-Segment jedoch nicht ausreichend, die Polymeraseaktivität der betreffenden Polymerasen über ein nur sehr geringes Aktivitätsniveau zu heben (s. Kap. 4.4.2, Abbildung 10). Alle weiteren Polymorphismen aus Tabelle 38 das PB2-Segment betreffend sind nicht als ursächlich für Änderungen der Polymeraseaktivität beschrieben.

Bei der Betrachtung aller bekannten Ergebnisse ist deutlich geworden, dass ein Austausch im PB2-Segment einen dramatischen Einfluss auf die Polymeraseaktivität haben kann. Dabei sind als Ursache das vermutlich unterschiedliche Maß der Kompatibilität der verschiedenen PB2- mit den verschiedenen PB1-Proteinen, aber möglicherweise auch einige PB2-Polymorphismen zu nennen.

Im Polymerasekomplex interagiert das PA-Protein mit dem N-terminalen Bereich des PB1-Proteins [40, 41], wodurch es Abhängigkeiten zwischen diesen Proteinen bei einem Austausch des PA-Segmentes geben könnte. In der vorliegenden Arbeit geht in jedem betrachteten Fall (s. Kap. 4.4.3, Tabelle 26) ein Austausch des humanen gegen das porcine oder aviäre PA-Segment mit einer leichten bis moderaten, teils signifikanten Steigerung der Polymeraseaktivität einher. Diese Steigerung ist jedoch unabhängig von der Herkunft des PB1-, PB2- und NP-Segments und der Faktor der Steigerung fast ausnahmslos nur im einstelligen Bereich. Die absolut erreichten Werte der Polymeraseaktivität nach PA-Austausch sind jedoch teilweise außerordentlich

hoch. In der Literatur wurde der eher geringe Einfluss der Herkunft des PA-Segmentes auf die Polymeraseaktivität bereits beschrieben [243, 282]. Daneben existieren jedoch auch Studien, in denen der Austausch des PA-Segmentes zu unterschiedlich starken Veränderungen der Polymeraseaktivität führte [280, 283], wobei die Veränderungen unabhängig von der Herkunft des PB1-Segmentes waren [280]. Interessanterweise traten hierbei [280] in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie bei Polymerasekomplexen mit einem humanem PA- statt eines aviären PA-Proteins regelmäßig geringere Polymeraseaktivitäten auf.

Der Polymorphismus im PA-Segment (T552S), der mit der Steigerung der Polymeraseaktivität von aviären Polymerasen in 293T-Zellen assoziiert ist [292], ist ausschließlich im humanen PA-Segment zu finden, nicht jedoch im porcinen und aviären PA-Segment (s. Anhang). Auch in Polymerasekomplexen, die ein aviäres PB1 und PB2 aufweisen, den „aviären Polymerasekomplexen“ im Sinne von Mehle et al. [292] also am nächsten kommen, ist keine Steigerung der Pol-Aktivität durch das T552S-tragende, humane PA-Segment festzustellen, sondern vielmehr im Gegenteil eine Steigerung, wenn dieses Segment gegen das porcine oder aviäre PA ausgetauscht wird. Bei den übrigen Polymorphismen aus Tabelle 38 das PA-Segment betreffend sind Auswirkungen auf die Polymeraseaktivität nicht bekannt.

Der errechnete Faktor der Steigerung der Polymeraseaktivität ist nach einem PA-Austausch beim Vergleich innerhalb der PolK-Gruppen 12-20, 39-47, 66-74 und 75-83 ähnlich hoch und unabhängig von Herkunft des PB1, PB2 und NP. Somit liegt der Grund für die beobachtete, meist nur leichte Steigerung der Polymeraseaktivität vermutlich nicht in einer veränderten Interaktion des PA-mit anderen Proteinen, da sonst Abweichungen in den Steigerungsfaktoren innerhalb und zwischen diesen vier Gruppen wahrscheinlich wären, sondern im PA-Protein selbst. Welcher Faktor des PA-Proteins hierfür verantwortlich sein könnte, konnte nicht identifiziert werden, da der beschriebene Polymorphismus für die Beobachtung vermutlich nicht ursächlich sein kann.

Das NP-Protein besitzt viele Interaktionspartner, darunter auch das PB1- und PB2-Protein des viralen Polymerasekomplexes [89]. Wie unter 4.4.4

beschrieben, bewirkt ein Austausch des NP-Segmentes im Kontext einer ansonsten unveränderten Polymerase-Kombination in der vorliegenden Studie in keinem Fall eine signifikante Änderung der Polymeraseaktivität. Allenfalls leichte, nicht-signifikante Änderungen sind nicht auszuschließen. Dieses Ergebnis steht damit in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Studien, die der Herkunft des NP-Proteins ebenso keinen signifikanten Einfluss auf die Polymeraseaktivität zuschreiben [243, 282, 285].

Der Polymorphismus N319K des NP-Segments, der eine Steigerung der Polymeraseaktivität in Säugerzellen verursachen soll [251, 293], ist weder im humanen, porcinen oder aviären NP-Segment vorhanden (s. Anhang). Die drei NP-Segmente sind somit bezüglich dieses Faktors identisch. Die übrigen Polymorphismen des NP-Segments (s. Anhang) haben keine Auswirkungen auf die Polymeraseaktivität.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Studie der Austausch des NP-Segments bezüglich der Polymeraseaktivität folgenlos blieb, obwohl während der Virusreplikation eine Interaktion von NP-Proteinen mit zwei Proteinen (PB1 und PB2) des Polymerasekomplexes erfolgt. Die drei NP-Proteine der verwendeten Parentalviren scheinen demzufolge zu den PB1- und PB2-Proteinen eine ähnliche hohe Kompatibilität aufzuweisen. Auch die geprüften Polymorphismen können die fehlende Veränderung der Polymeraseaktivität möglicherweise erklären.

Die Analyse der Polymeraseaktivität der drei homologen Parentalvirus-Polymerase-Kombinationen und 78 (reassortierten) heterologen Polymerase-Kombinationen zeigte, dass die Änderung der Polymeraseaktivität bei Austausch eines definierten Proteins nicht nur vom betroffenen Polymeraseprotein selbst, sondern aufgrund der vielfältigen Interaktionen zwischen den Proteinen auch von den übrigen Polymeraseproteinen abhängig ist. Die Kompatibilität der PB1-, PB2-, PA- und NP-Proteine der Parentalviren humanen, porcinen und aviären Ursprungs zueinander ist je nach Protein und ggf. Herkunft ganz offenbar unterschiedlich hoch. Zusätzlich können die inzwischen in großer Zahl beschriebenen Polymorphismen, die neben weiteren viralen Eigenschaften auch die Polymeraseaktivität beeinflussen, einen

möglichen Beitrag zur Erklärung bestimmter identifizierter Aktivitätsänderungen nach einem Austausch einzelner Segmente liefern.

Wie in der vorliegenden Arbeit vermutet und auch an anderer Stelle beschrieben [259], beschränkt die Funktionsfähigkeit der Polymerase, die auf der Interaktion der Polymeraseproteine basiert, die Generierung von Reassortanten. Wie in Kap. 5.2.2 diskutiert wird, kann dabei allerdings auch eine sehr geringe Polymeraseaktivität die Bildung replikationskompetenter Reassortanten ermöglichen. Unter den 81 untersuchten Polymerase-Kombinationen befinden sich 14, die in zu generierende Viren integriert werden sollten. Die Unterschiede speziell dieser Polymerasekomplexe werden in Kap. 5.2 detailliert und im Zusammenhang mit anderen Eigenschaften der Viren diskutiert.

### **5.1.2 Genetische Kompatibilität der Parentalviren und Generierung von Reassortanten**

Die möglichen Inkompatibilitäten zwischen den Polymerase- und den Oberflächenproteinen sowie die Tatsache, dass bei Pandemie-auslösenden Influenzavirus-Reassortanten von 1957, 1968 und 2009 in unterschiedlichem Maß die Segmente für Oberflächenproteine und Polymeraseproteine ausgetauscht wurden (s. Kap. 1.5), führten zur Überlegung, in der vorliegenden Studie die Generierung von Reassortanten zwischen porcinen, aviären und humanen Influenzaviren auf Austausch in diesen Genomsegmenten zu konzentrieren. Die meisten der zu generierenden Reassortanten sollten sich zudem nur in einem Segment von anderen Viren unterscheiden, um Veränderungen der Eigenschaften der Viren auf den Austausch eines einzelnen Segmentes zurückführen zu können (s. Kap. 4.4, 0, 4.6, 5.2, 5.3). Von den angestrebten, insgesamt 15 Reassortanten mit unterschiedlicher Genomzusammensetzung konnten 14 Reassortanten mittels reverser Genetik erzeugt werden (s. Kap. 4.3). Alle Viren, in denen lediglich das HA- und/ oder NA-Segment ausgetauscht wurde, konnten generiert werden. Dies betrifft die Reassortanten A und C mit porcine-aviären HA-/ NA-Veränderungen und die Viren E und I mit human-porcinen HA-/ NA-Austauschen. Für die Reassortanten A und E gilt demnach auch, dass die Aktivität des HA- und NA-Proteins trotz unterschiedlicher Herkunft der

Segmente in einem günstigen Verhältnis zueinander steht, das die Replikation der Viren ermöglicht. Trotz der sehr vielfältigen Kombinationen innerhalb des Polymerasekomplexes der Reassortanten D, S, H, O, P, T, R, F, U, W und N konnten bis auf die Reassortante W alle Viren erzeugt werden (s. Kap. 4.3). Die direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen den Polymeraseproteinen scheint demzufolge bei allen replikationskompetenten Reassortanten zumindest nicht sehr stark gestört zu sein.

Aufgrund der Vielzahl der erzeugbaren Reassortanten ist die Kompatibilität der genomischen Segmente zwischen dem porcinen, humanen und aviären Parentalvirus als sehr hoch zu bewerten. Einschränkend ist dabei jedoch zu beachten, dass der in der vorliegenden Studie gewählte methodische Ansatz zur Generierung der Reassortanten – die Transfektion von acht Plasmiden (s. Kap. 3.20), oft auch als *‘forced reverse genetics’* bezeichnet – häufig zu einer hohen Anzahl von verschiedenen replikationskompetenten Reassortanten führt [280, 281, 285, 294, 295]. Aus diesen Studien zu aviär-humanen Reassortanten, die ebenfalls mittels reverser Genetik erzeugt wurden, lassen sich auf Basis der meist hohen Zahl angestrebter, verschiedener Segmentkonstellationen und der nicht generierbaren Reassortanten Aussagen zur Kompatibilität der viralen Genomsegmente von aviären und humanen Viren ableiten. Bei der Reassortierung von aviären H5N1- mit humanen H3N2-Viren sind je nach Studie 70 bzw. über 80 % der Reassortanten nachweislich generierbar [280, 281]. In zwei Studien zur genetischen Kompatibilität von pandemischen H1N1 (2009)- mit aviären H9N2- [294] bzw. H5N1-Viren [285] betrug der Anteil der erzeugbaren Reassortanten sogar 90 % [294] bzw. 100 % [285]. Im Unterschied dazu waren bei der Reassortierung von humanen H3N2 und aviären H2N2-Viren nur etwa 50 % der Segmentkombinationen als Reassortante generierbar [278]. Andere experimentelle Methoden, bei denen eine Konkurrenzsituation zwischen den Genomsegmenten von Parentalviren existiert, bringen in aller Regel eine geringere Anzahl von unterschiedlichen Genomkonstellationen hervor [156, 259, 264, 276, 296-299]. Eine solche Konkurrenz von Genomsegmenten liegt beispielsweise bei einer *in vitro*- oder *in vivo*-Koinfektion von Zellen mit mindestens zwei Parentalviren oder bei einer Kotransfektion mit 16 Plasmiden vor (s. Kap. 3.20). In mehreren solcher Studien wurden aviär-humane, aviär-porcine, aviär-equine, equin-humane, human-porcine und rein humane

Reassortanten generiert [156, 259, 276, 297-305]. In Abhängigkeit der Herkunft der jeweiligen Parentalviren und der Subtypen variiert der Anteil der Reassortanten unter den wieder isolierten Viren zwischen wenigen Prozent und mehr als 25 %. Auffällig ist zudem, dass unter den Reassortanten einzelne Segmentkombinationen wesentlich häufiger auftreten als andere. Andererseits ist bei Koinfektions- und Kotransfektionsexperimenten häufig beobachtet worden, dass ein Reassortment zwischen genetisch entfernten Influenzaviren deutlich weniger replikationskompetente Reassortanten hervorbringt als dies bei genetisch nah verwandten Viren der Fall ist [259, 260, 269, 276, 278, 299, 306, 307]. Begründet wird dies neben inkompatiblen Protein-Protein-Interaktionen bzw. Proteinaktivitäten auch mit nicht kompatiblen vRNP-Verpackungssignalen zwischen genetisch entfernten Influenzaviren [264, 268, 269]. Trotz der genannten Einschränkungen aufgrund der verwendeten Methodik zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die insgesamt sehr hohe Kompatibilität der vRNP-Segmente der drei genetisch divergenten Parentalviren.

Dass die Ursache für diese hohe Kompatibilität tatsächlich nicht in einer sehr großen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der betreffenden Proteine zu suchen ist, wird deutlich, wenn die Ergebnisse der Analyse der Sequenzidentität betrachtet werden (s. Kap. 4.1). Hierbei zeigte sich, dass sich alle drei Parentalviren - und insbesondere auch das porcine und humane Parentalvirus trotz des formal gleichen H1N1-Subtyps - deutlich in der Aminosäuresequenz der Polymerase- und Oberflächenproteine unterscheiden. Somit kann eine nicht vorhandene große Ähnlichkeit auch nicht die Basis der hohen genetischen Kompatibilität der Segmente sein.

Die Ursachen der Nicht-Generierbarkeit der Reassortante W im Rahmen von drei unabhängigen Versuchen sind sehr wahrscheinlich nicht in einer ungünstigen HA-/ NA-Aktivitäts-Balance zu suchen, da fünf andere Reassortanten mit gleicher HA-NA-Zusammensetzung (I, R, F, U, N) erzeugbar und replikationsfähig waren (s. Kap. 4.3). Auch die PB1-PB2-Interaktion sollte uneingeschränkt möglich sein, da bei Virus W beide Segmente porcinen Ursprungs sind und zudem in dieser Konstellation auch im Parentalvirus B und den replikationskompetenten Reassortanten A, C und N zu finden sind. Die Interaktion des PB1 und PA könnte hingegen prinzipiell gestört sein, da das

PB1-Segment porcinen, das PA-Segment humanen Ursprungs ist. Zu beachten ist allerdings, dass die identische PB1-PA-Kombination auch die Reassortante F trägt, die generiert werden konnte (s. Kap. 4.3). Wie in Kap. 5.2.2 ausgeführt wird, könnte eine Störung der Protein-Protein-Interaktion im Polymerasekomplex dennoch verantwortlich für die Nicht-Generierbarkeit der Reassortante W sein, da die Polymeraseaktivität der dem Virus W entsprechenden vollständigen Polymerase-Kombination nur geringfügig über der Negativkontrolle liegt (s. Kap. 4.4). Auch in der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Generierung von Reassortanten durch die Bildung eines funktionalen Polymerase-Heterotrimer limitiert ist [259]. Ebenso sind gestörte vRNP-vRNP Interaktionen, die eine Verpackung eines vollständigen Satzes von acht Genomsegmenten in die Viruspartikel verhindern, prinzipiell denkbar [269]. Einige Studien beschreiben ebenso die Nicht-Generierbarkeit von einzelnen, definierten Reassortanten und machen, wie auch in der vorliegenden Arbeit vermutet, die Inkompatibilität der Genomsegmente von Influenzaviren aus verschiedenen Wirten hierfür verantwortlich [278, 279]. Die genauen virologischen Ursachen, weshalb Reassortante W nicht generiert werden konnte, sind mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig zu identifizieren. Obwohl eine Funktionsstörung im Polymerasekomplex oder bei den vRNP-vRNP Interaktionen wahrscheinlich scheint, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Reassortante prinzipiell erzeugbar ist, dies jedoch im Rahmen dreier Versuchsansätze nicht erfolgt ist.

Im Vergleich zu den experimentell erzeugten Reassortanten kommen, soweit bekannt, in der Natur insgesamt betrachtet nur wenige verschiedene Reassortanten mit unterschiedlichen Segmentkombinationen vor [187, 188, 190, 308-313]. Als Ursache für die Diskrepanz zwischen der Anzahl experimentell generierbarer und natürlich vorkommender Reassortanten kommen verschiedene Aspekte in Betracht: Für die natürliche Entstehung einer Reassortante ist die Koinfektion eines Wirtes mit zwei verschiedenen Influenzaviren zwingend notwendig. Die Häufigkeit solcher Koinfektionen in den Wirtspopulationen zeigt demnach, wie wahrscheinlich das Vorliegen dieser Grundvoraussetzung überhaupt ist. Betrachtet man die Häufigkeit der Koinfektionen beim Menschen, so betrug der Anteil der mit zwei verschiedenen Influenza A-Virusstypen infizierten Personen unter allen Influenza-positiv getesteten in Deutschland in den zehn Influenzasaisons 2005/06 bis 2014/15

zwischen 0 % und rund 0,4 % [314]. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit für Koinfektionen an, je ausgeglichener das Verhältnis der auftretenden, verschiedenen Influenza A-Subtypen (H1N1 (saisonal/ ab 2009 pandemisch) und H3N2) in der humanen Population ist. In Untersuchungen zur Häufigkeit des Vorkommens von zwei oder mehr verschiedenen Influenzavirus-Subtypen in Schweinebeständen zeigte sich, dass im Jahr 2013 von über 400 Influenzavirus-positiv beprobten Schweinebeständen in ca. 7 % der Betriebe zwei Virussubtypen und in über 1 % drei Virussubtypen nachweisbar waren [315]. Diese Daten zeigen, dass die geringe Häufigkeit von Koinfektionen bzw. der Kozirkulation verschiedener Viren in Tierbeständen die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Reassortanten deutlich begrenzt. Dabei ist vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen, porcinen und aviären Parentalviren zu bedenken, dass die Häufigkeit von Doppelinfektionen mit Viren verschiedener Ursprungswirte vermutlich noch geringer ist. Kommt es dennoch zur Koinfektion eines Wirtes und zur Bildung von Reassortanten, so stehen diese in Konkurrenz zu den Parentalviren. Ein Influenzavirus mit einer neuen Segmentkombination wird sich im betreffenden Wirt allerdings nur dann durchsetzen können, wenn es hinsichtlich der viralen Fitness und der Replikation im Wirtsorganismus keine Nachteile gegenüber den Parentalviren aufweist. Die virale Fitness wird wie bereits diskutiert auch durch die Kompatibilität der Genprodukte der Segmente beeinflusst, also die funktionelle HA-NA-Balance und die Interaktion der Polymeraseproteine. Dabei besteht bei jeder Neukombination von Segmenten das Risiko, dass die Proteine nicht oder nur suboptimal kompatibel bzw. in ihrer Kombination nicht an den Wirt angepasst sind. Ferner werden Reassortanten aufgrund der bereits diskutierten vRNA-vRNA-Wechselwirkungen in der koinfizierten Zelle nicht der statistischen Wahrscheinlichkeit nach gebildet. Vielmehr entstehen aufgrund inkompatibler vRNA-Verpackungssignale Parentalviruspartikel bevorzugt bzw. es werden Reassortanten mit bestimmten Segmentkonstellationen mit größerer Wahrscheinlichkeit erzeugt [264, 269, 270]. Alle drei Faktoren, die geringe Wahrscheinlichkeit einer Koinfektion, die virale Fitness neugebildeter Reassortanten unter Konkurrenzbedingungen und die bevorzugte Bildung von Parentalviren bzw. wenigen, definierten Reassortanten tragen sehr wahrscheinlich zu der – im Vergleich zu durch reverse Genetik generierbaren – geringen Zahl aus der Natur isolierter Reassortanten bei.

## **5.2 Eigenschaften von humanen, porcinen und aviären Parentalviren und deren Reassortanten**

### **5.2.1 Replikation in humanen A549-Zellen**

Um das Replikationsverhalten der einzelnen, genetisch definiert zusammengesetzten Parentalviren und Reassortanten untersuchen zu können, wurden je Ansatz die Zellen nur mit einem der in Tabelle 22 aufgeführten Viren infiziert. Diese Situation entspricht somit der Infektion eines Wirtes mit einem definierten Virus ohne Konkurrenz durch die jeweiligen Parentalviren oder andere Reassortanten. Das Ereignis der natürlichen Entstehung der Reassortanten und die darauffolgenden initialen Replikationszyklen wurden somit in dieser Arbeit nicht modellhaft untersucht, da hierfür die Zellkulturansätze mit den Parentalviren und ggf. mehreren Reassortanten infiziert werden hätten müssen. Im Folgenden soll zunächst diskutiert werden, ob sich das ähnliche Replikationsverhalten (s. Kap. 4.5.1) von einigen Parentalviren und Reassortanten in der genetischen Zusammensetzung, in einer ähnlichen CPE-Charakteristik oder der Höhe der Polymeraseaktivität und der IFN-Sekretion infizierter Zellen widerspiegelt.

Das humane H1N1- (Virus K), das porcine H1N1- (Virus B) und das aviäre H5N1-Parentalvirus (Virus L) weisen keinerlei identische genomische Segmente auf (Tabelle 22). Zufälligerweise zeigen die drei Viren zwischen 12 h und 36 h p.i. eine ähnliche Replikationsrate (Abbildung 11). Der dennoch höhere Endtiter des porcinen H1N1-Parentalvirus (Virus B) könnte seine Ursache im deutlich verzögerten Einsetzen des CPE im Vergleich zum humanen H1N1- (Virus K) und aviären H5N1-Parentalvirus (Virus L) haben (Tabelle 30), da in den weitgehend intakten infizierten Wirtszellen über einen längeren Zeitraum neue Viruspartikel gebildet werden können. Obwohl die Polymeraseaktivität der drei Parentalviren zwischen sehr niedrig (porcines Parentalvirus; Virus B) und mittelmäßig (aviäres Parentalvirus, Virus L) variiert (Abbildung 10), wirkt sich offenbar die sehr geringere Polymeraseaktivität nicht nachteilig auf die Replikation des porcinen H1N1-Parentalvirus aus. Da die IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 2 Sekretion durch virusinfizierte Zellen bei allen drei Parentalviren einheitlich sehr niedrig bis niedrig ist (Abbildung 17, Abbildung

18), sind die geringen Unterschiede als Ursache für die beobachteten, leichten Titerunterschiede wenig wahrscheinlich.

Die porcine-aviäre Reassortanten A, C, D, S und H weisen ein aviäres HA- und fast alle auch ein aviäres NA-Protein auf. Die NP-, M- und NS-Segmente sind porcinen Ursprungs. Obwohl sie sich in der Zusammensetzung des Polymerasekomplexes aus aviären und porcinen Polymeraseproteinen unterscheiden (Tabelle 22), zeigen alle Reassortanten ein ähnliches anfängliches Replikationsverhalten zw. 12 h und 36 h p.i. (Abbildung 11). Die beobachteten Unterschiede in der CPE-Charakteristik (Tabelle 30) tragen wahrscheinlich zu den höheren Endtitern der Reassortanten mit vollständigem porcinen Polymerasekomplex (Virus A und C) gegenüber den Reassortanten D, S und H, die alle ein aviäres PB1 und teils weitere aviäre Polymerasesegmente aufweisen, bei. Auch die leichten Variationen in der sehr niedrigen bzw. niedrigen Polymeraseaktivität zwischen den Reassortanten A, C, D, S und H könnten möglicherweise zu den beobachteten leichten Unterschieden in den Replikationsverläufen führen (Abbildung 10). Obwohl die IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda 2$  Sekretion der durch die Viren A, C, D, S und H infizierten Zellen sehr unterschiedlich und für Reassortanten mit aviärem PB1 zum Teil sehr hoch ist (Abbildung 17, Abbildung 18), spiegelt sich diese Beobachtung in den dennoch ähnlichen Replikationsverläufe nicht wider. Der Zusammenhang zwischen der IFN-Sekretion und dem Replikationsverhalten wird an anderer Stelle weitergehend diskutiert.

Die Reassortanten P und O weisen genetische Ähnlichkeiten zu den eben diskutierten Reassortanten D und S auf und unterscheiden sich von diesen nur im humanen PB2-Segment (Tabelle 22). Der Austausch dieses Segmentes hat jedoch eine starke Änderung im Replikationsverhalten und der CPE-Charakteristik sowie der Polymeraseaktivität zur Folge: Während bei den Reassortanten mit einem humanen PB2-Segment (Virus P und O) eine hohe Polymeraseaktivität, ein sehr früher CPE und insgesamt eher schlechte Replikationseigenschaften festgestellt wurden, waren bei den genetisch ähnlichen Reassortanten mit porcinem PB2 (Virus D und S) eine niedrige Polymeraseaktivität, ein eher später CPE und gleichzeitig gute bis sehr gute Replikationseigenschaften zu beobachten (Abbildung 10, Tabelle 30, Abbildung 11). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Segmentaustausch und den

deutlich veränderten Eigenschaften erscheint daher wahrscheinlich. Die diskutierten Viren mit humanem PB2-Segment (Virus P und O) zeigen nach anfänglich starker Replikation bereits ab 24 h p.i. eine starke Abnahme der Replikationsrate. Diese stark verminderte Bildung neuer Viruspartikel ab 24 h p.i. ist sehr wahrscheinlich aufgrund der Zellschädigungen zu beobachten, die sich in einem außerordentlich frühen (24 h p.i.) und sehr starken CPE manifestieren. Auffällig ist, dass die beiden Reassortanten P und O, die als einzige das beschriebene CPE-Bild zeigen, Polymerasekomplexe mit der höchsten in dieser Arbeit gemessenen, über 1500-fachen Polymeraseaktivität aufweisen. Daher ist auch ein Zusammenhang zwischen diesen viralen Eigenschaften anzunehmen.

Die Reassortante T ähnelt in ihrer genetischen Zusammensetzung den eben diskutierten Reassortanten mit aviärem PB1 und humanem PB2 (Viren O und P) (Tabelle 22). Das im Gegensatz zu Virus O und P bei Reassortante T vorhandene humane PA-Segment ist daher für die Unterschiede zwischen den drei Reassortanten verantwortlich: Obwohl der CPE bei Reassortante T im Vergleich später eintritt und der Zellzustand somit eine bessere Replikation erlauben würde, repliziert Virus T bereits von Beginn an nur schlecht (Tabelle 30, Abbildung 11). Ein Grund hierfür ist möglicherweise die Hemmung der viralen Replikation durch die vergleichsweise sehr hohe IFN- $\beta$ , bzw. immerhin mittelmäßige IFN- $\lambda 2$  Sekretion (Abbildung 17, Abbildung 18). Die Polymeraseaktivität der Reassortante mit humanem PA (Virus T) ist zwar niedriger als die der Reassortanten O und P, aber in der gemessenen Höhe kein Grund für eine schlechte Replikation (Abbildung 10).

Die Reassortanten E, I, R und F unterscheiden sich in der Herkunft des PB1-Segmentes und im humanen bzw. porcinen NA-Protein (Tabelle 22). Im Vergleich der Viren ist das aviäre PB1-Segment für die gesteigerte Polymeraseaktivität der Reassortante R im Vergleich zu den Reassortanten I und F verantwortlich (Abbildung 10). In der Ausprägung des CPE und der Induktion der Interferone ähneln sich alle vier Viren (Tabelle 30, Abbildung 17, Abbildung 18). Da sie auch ein ähnliches Replikationsverhalten aufweisen, bietet die erhöhte Polymeraseaktivität der Reassortante mit aviärem PB1 (Virus R) ihr demzufolge keinen Vorteil für die Replikation (Abbildung 11).

Ein Zusammenhang zwischen der Polymeraseaktivität, den Replikationseigenschaften und der CPE-Charakteristik von Viren erscheint aufgrund der bisherigen Betrachtungen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich. Dabei ist der Zusammenhang zwischen der Replikation und dem CPE leicht erklärbar, da eine starke Zellschädigung die Möglichkeit der Viren zur Replikation einschränkt und tendenziell eher niedrige Virustiter zur Folge hat. Ein Einfluss der IFN-Sekretion auf andere Merkmale ist hingegen bisher nicht eindeutig zu belegen. Eine detaillierte Diskussion der Eigenschaften der Viren und der Einflüsse untereinander erfolgt am Ende des Kapitels 5.2.1.2.

#### **5.2.1.1 Austausch von Genomsegmenten führen zu veränderten viralen Eigenschaften**

In den folgenden Abschnitten soll betrachtet werden, bei welchen Segmentaustauschen sich Änderungen in den untersuchten viralen Eigenschaften ergeben. Durch die Segmentaustausche sind potentiell Protein-Protein-Interaktionen verändert und die Reassortanten tragen unterschiedliche Virulenzfaktoren und Polymorphismen.

Das porcine H1N1-Parentalvirus (Virus B) und die beiden porcin-aviären Reassortanten A und C unterscheiden sich genetisch lediglich im porcinen bzw. aviären HA- und NA-Segment (Tabelle 22). Das Replikationsverhalten der Reassortanten A und C, die ein aviäres HA (Virus A) oder ein aviäres HA und NA (Virus C) tragen, ist untereinander sehr ähnlich, jedoch signifikant besser als die Replikation des Parentalvirus B (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 12). Zudem lösen beide Reassortanten A und C in den infizierten Zellen einen früheren und insgesamt etwas stärkeren CPE im Vergleich zum porcinen Parentalvirus B aus. Das humane HA-Segment ist hierbei für die Veränderung der Eigenschaften verantwortlich, da die Änderungen bereits bei einem einfachen Austausch des porcinen gegen das aviäre HA-Segment auftreten (Parentalvirus B zu A). Das porcine und aviäre HA-Protein unterscheidet sich in mehreren Virulenzfaktoren: an den Aminosäurepositionen 190 und 225, die als relevant für die Rezeptorspezifität von H1-Viren beschrieben sind (s. Anhang) [171-

176] sowie in der monobasischen bzw. multibasischen HA0-Spaltstelle (s. Kap. 4.1, Anhang) [61-68]. Die multibasische Spaltstelle des aviären HAs, die eine Spaltung des HA0-Proteins bereits durch intrazelluläre Proteasen ermöglicht, verschafft den Reassortanten A und C dabei möglicherweise einen Vorteil bei der Replikation im Zellkultursystem. Die genannten, aber zusätzlich möglicherweise auch nicht näher identifizierte Unterschiede im HA-Protein sind sehr wahrscheinlich verantwortlich für die signifikanten Replikationsunterschiede zum Parentalvirus B. Weitergehende Änderungen der viralen Eigenschaften bei zusätzlichem Austausch des porcinen gegen das aviäre NA-Segment (Virus A und C) wurden nicht beobachtet, obwohl das porcine und aviäre NA-Protein sehr wahrscheinlich unterschiedlich starke Fähigkeiten zur Spaltung von  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren aufweisen [80-83]. Auch trotz einer Deletion in der NA-Stielregion des aviären NA-Proteins, die mit einer verminderten Freisetzung von Viruspartikeln von der Wirtszelle in Verbindung gebracht wird [258], änderte sich das Replikationsverhalten nicht.

Das humane H1N1-Parentalvirus (Virus K) und die human-porcinen Reassortanten E und I unterscheiden sich in einem oder zwei Oberflächenproteinen (Tabelle 22). Dabei weist die Reassortante E ein porcines HA-, die Reassortante I ein porcines HA- und NA-Protein auf. Das humane Parentalvirus K zeigt ein deutlich besseres Replikationsverhalten (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 11) und verursacht einen deutlicher ausgeprägten CPE (s. Kap. 4.5.2, Tabelle 30) als die beiden Reassortanten. Das porcine und humane HA unterscheidet sich an mindestens zwei Aminosäurepositionen (190, 225), die mit der Rezeptorspezifität der H1-Viren assoziiert sind (s. Anhang) [171-176]. Da die HA-Proteine unterschiedlicher Wirtsspezies häufig Unterschiede bezüglich des Bindungsverhaltens an  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche der Zielzellen aufweisen und sich das humane Parentalvirus K und die Reassortante E ausschließlich im humanen bzw. porcinen HA-Protein unterscheiden, ist die signifikant bessere Replikation des Parentalvirus K (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 13) wahrscheinlich zu einem gewissen Grad auf die bessere Bindungsfähigkeit des humanen HA-Proteins an die humanen A549-Lungenzellen zurückzuführen. Die Reassortante E mit humanem NA-Protein zeigte im Replikationsverlauf eine signifikant leicht bessere Replikation als die Reassortante I mit porcinem NA (s. Kap. 4.5.1,

Abbildung 13). Ursache hierfür könnten Unterschiede bezüglich der Spaltung von  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren sein, da bekannt ist, dass auch Neuraminidasen zwischen  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren differenzieren und Neuraminidasen porciner und humaner Herkunft diesbezüglich differieren können [80-83].

Ein Austausch des HA-Segments führte in allen untersuchten Fällen zu einer deutlichen und signifikanten Änderung des Replikationsverhaltens der Viren. Das aviäre HA-Protein in einem ansonsten porcinen Virus ermöglichte hierbei eine Steigerung der Replikationskompetenz. Wird in einem vollständig humanen H1N1-Virus das HA-Protein gegen das porcine HA-Protein ausgetauscht, so verminderte sich die Replikationsfähigkeit hingegen. Austausche im NA-Protein führten, wenn überhaupt erkennbar, nur zu sehr geringen Änderungen der Replikation.

Trotz des Austausches des porcinen gegen das aviäre PB1-Segment zeigen die beiden Reassortanten C und D eine ähnliche, sehr niedrige Polymeraseaktivität und ein durchaus ähnliches Replikationsverhalten (Tabelle 22, Abbildung 10, Abbildung 11). Bei den PB1-Polymorphismen, die mit Änderungen in der Replikation assoziiert sind, handelt es sich um die Proteine PB1-F2 [57] und PB1-N40 [30, 57] sowie die Polymorphismen PB1-F2-N66S [55, 56] und L473V [286] (s. Anhang). Bezüglich dieser Polymorphismen gibt es zwischen dem porcinen und aviären PB1-Segment jedoch keinen Unterschied. Die sehr geringen Unterschiede in der Replikation zwischen den Reassortanten C und D (s. Kap. 4.5.1) basieren somit wahrscheinlich nicht auf diesen bekannten Polymorphismen, sondern vermutlich auf Unterschieden in der Interaktion zwischen dem jeweiligen PB1- und PB2- bzw. PA-Protein.

Weitere PB1-Segmentaustausche wurden zwischen den Reassortanten I, R und F vorgenommen (Tabelle 22). Die Polymeraseaktivität der Reassortanten I und F ist sehr gering, unabhängig davon, ob sie ein humanes oder porcines PB1-Segment aufweisen. Wird das humane oder porcine PB1 jedoch gegen das aviäre PB1-Segment (Virus R) ausgetauscht, so erhöht sich die Polymeraseaktivität (Abbildung 10). Die unterschiedliche Aktivität der Polymerase der Reassortanten I und F im Vergleich zu Virus R führt dabei aber

nicht zu signifikanten Unterschieden im Replikationsverlauf (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 11) und der CPE-Charakteristik der Viren (s. Kap. 4.5.2, Tabelle 30). Im Hinblick auf beschriebene Polymorphismen codieren das porcine und das aviäre PB1 für das vollständige PB1-F2 Protein, nicht jedoch das humane PB1. Das Fehlen dieses Proteins ist aber mit einer Ausnahme [57] meist nicht mit einer Änderung im viralen Replikationsverhalten korreliert [20, 53]. Das PB1-N40 Protein hingegen, das einen Einfluss auf die Virusreplikation haben kann, wird von allen drei parental PB1-Segmenten gebildet. Das porcine und aviäre PB1-Segment unterscheiden sich vom humanen PB1 zwar im Vorhandensein des PB1-L473V Polymorphismus (s. Anhang), dennoch sollte dieser Unterschied keinen Beitrag zu Replikationsunterschieden leisten, da dieser Polymorphismus bezüglich der viralen Replikation nur als kompensatorische Mutation für das Fehlen des PB2-627K Virulenzfaktors [286] beschrieben ist, das humane PB2 der Viren I, R und F den Faktor 627K jedoch aufweist. Das Ergebnis der Betrachtung der Polymorphismen für das PB1-Segment steht somit im Einklang mit dem nahezu identischen Replikationsverhalten der Reassortanten I, R und F, die sich nur im PB1-Segment unterscheiden (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 15).

Austausche im PB2-Segment erfolgten zwischen den Reassortanten S, H und O (Tabelle 22). Die Reassortanten H mit aviärem PB2 und S mit porcinem PB2 weisen ein sehr ähnliches Replikationsverhalten auf, das sich lediglich in der anfänglich höheren Replikationsrate von Virus H gegenüber S unterscheidet (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14). Die Reassortante O mit humanem PB2 zeigt im Vergleich zu Virus H und S zwar ebenfalls eine starke Replikation bis 24 h p.i., danach sinkt die Replikationsrate jedoch drastisch ab, so dass es zunächst kaum zu einer weiteren Virusvermehrung und gegen Ende des Replikationsverlaufes zu einer Abnahme des Virustiters kommt (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14). Diese großen und signifikanten Unterschiede korrelieren mit den beobachteten Unterschieden in der CPE-Charakteristik und der Polymeraseaktivität: Die Reassortanten mit porcinem und aviärem PB2 (Virus S und H) lösen in infizierten Zellen hinsichtlich Stärke und Zeitpunkt einen sehr ähnlichen CPE aus. Im Gegensatz dazu tritt der CPE in mit Virus O (humanes PB2) infizierten Zellen früher und deutlich stärker auf (s. Kap. 4.5.2, Tabelle 30). Die Polymeraseaktivität der drei Reassortanten unterscheidet sich

sehr deutlich und z.T. signifikant (s. Kap. 4.4, Abbildung 10). Der Polymerasekomplex von Virus S mit einem porcinen PB2-Segment zeigt nur eine sehr geringe Aktivität, die Polymerase von Virus H mit aviärem PB2 eine demgegenüber erhöhte, aber immer noch eher geringe Aktivität. Die Reassortante O mit humanem PB2 im Polymerasekomplex zeigt hingegen eine sehr hohe Polymeraseaktivität mit einem signifikanten Unterschied zu Virus S und H (s. Kap. 4.4, Abbildung 10). Ein Zusammenhang zwischen Polymeraseaktivität, Replikationsverhalten und CPE-Charakteristik erscheint hierbei wahrscheinlich, wobei sich eine sehr hohe Polymeraseaktivität negativ auf das Replikationsverhalten auswirkt, wenn nicht nur die ersten 24 h p.i. betrachtet werden. Von den insgesamt 14 Polymorphismen des PB2-Segments, für die ein direkter Einfluss auf das Replikationsverhalten von Influenzaviren beschrieben ist (s. Anhang), gibt es bei den vier Faktoren (T)271A, T339K, E627K und D701N Aminosäureunterschiede zwischen dem porcinen, humanen und aviären PB2-Segment. Der Polymorphismus 271A, der nur im humanen PB2 zu finden ist, soll nicht nur die Replikationseffizienz, sondern auch die Polymeraseaktivität steigern [232]. Während die Erhöhung der Polymeraseaktivität experimentell nachvollzogen werden kann (s. Kap. 4.4, Abbildung 10), kann die Steigerung der Replikationskompetenz über den gesamten Replikationsverlauf von 72 h nicht gezeigt werden. Die Polymorphismen T339K (porcines und humanes PB2), D701N (porcines PB2) und E627K (aviäres und humanes PB2) sind als Erhöhend für die Replikationsrate in humanen bzw. Säugerzellen beschrieben [236, 240, 246, 248, 250] (s. Kap. 4.1, Anhang). Das Virus H mit aviärem PB2 zeigt im Vergleich zu S (porcines PB2) eine anfänglich höhere Replikationsrate, die zwar zu einem signifikant höheren Titer 24 h p.i. führt, im Übrigen aber ein sehr ähnliches Replikationsverhalten (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14). Grund dafür könnte sein, dass der nicht vorhandene E627K-Polymorphismus im porcinen PB2 durch die Virulenzfaktoren T339K und D701N kompensiert wird, wie bereits in der Literatur beschrieben [240, 242]. Die Polymorphismen T339K und E627K im humanen PB2 wirken sich nicht erhöhend auf die Replikation von Virus O aus, da die Virusvermehrung vermutlich durch den starken CPE 24 h p.i. deutlich reduziert wird. Das insgesamt ähnliche Replikationsverhalten der Reassortanten S und H mit porcinem und aviärem PB2 spiegelt sich in den geringen Unterschieden der CPE-Ausprägung und der

Polymeraseaktivität wieder. Auch bezüglich der analysierten Polymorphismen konnten keine Unterschiede festgestellt werden, die deutliche Abweichungen in der Replikation hätten vermuten lassen. Die z.T. sehr deutlichen Unterschiede im Replikationsverhalten zwischen der Reassortante O mit humanem PB2 und den Reassortanten S und H lassen sich sowohl mit einer stark unterschiedlichen CPE-Charakteristik als auch sehr großen Unterschieden in der Polymeraseaktivität in Verbindung bringen. Dabei sind die Unterschiede in der Polymeraseaktivität möglicherweise auch durch entsprechende Polymorphismen verursacht. Sicher ist, dass die Ursachen für alle beobachteten Unterschiede auf dem humanen PB2-Segment oder in der Interaktion des humanen PB2-Proteins mit zellulären Faktoren bzw. mit dem aviären PB1-Protein zu suchen sind.

Der Austausch des porcinen gegen das aviäre PA-Segment zwischen den Reassortanten D und S hat auf die Höhe der bei beiden Viren niedrigen Polymeraseaktivität keine Auswirkungen (Tabelle 22, Abbildung 10). Auch das Replikationsverhalten ist trotz des PA-Segmentaustausches ähnlich. Lediglich die im Vergleich etwas stärkere Abnahme der Replikation der Reassortante S mit aviärem PA ab 36 h p.i., die mit einem deutlichen CPE ab 36 h p.i. einhergeht, führt am Ende des Replikationsverlaufs zu einem signifikant niedrigeren Virustiter der Reassortante mit aviärem PA (Virus S) (Abbildung 14). Hinsichtlich der drei Polymorphismen des PA-Segments, die mit Änderungen der Replikation oder der Virulenz assoziiert sind - PA-X [316], T552S [292] und K615NR [251] (s. Anhang) – konnte zwischen dem porcinen und aviären PA-Segment kein Unterschied identifiziert werden. Die geringen Unterschiede im Replikationsverhalten der Reassortanten D und S (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14) sind demzufolge wahrscheinlich nicht auf bekannte Polymorphismen, sondern vermutlich auf Unterschiede in der Interaktion der Polymeraseproteine PB1 und PA zurückzuführen.

Werden die viralen Eigenschaften weiterer Reassortanten mit Austauschen im PA-Segment analysiert, so ist auffällig, dass auch die beiden Reassortanten O und P mit aviärem und porcinem PA sich in ihrem Replikationsverhalten, der Polymeraseaktivität und der CPE-Charakteristik sehr ähneln (Tabelle 22, Abbildung 10, Abbildung 11, Tabelle 30). Wird das aviäre PA (Virus O) oder

porcine PA (Virus P) jedoch gegen das humane PA in der Reassortante T ausgetauscht, so ändert sich das Replikationsverhalten, die Polymeraseaktivität und die CPE-Charakteristik: Die Polymeraseaktivität der Reassortante mit humanem PA (Virus T) ist signifikant geringer, kann aber immer noch als hoch angesehen werden (s. Kap. 4.4, Abbildung 10). Die Reassortante T zeigt im Vergleich zu Virus O und P zudem bereits von Beginn an eine niedrige Replikationsrate, die auch später kaum ansteigt, so dass die Unterschiede zu O und P ab 24 h p.i. meist signifikant sind (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14). Das Virus T mit humanem PA löst in infizierten Zellen einen im Vergleich schwächeren CPE und diesen etwas später aus (s. Kap. 4.5.2, Tabelle 30). Die niedrigen Titer des Virus T sind also nicht die Folge eines frühen, starken CPEs wie bei den Reassortanten O und P, sondern offenbar durch eine insgesamt niedrige Replikationskompetenz verursacht. Für einen einzigen Polymorphismus des PA-Segments - T552S - ist die Verstärkung der Virusreplikation beschrieben (s. Anhang) [292]. Diesen Faktor trägt lediglich das humane PA-Segment – das porcine und aviäre PA-Segment weisen diesen Polymorphismus nicht auf. Eine aufgrund des Polymorphismus mögliche Steigerung der Replikation der Reassortante T gegenüber den Viren O und P trat nicht ein, sondern die Reassortante T zeigte im Gegenteil ein deutlich schlechteres Replikationsverhalten (s. Kap. 4.5.1, Abbildung 14), selbst wenn nur die ersten 24 h im Replikationsverlauf betrachtet werden. Das humane PA-Segment der Reassortante T ist ganz offensichtlich dafür verantwortlich, dass sich ein grundsätzlich anderes Bild des Replikationsverhaltens und des CPE sowie Unterschiede in der Polymeraseaktivität ergeben als bei den sehr ähnlich aufgebauten Reassortanten O und P. Während bei den Reassortanten O und P ein Zusammenhang zwischen der außerordentlich hohen Polymeraseaktivität, dem starken und frühen CPE und der insgesamt eher schwachen Replikation vermutet werden kann, ist dies bei Virus T in dieser Form nicht zu beobachten. Vielmehr scheint die Replikationskompetenz der Reassortante T aus anderen Gründen eingeschränkt zu sein. Möglicherweise spielen Unterschiede in der Interaktion des PB1- mit dem PA-Protein oder gestörte vRNP-vRNP Interaktionen, die eine Verpackung eines vollständigen Satzes von acht Genomsegmenten in die Viruspartikel verhindern, eine Rolle.

### **5.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Replikation und weiteren viralen Eigenschaften**

Die Auswertung der Versuchsergebnisse lieferte Hinweise auf Zusammenhänge zwischen dem Replikationsverhalten und dem CPE, den Polymorphismen und der Polymeraseaktivität. Im Folgenden sollen diese Zusammenhänge detailliert diskutiert werden.

In Bezug auf den Replikationsverlauf der Viren und des beobachteten CPE als Maß für die Zellschädigung wurden eindeutige Zusammenhänge festgestellt. Dabei schwächt ein früher und starker CPE die Replikation frühzeitig ab und verhindert so das Erreichen eines hohen Virustiters im Lauf der Replikation. Dies ist beispielsweise bei der starken Abnahme der Replikationsrate der Viren P und O ab 24 h p.i., und damit zu dem Zeitpunkt, ab dem ein außerordentlich früher und sehr starker CPE beobachtet wurde, festzustellen. Ganz offensichtlich verringern die sehr starken Zellschädigungen die Möglichkeiten der Viren zur Replikation in den infizierten Zellen. Tritt ein stark ausgeprägter CPE dagegen erst zu einem späten Zeitpunkt 48 h oder 72 h p.i. auf, so erlaubt dies eine lange Phase mit einer hohen viralen Replikationsrate und damit das Erreichen hoher oder sehr hoher Virustiter, wie am Beispiel der Reassortanten A, C, D, S und H erkennbar ist. Gegenseitige Rückkopplungseffekte zwischen Virusreplikation und Zellschädigung sind wahrscheinlich und erklärbar, da eine hohe Replikationsrate in unterschiedlich langen Zeiträumen zu einem starken CPE führt, der den weiteren starken Anstieg des Virustiters verhindert. Gleichzeitig ist eine über weite Teile des Replikationszeitraumes auftretende geringe Replikation nicht immer Folge eines frühen und starken CPE, wie an dem Replikationsverlauf und der CPE-Charakteristik der Reassortanten E, I, R, F und mit Einschränkungen auch des Virus T sichtbar ist. Die Ursachen für eine geringe Replikationsrate können demzufolge ebenso in einer geringen viralen Fitness, verursacht beispielsweise durch Inkompatibilitäten viraler Proteine oder vRNP-Verpackungssignale oder durch die Inkompatibilität von viralen Proteinen und Wirtsfaktoren, liegen. Eine niedrige Replikationsrate tritt häufig zusammen mit einem schwachen CPE auf, wobei der Zellzustand zwar eine stärkere Virusreplikation erlauben würde, diese aus anderen Gründen als der Zellschädigung jedoch nicht auftritt.

Im Gegensatz zu dem Zusammenhang zwischen dem Replikationsverhalten und dem CPE ist ein Einfluss der bekannten und in Tabelle 38 beschriebenen Polymorphismen auf die Replikation nur in äußerst beschränktem Maße nachweisbar. Bei dem Virulenzfaktor, bei dem ein Einfluss auf das Replikationsverhalten wahrscheinlich ist, handelt es sich um die multibasische Spaltstelle des aviären HA0-Proteins, die vermutlich für die unterschiedliche Replikation der Reassortanten A und auch C gegenüber dem Virus B verantwortlich ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Replikation der Viren K ggü. E sowie E ggü. I zeigen auch, dass die Rezeptorspezifität des HA- bzw. NA-Proteins für  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren möglicherweise einen Einfluss auf den Replikationsverlauf hat. In der großen Mehrzahl der betrachteten Replikationsverläufe ist hingegen kein Zusammenhang zwischen vorhandenen Polymorphismen und der Replikation gefunden worden. Dies trifft beispielsweise auf die Deletion in der NA-Stielregion (Virus A ggü. C) und die Polymorphismen PB2-271A (Viren S, H und O sowie D, H und T) und T552S im humanen PA-Segment (Virus T ggü. O und P, sowie T ggü. D und H) zu. Die Auswirkung des prominenten Virulenzfaktors E627K im aviären PB2-Protein auf die Replikation von Reassortante H im Vergleich zu Virus S bleibt unklar, da es im porcinen PB2-Segment, das die E627K nicht aufweist, beschriebene kompensatorische Polymorphismen gibt, die das Fehlen der E627K ausgleichen könnten (T339K, D701N) [240, 242]. Für die PB1-Polymorphismen ist ein Einfluss auf die Replikation nicht nachprüfbar, da keine relevanten Unterschiede in den Polymorphismen zwischen den verschiedenen PB1-Segmenten identifiziert werden konnten (Viren I, R, F sowie C ggü. D). Mögliche Ursachen für die deutliche Diskrepanz zwischen der in der Literatur beschriebenen Wirkung von Polymorphismen auf das Replikationsverhalten und den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit liegen höchstwahrscheinlich in der isolierten Betrachtung der Polymorphismen und Virulenzfaktoren in der Literatur. Dabei unterscheiden sich die hinsichtlich ihrer Eigenschaften miteinander verglichenen Viren meist nur in einem Polymorphismus, wohingegen das übrige virale Genom identisch ist. Es scheint daher plausibel, dass die jeweilige Wirkung eines Polymorphismus oder Virulenzfaktors nicht isoliert betrachtet werden darf, da diese offensichtlich bis auf wenige Ausnahmen sehr wahrscheinlich durch den

genetischen Hintergrund und damit auch die Segmentkonstellation moduliert wird.

Die sehr großen Unterschiede in der Polymeraseaktivität, die von sehr niedriger (Viren B, A, C) bis zu sehr hoher Aktivität (Viren P, O) reicht, lassen die Frage nach einem Einfluss auf das Replikationsverhalten aufkommen (s. Kap. 4.4, Abbildung 10). Festzustellen ist dabei zunächst, dass sich das ähnliche Replikationsverhalten der Viren A, B, C, D und S einerseits sowie der Reassortanten P, T, R und O andererseits auch in jeweils geringen Unterschieden bezüglich der Polymeraseaktivität widerspiegelt. Parallel dazu wurden bei einigen Viren nach einem Austausch von ein bis zwei Genomsegmenten deutliche Unterschiede im Replikationsverhalten und zeitgleich sehr große Unterschiede in der Polymeraseaktivität identifiziert. Dies betrifft die Reassortante S mit sehr geringer Polymeraseaktivität und einer guten Replikation und das Virus O mit sehr hoher Polymeraseaktivität und einem schlechten Replikationsverhalten. Ebenso weist die Reassortante D eine sehr geringe Polymeraseaktivität und zeitgleich eine hohe Replikationskompetenz auf, während die Reassortante T eine hohe Polymeraseaktivität und eine sehr schlechte Replikation zeigt. Eine Ausnahme stellt hier die hohe Polymeraseaktivität der Reassortante R gegenüber den genetisch ähnlichen Viren K, E, I und F dar, die für die grundlegend bereits schlechte Replikationskompetenz dieser Reassortante offenbar nicht weiter nachteilig ist. Aufgrund der genannten Beobachtungen erscheint ein Zusammenhang zwischen der Polymeraseaktivität und dem Replikationsverhalten sehr wahrscheinlich. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist ersichtlich, dass Influenzaviren mit sehr geringer oder geringer Polymeraseaktivität oftmals eine sehr gute Replikationskompetenz aufweisen (Viren A, B, C, D und S). Andererseits zeigen andere Viren mit geringer Polymeraseaktivität in nicht wenigen Fällen ein schlechtes Replikationsverhalten (Viren F, E und I). Aufgrund dieser Beobachtungen wird deutlich, dass eine niedrige Polymeraseaktivität nicht zwingend ein Nachteil für die virale Replikation sein muss. Die wenigen Viren, die eine Polymeraseaktivität mittlerer Höhe zeigen, weisen gleichzeitig eine gute und sehr gute Replikation auf (Virus H und L). Im Gegensatz dazu zeigen alle Reassortanten mit hoher oder sehr hoher Polymeraseaktivität (Viren P, T, R und O) ein im Vergleich mit anderen Parentalviren und Reassortanten

schlechteres Replikationsverhalten. Dies ist möglicherweise ein Hinweis, dass es bei einer zu hohen Polymeraseaktivität offenbar zu Effekten kommt, die nachteilig für die Replikation der Viren sind. Damit stehen zunächst ein großer Teil der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Zusammenhänge zwischen der Polymeraseaktivität und dem Replikationsverhalten im Widerspruch zu in der Fachliteratur bereits beschriebenen Auswirkungen der Höhe der Polymeraseaktivität auf die Replikation: Dabei hat eine niedrige Polymeraseaktivität meist eine schlechte Replikationsfähigkeit zur Folge [242, 280, 281] und eine hohe Polymeraseaktivität führt zu einem guten Replikationsverhalten [250, 251, 281, 282]. Vor dem Hintergrund der Versuchsergebnisse, dass die Viren H und L mit mittlerer Polymeraseaktivität eine gute und sehr gute Replikation zeigen, sowie aufgrund von Hinweisen aus der Fachliteratur, dass eine optimale und nicht zwingend eine hohe Polymeraseaktivität für eine effiziente Replikation [244, 259] oder hohe Pathogenität [251] vorteilhaft ist, müssen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch wie folgt interpretiert werden: Unter den Viren mit geringer Polymeraseaktivität wiesen einige gute und andere schlechte Replikationseigenschaften auf, wodurch sich zeigt, dass eine niedrige Aktivität nicht nachteilig sein muss und die Polymeraseaktivität nicht der einzige Faktor ist, der die Replikationseigenschaften der Viren beeinflusst. Die Viren H und L scheinen eine Polymeraseaktivität in einer Höhe aufzuweisen, die optimal und somit vorteilhaft für eine hohe Replikationskompetenz ist. Da demgegenüber alle Viren mit sehr hoher Polymeraseaktivität eine schlechte Replikation aufweisen, ist diese Höhe der Aktivität als nicht mehr optimal und damit nachteilig für die virale Fitness zu betrachten. Ein möglicher Mechanismus, wie eine suboptimale, hohe Polymeraseaktivität die virale Replikation einschränkt, könnte mit der angeborenen Immunantwort der Zelle auf eine Virusinfektion in Zusammenhang stehen. Danach führt eine hohe Polymeraseaktivität in der virusinfizierten Zelle zur Synthese großer Menge viraler ssRNA und, als Zwischenstufe während der Replikation (s. Kap. 1.2.3), doppelsträngiger RNA. In der Folge wird das angeborene Immunsystem der Zelle früh bzw. stark aktiviert und es kommt u.a. zur Sekretion von Interferonen. Dadurch wird in der infizierten Zelle und in umliegenden Zellen ein antiviraler Status etabliert, der die Replikation der Viren hemmt (s. Kap. 1.6). Untermauert wird die Annahme eines solchen Prozesses durch Li et al. [282], die eine starke

Polymeraseaktivität mit einer großen Menge intrazellulär detektierbarer viraler RNA und einer hohen Cytokinexpression in Zusammenhang bringen konnten. Für die Auswertung der gemessenen Polymeraseaktivität in Bezug auf weitere virale Merkmale wie die Replikation ist einschränkend zu beachten, dass die verwendete Methode der Polymeraseaktivitätsmessung die RNA-Synthese in einem artifiziellen System bewertet (s. Kap. 3.21). Zudem liefert sie keine Aussage zum Verhältnis der viralen Transkriptions- und Replikationsprodukte. Dies ist jedoch durchaus von Relevanz, da gezeigt werden konnte, dass ein ungünstiges Verhältnis der Transkription zur RNA-Replikation die Virusreplikation empfindlich stören kann [251].

Auf möglicherweise vorhandene Korrelationen zwischen der IFN-Sekretion infizierter Wirtszellen 24 h p.i. und dem Replikationsverhalten bis zu diesem Zeitpunkt sowie weiterer Eigenschaften der untersuchten Viren wird in Kapitel 5.3 eingegangen.

## **5.2.2 Polymeraseaktivität generierter Viren**

14 der 81 untersuchten Polymerase-Kombinationen (PolK), die aus den Polymeraseproteinen und dem NP-Protein humanen, porcinen oder aviären Ursprungs zusammengesetzt sind, sollten in zu generierende Viren integriert werden (Tabelle 22, Tabelle 23). Die Polymerasekomplexe der erfolgreich generierten Viren U (PolK 13) und L (PolK 83) weisen eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Polymeraseaktivität auf (Tabelle 23, Abbildung 10). Eine demgegenüber höhere bzw. deutlich höhere Polymeraseaktivität zeigen die PolK der ebenfalls generierten Reassortanten T (PolK 69) und R (PolK 70) bzw. P (PolK 66) und O (PolK 72). Der Mehrzahl der generierten Viren trägt jedoch einen Polymerasekomplex, deren Polymeraseaktivität geringer als die der PK ist: Virus F (PolK 16), die Viren E, I und K (PolK 43), Virus D (PolK 57) und Virus H (PolK 81). Trotz der sehr geringen Polymeraseaktivität von 3,3 (PolK 3 der Viren A, B, C) bzw. 4,6 (PolK 4 des Virus N) bzw. 8,6 (PolK 63 des Virus S) (Tabelle 23) konnten die Viren mittels reverser Genetik generiert werden (Tabelle 22). Da sowohl die Versuche zur Polymeraseaktivität als auch die Virusgenerierung in HEK 293T-Zellen stattfanden, sind die Bedingungen und Ergebnisse der Polymeraseaktivitätsversuche auf die der Virusgenerierung übertragbar. Somit

konnte gezeigt werden, dass auch Viren mit nur sehr geringer Polymeraseaktivität prinzipiell replikationsfähig sind. Die Unterschiede in der Polymeraseaktivität zwischen der Negativkontrolle (NK) und den PolK 3, 4 und 63 sind zwar nicht signifikant (Daten nicht gezeigt), aber biologisch ganz offensichtlich dennoch relevant. Ein möglicher Grund für die nicht erfolgreiche Generierung von Virus W könnte die Polymeraseaktivität der entsprechenden Polymerase-Kombination (PolK 7) von lediglich 1,1 (Tabelle 23) sein. Sie liegt sehr nahe an der Polymeraseaktivität der Negativkontrolle von 1,0 und somit noch unter der Polymeraseaktivität von 3,3 (PolK 3) von Viren, die erfolgreich generiert werden konnten (Viren A, B, C). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Die generierten Viren, die sich in einem bis drei viralen Genomsegmenten voneinander unterscheiden, weisen insgesamt z.T. deutliche und signifikante Unterschiede in der Polymeraseaktivität auf (Tabelle 27). Die Ergebnisse der vergleichenden Betrachtung wurden zusammen mit anderen Versuchsergebnissen in Kapitel 5.2.1 diskutiert. Ob und inwieweit eine niedrigere oder höhere Polymeraseaktivität den Influenzaviren einen Vorteil bei der Replikation in humanen A549-Zellen bietet oder ein Nachteil ist, wurde ebenfalls in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

### **5.3 Angeborene Immunantwort der Wirtszelle nach Infektion mit Parentalviren und Reassortanten**

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach einer Infektion mit Parentalviren oder generierten Reassortanten sollte anhand der Interferon-Sekretion von infizierten Zellkulturen analysiert werden. Die Sekretion der Interferone ist die Folge der Erkennung wirtsfremder Strukturen durch die Wirtszelle und bewirkt in der sekretierenden Zelle und umliegenden Zellen einen antiviralen Status, der die Replikation von Viren erschwert:

Zunächst erkennen spezielle Rezeptoren der Zelle, PRRs (*pattern recognition receptors*) genannt, definierte, bei Pathogenen häufig vorkommende Strukturen (PAMPs; *pathogen associated molecular pattern*). Zu den PRRs gehören u.a. membranassoziierte TLRs (*Toll-like receptors*), cytoplasmatische

NLRs (*NOD-like receptors*) und die ebenfalls intrazellulär vorkommenden RLRs (*RIG-I-like receptors*) RIG-I und MDA5. Verschiedene TLRs erkennen virale ssRNA [317, 318], dsRNA [319] oder virale nicht methylierte DNA [320]. Werden diese PAMPs detektiert, kommt es über eine Signalkaskade zur Induktion der Typ I – Interferon-Gene [321-323]. Auch die NLRs erkennen eine große Zahl wirtsfremder Strukturen, wobei die Bindung an diese im Cytoplasma erfolgt. Die Helikasen RIG-I und MDA5 detektieren intrazellulär vorkommende dsRNA [324, 325], RIG-I zudem 5'-triphosphorylierte c- und vRNA [326]. Dies führt ebenfalls zur Induktion der Typ I IFN-Gene und zur Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems [118, 325-330]. Durch die Erkennung von PAMPs durch PRRs werden nur wenige Gene, darunter die Typ I IFN-Gene, direkt induziert. Die sekretierten Typ I Interferone binden jedoch auto- und parakrin an ihre Rezeptoren und führen über eine Signalkaskade zur Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs). Viele dieser Genprodukte haben eine direkte antivirale Wirkung oder sind selbst Cytokine [209]. Beispielsweise aktiviert OAS (2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase) eine Endoribonuklease, die unspezifisch die Degradierung viraler und zellulärer RNA bewirkt. Die PKR (Proteinkinase R) inhibiert die zelluläre und virale Translation, und das Protein MxA (Orthomyxovirus resistente GTPase) hemmt die virale Replikation [209, 331, 332]. Auf diese Weise werden die IFN-stimulierten Zellen in einen antiviralen Status versetzt, der die virale Replikation inhibiert [209]. Die sekretierten Typ I Interferone wirken darüber hinaus aktivierend auf dendritische Zellen und natürliche Killerzellen [210-212].

Für eine effiziente Replikation in der Wirtszelle haben Influenzaviren Strategien entwickelt, um die Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems zu hemmen oder der antiviralen Wirkung zu entgehen. Das zelluläre RIG-I Protein induziert nach Aktivierung die Transkription von Typ I-IFN-Genen. Das NS1-Protein der Influenza A-Viren kann die Expression der Typ I-Interferone inhibieren, indem es über die Interaktion mit TRIM25 die Aktivierung des RIG-I verhindert und Transkriptionsfaktoren, die die Transkription der Typ I-IFN-Gene stimulieren, hemmt [117, 121, 123, 213-218]. Durch die Inhibition der Typ I-IFN-Expression wird auch die Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) gehemmt. Zusätzlich kann das virale NS1 die Aktivität einiger interferon-induzierter Genprodukte, wie die der OAS und PKR, auch direkt beeinflussen [119, 219-222].

In der Literatur ist beschrieben, dass H5-Influenzaviren und humane saisonale Influenzaviren in dem Maß der Cytokinsekretion variieren, die sie bei der Infektion von Wirtszellen auslösen. Demnach führt die Infektion mit aviären H5N1-Isolaten in vitro zu einer stärkeren Sekretion von Typ I Interferonen als dies bei der Infektion mit humanen saisonalen Isolaten zu beobachten ist [333]. Auch für H5N1-Stämme, die aus humanen Proben isoliert wurden, konnte z.T. eine gegenüber humanen saisonalen Influenzaviren erhöhte IFN-Sekretion festgestellt werden [334, 335]. Das dies für die humanen H5N1-Isolate nicht in jedem Fall gilt und die Interferon-Sekretion auch nur ein ähnlich geringes Maß wie bei saisonalen Isolaten erreichen kann, zeigte eine Untersuchung von Zeng et al. [336]. Im Gegensatz zur Studie von Ocana-Macchi et al. [333] löste das in der vorliegenden Arbeit verwendete aviäre H5N1-Isolat (Parentalvirus L) in vitro keine stärkere IFN-Sekretion aus als das untersuchte humane saisonale H1N1-Isolat (Parentalvirus K) (Abbildung 17, Abbildung 18). Auch das porcine H1N1-Isolat (Parentalvirus B) verursachte eine ähnlich niedrige IFN-Sekretion. Die Ursache für die teils gegensätzlichen Beobachtungen zur Höhe der zellulären IFN-Sekretion nach Infektion mit aviären aber auch humanen H5N1-Isolaten im Vergleich zu humanen saisonalen Influenzaviren könnte in den unterschiedlichen verwendeten Virusisolaten der verschiedenen Studien zu suchen sein. Auf die in dieser Arbeit generierten Reassortanten und die durch sie ausgelöste IFN-Sekretion infizierter Zellen wird in nachfolgenden Abschnitten dieses Kapitels detailliert eingegangen.

In einer vielbeachteten Studie von Seo et al. [337] wurde beschrieben, dass einige H5N1-Isolate nicht interferonsensitiv seien und somit ihre Replikation durch IFN nicht inhibiert wird. Da die genannte Arbeit jedoch fehlerhaft war, wie inzwischen gezeigt werden konnte [338], ist diese Aussage nicht länger uneingeschränkt aufrecht zu erhalten. Vielmehr konnte inzwischen in nachfolgenden Studien gezeigt werden, dass Typ I Interferone die Replikation von H5N1-Isolaten in unterschiedlichem Maß hemmen können und somit antiviral wirksam sind [336, 339]. Bezüglich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Parentalviren ist keine Aussage zur Interferonsensitivität möglich, da alle Parentalviren, also auch das aviäre H5N1-Isolat, die IFN-Sekretion der Wirtszellen wirksam inhibieren können und auch vergleichsweise gut replizieren (Abbildung 11, Abbildung 17, Abbildung 18). Die Reassortanten

D und H hingegen, die aviäre Oberflächenproteine HA und NA sowie ein aviäres PB1-Segment tragen (Tabelle 22), konnten in dieser Arbeit in vitro trotz einer z.T. sehr hohen IFN-Sekretion sehr gut replizieren (Abbildung 11, Abbildung 17, Abbildung 18). Die Replikation dieser Reassortanten scheint demnach von den Interferonen nicht effizient inhibiert zu werden. Auf weitere Reassortanten wird in nachfolgenden Abschnitten dieses Kapitels eingegangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Sekretion von IFN  $\beta$  und IFN  $\lambda 2$  nach Infektion mit Parentalviren und Reassortanten analysiert. Neben IFN- $\beta$  werden auch mehrere IFN- $\alpha$ -Isotypen sowie IFN- $\epsilon$ , - $\kappa$  und - $\omega$  zu den Typ I Interferonen gezählt. Sie binden an den gleichen Rezeptor und zeigen wie beschrieben eine antivirale Wirkung [223-225]. Für die IFN- $\lambda 1$ , - $\lambda 2$  und - $\lambda 3$ , die zu den Typ III-IFN zählen, wird z.T. eine den Typ I-Interferonen ähnliche Funktion diskutiert [226-228]. Ihr Rezeptor wird jedoch nur in speziellen Geweben wie Epithelien exprimiert [228, 229].

Wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben kommt es im Anschluss an eine Infektion der Zellen mit den Parentalviren oder Reassortanten in der Mehrzahl der untersuchten Fälle zur Sekretion nur geringer Mengen IFN  $\beta$ . Die Reassortanten D, S, H, P und T, die eine höhere IFN  $\beta$ -Sekretion verursachten, weisen ausnahmslos ein aviäres PB1-, HA- und NA-Segment auf. Die höchsten Werte wurden dabei nach Infektion mit den Reassortanten D, H und T erreicht, die neben dem aviären PB1- gleichartige, d.h. humane, porcine oder aviäre, PB2- und PA-Segmente tragen.

Ein Austausch der Oberflächenproteine HA und NA führt, wie bei einem Vergleich der Viren B mit A, A mit C, K mit E und E mit I festzustellen ist, zu keiner signifikant veränderten IFN  $\beta$ -Sekretion in infizierten Zellen (Tabelle 33). Die bereits diskutierten Unterschiede im HA- und NA-Protein wie beispielsweise die multibasische Spaltstelle des aviären HA0 oder eine mögliche höhere Affinität des humanen HA und NA für die Rezeptoren der humanen Wirtszelle sind offensichtlich ohne deutlichen Einfluss auf die IFN  $\beta$ -Sekretion. Daher kann gemutmaßt werden, dass die Oberflächenproteine vermutlich auch nicht verantwortlich für die beobachtete, erhöhte IFN  $\beta$ -Sekretion nach Infektion mit den Reassortanten D, S, H, P und T sind. Im

Gegensatz dazu kommt es jedoch nach dem Austausch von Polymerasesegmenten der Viren häufig zu Veränderungen der IFN- $\beta$ -Sekretion infizierter Zellen. Wird allein das porcine durch das aviäre PB1-Segment ersetzt, so steigt die IFN- $\beta$  Sekretion der infizierten Zellen bei einem Vergleich der Reassortanten C und D deutlich und signifikant an. Bei einem Vergleich der Viren F und R bleibt sie jedoch weitgehend konstant. Erfolgt der porcin-aviäre PB1-Austausch in Kombination mit einem weiteren Segmentaustausch, erhöht sich die IFN- $\beta$  Sekretion durch infizierte Zellen tendenziell (Virus C ggü. P und S) oder signifikant (Virus A ggü. D). Eine Ursache für diese Beobachtungen könnte ein identifizierter Polymorphismus des aviären PB1-Segments sein, der in einem der folgenden Abschnitte diskutiert wird. Die Veränderungen der IFN- $\beta$  Sekretion durch infizierte Zellen sind bei einem Austausch im PB2-Segment sehr uneinheitlich. Wird das porcine oder humane PB2- durch das aviäre PB2-Segment ersetzt, so kommt es in einigen Fällen zu einer signifikanten Abnahme (Virus D und T ggü. H), in anderen Fällen zu einer signifikanten Zunahme (S, O und P ggü. H) der IFN- $\beta$  Sekretion. In den beiden Fällen, in denen das porcine gegen das humane PB2-Segment ausgetauscht wird, alle übrigen Segmente jedoch unverändert bleiben, führt dies tendenziell (Virus S ggü. O) oder signifikant (D ggü. P) zu einem Absinken der IFN- $\beta$  Sekretion. Wird parallel zum porcin-humanen PB2-Austausch ein weiteres Segment ersetzt, so schwächt sich die IFN- $\beta$  Sekretion entweder signifikant ab (Virus D ggü. O), bleibt weitgehend konstant (D ggü. T und S ggü. P) oder steigt sogar tendenziell (C ggü. P) oder signifikant (S ggü. T) an. Die Ergebnisse der Arbeit von Li et al. [282], die bei einer Reassortante mit einem aviären H5N1-PB1 und einem humanen H1N1-PB2 die stärkste IFN- $\beta$  Sekretion zeigten, konnten somit nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Bei jedem Austausch eines aviären oder porcinen gegen ein humanes PA-Segment, unabhängig davon, ob dieser einzeln erfolgt oder im Zusammenhang mit weiteren Austauschen steht, steigt die IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen signifikant an (Viren O und P ggü. T bzw. S und H ggü. T) oder bleibt zumindest annähernd konstant (Virus D ggü. T). Da jedoch an allen genannten Vergleichen die Reassortante T beteiligt ist, die die höchste IFN- $\beta$  Sekretion auslöst, sind die gezogenen Vergleiche nicht ausreichend, um eine steigernde Wirkung des humanen PA-Segments auf die IFN- $\beta$  Sekretion sicher zu belegen. Zudem verursachen die Reassortanten E, I, R und F, die ein humanes PA-Segment aufweisen, nur eine geringe IFN- $\beta$

Sekretion in infizierten Zellen. Bei der Betrachtung des porcine-aviären PA-Austausches ergibt sich ein widersprüchliches Bild: Bei einem Einzelaustausch des PA sinkt die IFN- $\beta$  Sekretion tendenziell (Virus P ggü. O) oder signifikant (D ggü. S). In Kombination mit einem weiteren Austausch nimmt sie entweder signifikant ab (Virus D ggü. O und H), steigt an (Virus C ggü. S und P ggü. H) oder bleibt weitgehend konstant (P ggü. S). Die beobachteten Veränderungen im Muster der IFN- $\beta$  Sekretion nach Austausch des PA-Segmentes lassen sich daher nicht eindeutig auf die Herkunft des PA zurückführen.

Es sind mehrere Polymorphismen bekannt, für die eine immunmodulatorische Wirkung beschrieben ist und von denen einige möglicherweise ursächlich für die beobachtete Änderung der IFN-Sekretion nach Austausch einzelner Polymerasesegmente sind (s. Anhang). Bei der Analyse der drei Parentalviren hinsichtlich der Polymorphismen PB1-F2 [52], PB1-F2-N66S [55, 56], PA-X [316], NS1-P42S [257, 340], NS1-D92E [257, 337], NS1-103F und -106M [341] sowie der NS1-‘ESEV’-Domäne [342-345] (s. Anhang) wurde die mögliche Expression des PB1-F2-Proteins als einziger Unterschied identifiziert (s. Anhang). Während das porcine und das aviäre PB1-Segment für das vollständige PB1-F2 codieren, weist das humane PB1 ein Stopp-Codon im Leserahmen auf, wodurch das Protein nicht vollständig gebildet wird. PB1-F2 zeigt vielfältige Wirkungen in der infizierten Wirtszelle (s. Anhang) und steigert in Abhängigkeit von der PB1-F2-Aminosäuresequenz u.a. die Expression von IFN- $\beta$  [52]. Dieser beschriebene Effekt des PB1-F2-Proteins könnte eine Erklärung dafür sein, dass bei der Mehrzahl der Reassortanten mit aviärem PB1 eine mittlere, hohe oder sogar sehr hohe IFN- $\beta$  Sekretion in infizierten Wirtszellen ermittelt wurde. Dennoch bleibt unklar, warum das aviäre Parentalvirus L sowie die Reassortanten O und R nur eine niedrige IFN- $\beta$  Sekretion in der Wirtszelle auslösten. Die Abhängigkeit der Steigerung der IFN- $\beta$  Sekretion von der PB1-F2 Aminosäuresequenz könnte eine Ursache dafür sein, dass das porcine PB1-F2 keine vergleichbare, hohe IFN- $\beta$  Sekretion auslösen kann wie es das aviäre PB1-F2-Protein vermag.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete veränderte IFN-Sekretion infizierter Wirtszellen nach Änderungen in der Zusammensetzung des Polymerasekomplexes der Viren lässt einen möglichen Zusammenhang zwischen Polymeraseaktivität und der IFN- $\beta$  Sekretion vermuten. Ein solcher

wurde bereits durch Li et al. [282] beschrieben: Danach lösten Reassortanten mit einer geringen Polymeraseaktivität nur eine geringe Cytokinexpression und demgegenüber Viren mit einer hohen Aktivität der Polymerase eine hohe Expression beispielsweise von TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  aus. Das Maß der Cytokinexpression konnte dabei mit der Menge der gebildeten viralen mRNA in der infizierten Zelle positiv korreliert werden [282]. Bei den Reassortanten P, T, R und O, die eine hohe oder sehr hohe Polymeraseaktivität zeigen, konnte nur im Einzelfall (Virus T) eine sehr hohe IFN- $\beta$  Sekretion festgestellt werden. Bei den übrigen Reassortanten blieb sie niedrig oder mittelmäßig. Im gegenteiligen Fall einer niedrigen (Virus F, E, I, K, D und H) bzw. sehr niedrigen Polymeraseaktivität (Viren A, B, C und S) wurden sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe IFN- $\beta$  Sekretionen infizierter Zellen detektiert. Der durch Li et al. [282] beschriebene direkte Zusammenhang zwischen der Polymeraseaktivität und der IFN- $\beta$  Sekretion kann somit durch die Ergebnisse der vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Virusreplikation in den ersten 24 h nach Infektion bzw. dem CPE 24 h p.i. und der IFN- $\beta$  Sekretion, die 24 h p.i. ermittelt wurde, zu identifizieren, können die entsprechenden Daten aus der Tabelle 28, Tabelle 30 und Tabelle 32 herangezogen werden. Dabei zeigt sich, dass bei sehr gut replizierenden Viren sowohl niedrige (Virus A und C) als auch hohe (Virus D und H) IFN- $\beta$  Sekretionslevel auftreten können. Ebenso können auch Viren mit geringer Replikationskompetenz eine niedrige (Viren E, I, R, F) oder eine hohe (Virus T) IFN- $\beta$  Sekretion auslösen. Auch wenn aufgrund der bereits diskutierten Literatur vermutet werden kann, dass eine hohe IFN-Sekretion infizierter Zellen die Virusreplikation in der Regel hemmt, so kann dieser deutliche Zusammenhang zwischen der IFN- $\beta$  Sekretion und dem Replikationsverhalten in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden. Auch der CPE, der lediglich - dann aber sehr stark - bei den Reassortanten O und P 24 h p.i. in Erscheinung trat, kann die differierenden IFN- $\beta$  Sekretionslevel nicht erklären.

Eine mittlere bzw. hohe IFN- $\lambda$ 2 Sekretion wurde nur bei Zellkulturen beobachtet, die mit den Reassortanten D oder T infiziert wurden (s. Kap. 0).

Die Viren D und T besitzen ein aviäres PB1-, HA- und NA-Segment und ein gleichartiges, d.h. porcines oder humanes, PB2- und PA-Segment. Das aviäre PB1-Segment ist dabei vermutlich nicht allein für die höhere IFN- $\lambda$ 2 Sekretion ursächlich, da einige andere Reassortanten mit einem aviären PB1 nur niedrige bzw. nicht nachweisbare IFN- $\lambda$ 2 Sekretionslevel induzieren. Auch die übrigen Parentalviren und Reassortanten verursachen in infizierten Zellen eine niedrige oder nicht nachweisbare IFN- $\lambda$ 2 Sekretion. Auffällig ist, dass eine sehr hohe IFN- $\beta$  mit einer deutlichen IFN- $\lambda$ 2 Sekretion zusammen auftritt (Virus D und T).

Alle aufgetretenen signifikanten Änderungen in der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion infizierter Zellen wurden bei Vergleichen zwischen Reassortante D und einem weiteren Virus beobachtet (Tabelle 36). Änderungen in der Sekretion des IFN  $\lambda$ 2, die zwar nicht signifikant, aber dennoch recht deutlich waren, erfolgten stets bei Virusvergleichen unter Beteiligung des Virus T. Da sich demzufolge die Analyse der Änderungen in der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion auf Vergleiche stützt, bei denen lediglich zwei Viren (Virus D und T) als Referenz dienen, ist die Aussagekraft der vergleichweisen Betrachtungen begrenzt und die Vergleiche daher wenig geeignet, um die Änderungen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion auf den Austausch bestimmter viraler Genomsegmente zurückzuführen. Trotz der genannten Einschränkungen wurde versucht, Zusammenhänge zwischen Segmentaustauschen und Änderungen der IFN  $\lambda$ 2 Sekretion zu identifizieren: Dabei zeigte sich, dass ein Austausch der Oberflächenproteine HA oder NA allein nicht zu einer signifikant veränderten IFN- $\lambda$ 2 Sekretion in infizierten Zellen führt (Tabelle 36). Demgegenüber kommt es bei Austausch der Polymerasesegmente zu signifikanten Veränderungen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion. Die Richtung und Stärke der Änderung ist jedoch bei einem gegebenen Segmentaustausch nicht einheitlich (Tabelle 36). Beispielsweise führt ein alleiniger porcine-aviärer PB1-Austausch nur bei einem Vergleich der Reassortante C mit D, nicht jedoch bei den Viren F ggü. R zu einer signifikanten Steigerung der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion. Wird das porcine gegen das aviäre PB1-Segment in Kombination mit einem weiteren Segment ausgetauscht, so resultiert dies entweder in einer signifikanten Erhöhung der Sekretion (Virus A ggü. D) oder es wurden keine Änderungen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion beobachtet (Virus C ggü. P und S). Auch für die Austausche des porcinen gegen das humane PB2-Segment wurden keine übereinstimmende

Richtung und Stärke der Änderung der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion beobachtet. Dies trifft sowohl für Einzelsegmentaustausche (D ggü. P und S ggü. O) als auch kombinierte Austausche zu (D ggü. O und T; C ggü. P; S ggü. T und P). Für das Polymerasesegment PA ergibt sich ein ähnlich uneinheitliches Bild wie für das Segment PB2. Werden beispielsweise alle porcine-aviären PA-Austausche betrachtet, so wirken diese allein entweder senkend auf die IFN- $\lambda$ 2 Sekretion (D ggü. S) oder haben keine Änderung zur Folge (P ggü. O). In Kombination mit anderen Segmentaustauschen haben sie ebenso keine Folgen (C ggü. S, P ggü. S und H) oder wirken senkend auf IFN- $\lambda$ 2 Sekretion (D ggü. O und H).

Wie bereits diskutiert, konnte unter den immunmodulatorisch wirkenden Polymorphismen lediglich die Möglichkeit der PB1-F2-Proteinexpression durch das porcine und aviäre PB1-Segment als Unterschied zwischen den Parentalviren identifiziert werden. Obwohl die Expression des viralen PB1-F2 in der infizierten Zelle vielfältige Auswirkungen hat (s. Kap. 4.1, Anhang), ist kein eindeutiger Effekt eines vorhandenen porcinen oder aviären PB1-Segments auf die IFN- $\lambda$ 2 Sekretion der Zellen erkennbar. Auffällig ist jedoch, dass vier der fünf Viren, die eine IFN- $\lambda$ 2 Sekretion in infizierten Zellen induzierten, ein aviäres PB1-Segment aufweisen und somit auch für ein vollständiges PB1-F2-Protein codieren.

In einem vorangegangenen Abschnitt dieses Kapitels wurde bereits der Zusammenhang zwischen der Polymeraseaktivität der Viren und der IFN- $\beta$  Sekretion infizierter Zellen diskutiert. Dabei wurde auch die Arbeit von Li et al. [282] zitiert, in der Reassortanten mit geringer Polymeraseaktivität eine geringe Cytokinexpression, Viren mit einer hohen Aktivität der Polymerase jedoch eine hohe Cytokinexpression induzierten. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Viren mit hoher oder sehr hoher Polymeraseaktivität (Viren P, T, R und O) keine hohe IFN- $\lambda$ 2 Sekretion festgestellt werden. Vielmehr war eine IFN- $\lambda$ 2 Sekretion entweder nicht detektierbar (Viren P und O), nur niedrig (Virus R) oder wurde maximal auf mittlerem Niveau induziert (Virus T). Im gegenteiligen Fall einer niedrigen (Virus F, E, I, K, D und H) bzw. sehr niedrigen Polymeraseaktivität (Viren A, B, C und S) wurde in den meisten Fällen keine und bei den Viren K und H eine niedrige IFN- $\lambda$ 2 Sekretion beobachtet. Die Reassortante D jedoch, die eine geringe Polymeraseaktivität aufweist, verursachte eine hohe IFN- $\lambda$ 2 Expression in infizierten Zellen. Der

von Li et al. [282] identifizierte Zusammenhang zwischen Polymeraseaktivität und IFN Sekretion konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da kein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der Polymerase und IFN- $\lambda$ 2 Sekretion besteht.

Eventuell vorhandene Zusammenhänge zwischen der Virusreplikation in den ersten 24 h nach Infektion bzw. dem CPE 24 h p.i. und der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion können anhand der Daten der Tabelle 28, Tabelle 30 und Tabelle 35 ermittelt werden. Die beiden Reassortanten, die eine mittlere bis hohe IFN- $\lambda$ 2 Sekretion in infizierten Zellen induzieren, zeigen entweder eine sehr gute (Virus D) oder eine schwache Replikation (Virus T). Unter den vielen Reassortanten mit nicht nachweisbarer IFN- $\lambda$ 2 Sekretion in infizierten Zellen finden sich ebenso Viren mit eher schwacher (Viren E, I, F) oder starker Replikation (Viren A, C, S). Wie schon für IFN- $\beta$  konnte daher anhand der vorliegenden Ergebnisse ein vermuteter Zusammenhang zwischen der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion und dem Replikationsverhalten nicht gezeigt werden. Der CPE, der ausschließlich bei den Reassortanten O und P 24 h p.i. sehr stark erkennbar war, kann die unterschiedlichen IFN- $\lambda$ 2 Sekretionslevel ebenso nicht erklären.

Die Messung der Sekretion von IFN- $\beta$  und - $\lambda$ 2 durch infizierte Zellen sollte in der vorliegenden Arbeit einen Hinweis auf das Maß der Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach einer Infektion mit Parentalviren oder generierten Reassortanten geben. Gleichzeitig ermöglichte sie das Erkennen möglicher Zusammenhänge zwischen der IFN Sekretion und dem Vorkommen definierter Genomsegmente, der Polymeraseaktivität und der Virusreplikation. Die überwiegende Zahl der in dieser Arbeit untersuchten Parentalviren und Reassortanten induzieren in infizierten Zellen die Sekretion nur geringer Mengen IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 2. Dies zeigt, dass die Viren zumeist in der Lage sind, die zelluläre Sekretion der IFN als Antwort auf die virale Infektion wirksam zu hemmen. Durch die Analyse der Änderungen in der zellulären IFN- $\beta$  und auch IFN- $\lambda$ 2 Sekretion nach Austausch von viralen Genomsegmenten konnte für das HA- und NA-Segment, aber auch für die Polymerasesegmente PB2 und PA kein Einfluss identifiziert werden. Ein Zusammenhang zwischen dem aviären PB1-Segment einiger Reassortanten und einer häufig erhöhten Sekretion von IFN- $\beta$

und in geringerem Maße auch IFN- $\lambda$ 2 erscheint zwar möglich, ist aber nicht eindeutig. Auch ein Einfluss der Polymeraseaktivität auf die IFN-Sekretion, wie er in der Literatur beschrieben wurde [282], kann anhand der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sowohl für die IFN- $\beta$  als auch IFN- $\lambda$ 2 Sekretion nicht bestätigt werden. Wird das Replikationsverhalten der Viren in den ersten 24 h nach Infektion und die jeweilige IFN- $\beta$  und - $\lambda$ 2 Sekretion analysiert, lässt sich auch hier kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Replikation und IFN Sekretion herstellen. Bemerkenswert sind hier dennoch die porcine-aviären Reassortanten D und H, die aviäre Oberflächenproteine HA und NA sowie ein aviäres PB1-Segment tragen (Tabelle 22): Über den gesamten Replikationsverlauf hinweg betrachtet konnte gezeigt werden, dass diese Reassortanten sehr gut replizieren, obwohl sie offenbar in vitro die IFN-Sekretion nicht inhibieren konnten, was sich in der z.T. sehr hohen IFN-Sekretion der Zellen widerspiegelt (Abbildung 11, Abbildung 17, Abbildung 18). Warum die Replikation dieser Reassortanten nicht effizient inhibiert werden konnte, bleibt unklar. In der Literatur wird die sehr starke Induktion der Interferonexpression durch einige H5-Isolate als eine Ursache der hohen Pathogenität in Form schwerer Krankheitsverläufe und einer hohen Mortalität diskutiert [335]. Die Fähigkeit der beiden Reassortanten, trotz einer hohen IFN-Sekretion sehr gut zu replizieren, ist daher in die Risikobewertung zum möglichen pandemischen Potential von Reassortanten zwischen porcinen H1N1 und aviären H5N1-Viren einzubeziehen.

#### **5.4 Auswirkungen von Polymorphismen auf die Eigenschaften von Parentalviren und Reassortanten**

Die Auswirkungen von Polymorphismen auf die Polymeraseaktivität, das Replikationsverhalten und den CPE sowie die IFN-Sekretion infizierter Wirtszellen, aber auch die Wirkung von Virulenzfaktoren auf die Pathogenität werden in der Literatur sehr häufig nur vergleichend an Viren untersucht, die sich ausschließlich in diesem Merkmal unterscheiden, ansonsten jedoch genetisch identisch sind. Änderungen der Eigenschaften der Viren können somit zwar auf diesen Polymorphismus oder Virulenzfaktor zurückgeführt werden, jedoch bleiben funktionale Zusammenhänge zwischen dem betreffenden Faktor und anderen genetischen Merkmalen des Virus bzw. des

Wirtes unberücksichtigt. Obwohl die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Reassortanten genetisch unterschiedlich zusammengesetzt sind und sich eben nicht nur in den Polymorphismen, sondern in ganzen Genomsegmenten unterscheiden, wurde das Vorhandensein bekannter Polymorphismen geprüft, um die beobachteten mit den publizierten Änderungen der viralen Eigenschaften vergleichen zu können.

Dabei ergab sich, dass bezüglich der Replikationseigenschaften die beschriebene Wirkung von definierten Polymorphismen nur in äußerst beschränktem Maße anhand der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Für die multibasische Spaltstelle des aviären HA0-Proteins konnte ein sehr wahrscheinlicher Einfluss auf das Replikationsverhalten gezeigt werden (s. Kap. 5.2.1). Auch die Rezeptorspezifität des HA, die für H1-Viren unter anderem durch die Aminosäurepositionen HA-190 und -225 determiniert wird, hat eine mögliche Wirkung auf die Replikation (s. Kap. 5.2.1). Demgegenüber konnte in der Mehrzahl der analysierten Replikationsverläufe kein Zusammenhang zwischen Polymorphismen und dem Replikationsverhalten gefunden werden. Dies trifft beispielsweise auf eine Deletion in der NA-Stielregion und die Polymorphismen PB2-271A und PA-T552S zu. Auch die Auswirkung des prominenten Polymorphismus E627K im aviären PB2-Protein auf die Replikation bleibt unklar (s. Kap. 5.2.1).

Im Hinblick auf beobachtete Änderungen der Polymeraseaktivität konnte die Wirkung einiger Polymorphismen nachvollzogen werden. So ist für die Faktoren PB2-271A und PB2-E627K eine Erhöhung der Polymeraseaktivität beschrieben, wobei dies mit einigen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung gebracht werden konnte (s. Kap. 5.2.2, 5.2.1). Auch der PB2-T339K-Polymorphismus könnte, wie in der Literatur beschrieben, in einigen Fällen für die Steigerung der Polymeraseaktivität mitverantwortlich sein (s. Kap. 5.2.2). Nicht bestätigt werden konnte hingegen die publizierte Wirkung der Polymorphismen PB1-L473V, PB2-D701N und PA-T552S auf die Polymeraseaktivität (s. Kap. 5.2.2).

Ein Faktor, der einen großen Einfluss auf die Interferonsekretion infizierter Zellen haben kann, ist das PB1-F2-Protein. Die in der Literatur beschriebene,

steigernde Wirkung des PB1-F2 auf die IFN Sekretion ist dabei möglicherweise für die Induktion einer hohen IFN Sekretion durch einige Viren verantwortlich (s. Kap. 5.3).

Die isolierte Betrachtung der Polymorphismen und Virulenzfaktoren in der Literatur und die damit einhergehende fehlende Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes bei der Beschreibung dieser Merkmale und ihrer Wirkung ist wie bereits diskutiert eine mögliche Ursache für die häufige Diskrepanz zwischen der beschriebenen und in dieser Arbeit beobachteten Wirkung auf virale Eigenschaften. Es scheint daher kaum möglich zu sein, nur auf Basis bekannter Polymorphismen und Virulenzfaktoren auf die Eigenschaften neu entdeckter bzw. neu entstandener Viren zu schließen. Eine Untersuchung der Eigenschaften mittels virologischer Methoden ist derzeit also immer nötig. Wünschenswert wären neue Denkansätze, wie die vorhandenen Erkenntnisse zu den bereits beschriebenen Polymorphismen und Virulenzfaktoren mit den jeweiligen genetischen Hintergründen verknüpft werden können, um Zusammenhänge aufzudecken und die Nachteile der isolierten Betrachtung zu beseitigen. Auf diese Weise könnte die erfolgreiche Vorhersage von Viruseigenschaften auf Basis von Polymorphismen und Virulenzfaktoren gelingen.

## **5.5 Betrachtungen zum möglichen pandemischen Potential von Reassortanten zwischen humanen H1N1, porcinen H1N1 und aviären H5N1-Viren**

Definitionsgemäß handelt es sich bei einer Pandemie um die Ausbreitung einer Krankheit, meist einer Infektionskrankheit, auf mehreren Kontinenten. Für das Entstehen einer Influenzapandemie in der humanen Population müssen zumindest zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Ein großer Teil der humanen Population weist keine oder nur eine schwache Immunität gegen das pandemische Virus auf und die Transmissibilität des Virus zwischen Menschen erreicht ein hohes Niveau (s. Kap. 1.5). Wird eine Influenzapandemie durch eine Reassortante ausgelöst, deren Parentalviren aus verschiedenen Wirtsspezies stammen, muss es zusätzlich im Vorfeld zur Übertragung eines Influenzavirus auf einen neuen Wirt kommen und die entstandene

Reassortante im neuen Wirt effizient replizieren. Der Grad der Virulenz, den das pandemische Virus zeigt, ist für die gesundheitlichen, gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Folgen einer Pandemie von fundamentaler Bedeutung und fließt in die Bewertung des Pandemiestatus mit ein [346].

In der vorliegenden Arbeit konnte grundsätzlich eine sehr hohe genetische Kompatibilität zwischen den untersuchten Parentalviren gezeigt werden, wobei es keine Hinweise gibt, dass die ausgewählten Parentalviren nicht repräsentativ für ihren Subtyp aus dem entsprechenden Ursprungswirt sind. Bei einer natürlich auftretenden Koinfektion von Wirtsorganismen mit den in dieser Studie verwendeten Influenzavirus-Subtypen aus den entsprechenden Herkunftsspezies ist somit die Bildung von Reassortanten wahrscheinlich. Wie jedoch bereits diskutiert ist in der Natur die Zahl der Koinfektionen mit verschiedenen Influenzaviren der gleichen Herkunftsspezies gering. Es ist zudem zu vermuten, dass die Zahl der Koinfektionen mit Influenzaviren aus unterschiedlichen Herkunftsspezies noch geringer ist, da es zusätzlich bei mindestens einem der Influenzaviren zu einem Wirtswechsel kommen muss. Gestützt werden kann diese Vermutung auf mehrere Studien zur Seroprävalenz aviärer H5N1-Viren und porciner H1N1-Viren im Menschen: Hier zeigte sich unabhängig voneinander für beide Subtypen, dass zwischen 0 % und höchstens 4 % der Personen mit beruflicher oder Wohnort-bedingter Exposition gegenüber einem der beiden Subtypen seropositiv sind [347-359]. Selbst bei einer vorliegenden Koinfektion kommt es aus bereits diskutierten Gründen wie der Inkompatibilität von vRNP-Verpackungssignalen oder viralen Protein-Proteininteraktionen wahrscheinlich zu einer bevorzugten Bildung von Parentalviren und nur einigen wenigen, definierten Reassortanten. Diese neugebildeten Reassortanten müssen sich sowohl im koinfizierten Wirt durchsetzen als auch eine mit den Parentalviren mindestens vergleichbare Transmissibilität aufweisen, um sich in einer Wirtspopulation etablieren zu können. Da alle genannten Bedingungen ganz offenbar nur sehr selten gleichzeitig erfüllt sind, kommt es nicht zum häufigen Auftreten neuer derartiger Reassortanten. Die potentielle Gefahr der Entstehung solcher Reassortanten bleibt, wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, davon unbenommen bestehen.

Zusätzlich zur hohen genetischen Kompatibilität der Parentalviren konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der A549-Zellen gezeigt werden, dass humane Lungenzellen permissiv für die generierten Reassortanten sind. Dabei zeigten die Reassortanten z.T. sehr gute Replikationseigenschaften, die auf eine optimale Interaktion der viralen Proteine untereinander und mit Wirtszellfaktoren hindeuten. Eine hohe Replikationsrate begünstigt dabei nicht nur eine hohe Transmissibilität der Viren, sondern führt aufgrund der hohen Mutationsrate der Influenzaviren wahrscheinlich auch zu einer erhöhten genetischen Diversität. Aus dieser Population genetisch leicht unterschiedlicher Viren können die an den Wirt am besten angepassten Virus-Varianten selektiert werden.

Welche Folgen die Polymeraseaktivität und das Replikationsverhalten der Reassortanten sowie die ausgelöste IFN-Antwort für die Virulenz der Viren und den infizierten Wirt hat, bleibt unklar, da die Pathogenität in der vorliegenden Arbeit nicht bewertet wurde. Aufgrund der hohen IFN-Induktion einiger Reassortanten bei gleichzeitig sehr guter Replikationskompetenz und dem diskutierten Zusammenhang von hoher IFN-Sekretion und hoher Pathogenität von H5-Isolaten im Menschen [335] könnten die entsprechenden Reassortanten möglicherweise jedoch eine hohe Pathogenität zeigen.

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit bleibt festzustellen, dass eine Entstehung von Reassortanten aus humanen H1N1, porcinen H1N1 und aviären H5N1-Viren möglich ist und die Wahrscheinlichkeit mit der Häufigkeit solcher Koinfektionen steigt. Ob die entstandenen Reassortanten das Potential besitzen, eine Pandemie auszulösen, kann mit dem Ergebnis dieser Arbeit nicht abschließend bewertet werden, da die Vorimmunität der humanen Population und die Transmissibilität nicht untersucht wurde. Um diese Fragen zu beantworten, wären spezifische Folgearbeiten nötig und sinnvoll.

## Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Diskussion ergeben sich weiterführende Fragestellungen, deren Beantwortung nicht nur für die Einschätzung des pandemischen Potentials von Reassortanten zwischen humanen H1N1, porcinen H1N1 und aviären H5N1-Viren sinnvoll erscheint.

Um die mögliche Entstehung weiterer Reassortanten zu prüfen und vor allem Reassortanten mit bevorzugt entstehenden Segmentkombinationen zu identifizieren, die mit höherer Priorität auf ihr pandemisches Potential untersucht werden sollten, könnten *in vitro* oder *in vivo* Koinfektionsversuche mit den Parentalviren durchgeführt werden. Der Fokus sollte hierbei auf für die Fragestellung geeignete, porcine und humane Zelllinien bzw. dem Schwein oder Frettchen als Versuchstier liegen. Zugleich könnte die Rate der isolierten Reassortanten zu Parentalviren ermittelt und mit publizierten Daten verglichen werden, um weitere Aussagen zur genetischen Kompatibilität der Parentalviren zu treffen. Die virale Fitness der generierten Reassortanten entscheidet, ob sie in einem gegebenen Wirt effizient replizieren und sich ggf. - evolutionär betrachtet - gegen Viren mit anderen Segmentkombinationen durchsetzen können. Hierzu sollten zum einen Replikationsversuche mit einzelnen Reassortanten und Parentalviren in weiteren humanen oder porcinen Lungen-Zelllinien oder an Material aus Lungenbiopsien durchgeführt werden, um die Permissivität weiterer Zellen zu prüfen. Zum anderen könnten geeignete Zelllinien mit mehreren Reassortanten bzw. Parentalviren pro Ansatz infiziert werden, um eine Konkurrenzsituation im Wirt zu simulieren und nach einigen Passagen die plaque-gereinigten Viren hinsichtlich ihrer Genomzusammensetzung zu analysieren. Unter der Einschränkung, dass auf diese Weise vermutlich weitere Reassortanten entstehen, könnten Rückschlüsse auf die virale Fitness gezogen werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen die hohe genetische Kompatibilität der Parentalviren anhand der Vielzahl der generierbaren Reassortanten. Um auch das Potential der Entstehung einer Influenzapandemie in der humanen Population aufgrund solcher Reassortanten abschätzen zu können, müsste zusätzlich die Transmissibilität der Reassortanten im Tiermodell, beispielsweise am Frettchen oder Meerschweinchen, analysiert werden. Auch die Pathogenität

könnte an diesen Modellen untersucht werden. Da die bestehende Immunität in der humanen Population gegenüber derartigen Reassortanten entscheidend für die Möglichkeit ihrer Verbreitung ist, sollten humane Seren mit verschiedenen Methoden auf Antikörper oder neutralisierende Antikörper gegen die Parentalviren und Reassortanten getestet werden, wobei die Fähigkeit der Antikörper zur Bindung an die Viren vermutlich häufig durch die Bindungsfähigkeit an das HA-Protein bedingt ist.

Mit weiteren Untersuchungen könnten Virulenzfaktoren und Mutationen, die sich als Anpassung an den neuen Wirt etablieren, untersucht werden: Dazu könnten einzelne generierte Reassortanten auf Zellkulturen verschiedener Wirtsspezies mehrfach passagiert und die daraus wieder isolierten Viren sequenziert werden, um Mutationen zu identifizieren, die Anpassungen an den neuen Wirt darstellen. Sind stabile Mutationen nachweisbar, so wäre die Analyse des Replikationsverhaltens sinnvoll, um Unterschiede zur ersten Generation der Reassortanten zu identifizieren. Will man einzelne Polymorphismen, die in der vorliegenden Arbeit vermutlich eine Veränderung viraler Eigenschaften auslösten, näher untersuchen, wäre auch eine ortsgerichtete Mutagenese der Polymorphismen innerhalb der pHW2000-Plasmide möglich.

## **Zusammenfassung**

In der jüngeren Geschichte kam es mehrfach zum Ausbruch einer Influenzapandemie – so in den Jahren 1918, 1957, 1968, 1977 und 2009. Zumeist wurden die Pandemien nachweislich durch Influenzavirus-Reassortanten ausgelöst, also durch Viren, die aus der Neukombination der Genomsegmente von mindestens zwei unterschiedlichen Influenzaviren entstanden. Die neu entstandenen Viren trafen auf eine immunologisch weitgehend naive humane Population, wurden gut zwischen Menschen übertragen und waren somit erst in der Lage, Pandemien unterschiedlichen Ausmaßes auszulösen.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Bewertung des Risikos der Entstehung einer solchen Reassortante mit hoher viraler Fitness, die bei Vorliegen weiterer Voraussetzungen potentiell eine Pandemie auslösen könnte.

Dem Hausschwein kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da es nicht nur für porcine, sondern auch für aviäre und humane Influenzaviren empfänglich ist und daher Koinfektionen mit Influenzaviren aus ursprünglich verschiedenen Wirten möglich sind. In dieser Arbeit wurde zunächst die genetische Kompatibilität zwischen Genomsegmenten von humanen H1N1, porcinen H1N1 und aviären H5N1 Influenzaviren analysiert. Von besonderem Interesse waren dabei die Segmente der Oberflächenproteine HA und NA, sowie die Polymerasesegmente, da diese Segmente bei der Entstehung von Pandemieviren in der Vergangenheit ausgetauscht wurden und gleichzeitig die wichtigsten Virulenzfaktoren für die Wirtsspezifität und -adaptation tragen. Die Reassortanten wurden mittels der Methode der reversen Genetik erzeugt, wobei der Focus auf porcin-aviären, porcin-humanen, sowie Triple-Reassortanten lag. Die Rate der generierbaren Reassortanten war in dieser Arbeit mit über 90 % sehr hoch. Dies zeigt die außerordentlich hohe genetische Kompatibilität der Segmente von porcinen H1N1 und aviären H5N1 Influenzaviren sowie von porcinen H1N1 und humanen H1N1 Viren und sogar allen drei Parentalviren untereinander.

Die Parentalviren und die aus ihnen erzeugten Reassortanten wurden zudem hinsichtlich ihrer viralen Eigenschaften analysiert. Dabei zeigten sich sehr deutliche Unterschiede in der Aktivität des Polymerasekomplexes, die sich z.T. auf das Vorhandensein definierter Polymerasesegmente zurückführen ließen. Da gleichzeitig große Unterschiede im Replikationsverhalten der Viren identifiziert werden konnten, wurde der Einfluss der Polymeraseaktivität auf die Replikation untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass auch eine sehr niedrige Polymeraseaktivität eine hohe Replikationskompetenz ermöglichen und eine hohe Aktivität der Polymerase nachteilig für das Replikationsverhalten sein kann. Für eine effiziente Replikation der untersuchten Viren ist ganz offenbar eine Polymeraseaktivität in optimaler Höhe, jedoch nicht zwingend eine hohe Aktivität, nötig. Im Hinblick auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems der Wirtszelle nach einer Infektion durch die Parentalviren oder Reassortanten wurde festgestellt, dass die Viren häufig effektiv eine IFN-Sekretion durch infizierte Zellen hemmen können. War die IFN-Sekretion ausnahmsweise erhöht, war immer auch ein definiertes Genomsegment in den Reassortanten vorhanden.

In der Literatur ist eine Vielzahl von Polymorphismen und Virulenzfaktoren beschrieben, die einen Einfluss auf die viralen Eigenschaften haben. Da sich die Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Viren nach dem Austausch eines Genomsegmentes häufig veränderten, wurde analysiert, ob sich die Änderungen durch das Auftreten bestimmter Polymorphismen begründen lassen. Dabei wurde deutlich, dass nur ein geringer Teil der Änderungen der viralen Eigenschaften nach einem Segmentaustausch durch Polymorphismen erklärbar sind. Ein möglicher Grund hierbei ist die isolierte Betrachtung der Polymorphismen und Virulenzfaktoren in der Fachliteratur ohne Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes. Als Folge lassen sich virale Eigenschaften nicht zuverlässig anhand von publizierten Polymorphismen vorhersagen.

Die vorliegende Studie gibt anhand der gewonnenen Ergebnisse einen Hinweis auf das hohe Potential der Entstehung eines Influenzavirus mit einer neuen Kombination von Genomsegmenten und gleichzeitig hoher viraler Fitness. Um das pandemische Potential dieser Reassortanten abschließend bewerten zu können, sind weitere Arbeiten zur vorherrschenden Immunität in der humanen Population und zur Transmissibilität der Viren notwendig.

## **Summary**

In recent history there had been several influenza pandemics - so in the years 1918, 1957, 1968, 1977 and 2009. In most cases, the pandemics were caused by influenza virus reassortants resulting from the recombination of genomic segments of at least two different influenza viruses. The newly emerged viruses encountered an immunologically largely naive human population, were transmitted well between humans and were therefore able to cause pandemics to a different extend.

The present study provides a contribution to the assessment of the risk of emergence of such a reassortant with high viral fitness that can potentially cause a pandemic in the presence of further conditions. The domestic pig is particularly important in this context. It is susceptible not only to porcine viruses but also to avian and human influenza viruses. Therefore co-infections of domestic pigs with influenza viruses from different hosts are possible. The

compatibility between genomic segments of human H1N1, porcine H1N1 and avian H5N1 influenza viruses was analyzed in this study. The segments of the viral surface proteins HA and NA as well as the polymerase segments were of particular interest. These segments have been replaced in the emergence of pandemic viruses in the past and bear the major virulence factors of host specificity and -adaptation. The reassortants were generated by means of reverse genetics, focusing thereby on porcine-avian, porcine-human as well as triple-reassortants. The rate of generated reassortants was very high with more than 90% in this study. This shows the extraordinary high genetic compatibility of the segments of porcine H1N1 and avian H5N1 influenza viruses as well as of porcine H1N1 and human H1N1 viruses and even between all three parental viruses.

The parental and reassortant viruses were also analyzed for their viral properties. Remarkable differences were found in the activity of the polymerase complex which can partially be traced to the presence of defined polymerase segments. Since also large differences in the replication of the viruses were identified the influence of the polymerase activity on the replication was investigated. The results show that even a very low polymerase activity allows a high replication competence. On the other hand a high activity of the polymerase can be disadvantageous for the replication. Thus it was shown that an optimal level of polymerase activity is needed for efficient replication of the investigated viruses. A high polymerase activity is not needed necessarily. Regarding the activation of the innate immune system of the host cell after an infection by the parental or reassortant viruses, it was found that the viruses can often effectively inhibit IFN secretion by infected cells. If the cellular IFN secretion was increased in exceptional cases, a defined genome segment was always present in the reassortants.

A large number of polymorphisms and virulence factors having an influence on viral characteristics have been described. As the properties of the investigated viruses frequently changed after the exchange of a genome segment, it was analyzed whether the changes were caused by the occurrence of defined polymorphisms. It became clear that only a small part of the changes in viral characteristics following a segment exchange can be explained by polymorphisms. A possible reason for this finding is the isolated analysis of

polymorphisms and virulence factors without consideration of the genetic background in the scientific literature. Thus viral properties can not be predicted reliably on the basis of published polymorphisms.

The present study gives an indication of the high potential of the emergence of an influenza virus with a new combination of genome segments while showing a high viral fitness. Further studies on the prevalent immunity in the human population and on the transmissibility of the viruses are necessary to assess the pandemic potential of these reassortants.

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CPE	cytopathischer Effekt
cRNA	<i>complementary RNA</i>
d	Tag
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	endoplasmatische Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin (-Segment)
HA-Test	Hämagglutinations-Test
IFN-β	Interferon-β
IFN-λ2	Interferon-λ2
LB-Festmedium	<i>lysogeny broth</i> -Festmedium
M	Matrixprotein (-Segment)
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MxA	<i>Interferon-induced GTP-binding protein Mx1</i>
NA	Neuraminidase (-Segment)
NEAA	<i>non essential amino acids</i>
NEP	Nukleäres Exportprotein
NK	Negativkontrolle
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NP	Nukleoprotein (-Segment)
NS	Nicht-Strukturprotein (-Segment)
ns	nicht signifikant
NS1	Nicht-Strukturprotein 1
NS2	Nicht-Strukturprotein 2
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthase
p.i.	<i>post infection</i>
PA	<i>Polymerase acidic protein</i> (-Segment)
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PB1	<i>Polymerase basic protein 1</i> (-Segment)
PB1-F2	PB1-F2-Protein
PB2	<i>Polymerase basic protein 2</i> (-Segment)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
PK	Positivkontrolle
PKR	Proteinkinase R

PolK	Polymerasekombination
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
rER	raues endoplasmatische Retikulum
RIG I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
ssRNA	einzelstrang-RNA
t	Zeit
Ta	Annealingtemperatur
TAE-Laufpuffer	Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TRIM25	<i>Tripartite Motif Containing 25 protein</i>
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Influenza A-Virus.....	7
Abbildung 2: virales Ribonukleoprotein (vRNP) .....	8
Abbildung 3: Hämagglutinin (HA) - Monomer .....	11
Abbildung 4: Replikationszyklus.....	15
Abbildung 5: schematische Darstellung des Reassortments.....	19
Abbildung 6: Wirtsspektrum der Influenza A-Viren .....	20
Abbildung 7: Zirkulation humaner Influenza A-Virus Subtypen.....	23
Abbildung 8: Synthese der vRNA und mRNA ausgehend von der viralen cDNA (verändert nach: Hoffmann et al., 2000 [231]).....	61
Abbildung 9: Transfektion des vollständigen pHW2000-Expressionsplasmid- satzes in HEK293T-Zellen zur Generierung infektiöser Influenzaviren (verändert nach: Hoffmann et al., 2000 [231]).....	62

Abbildung 10: Polymeraseaktivität definierter Polymerase-Kombinationen (PolK) (ohne Darstellung von Signifikanzen).....	79
Abbildung 11: Verlauf der Replikation der Parentalviren (K, B, L) und Reassortanten .....	92
Abbildung 12: Einfluss der Oberflächenproteine HA und NA auf das Replikationsverhalten .....	94
Abbildung 13: Einfluss der Oberflächenproteine HA und NA auf das Replikationsverhalten .....	94
Abbildung 14: Einfluss des Polymerasekomplexes auf das Replikationsverhalten .....	101
Abbildung 15: Einfluss des Polymerasekomplexes auf das Replikationsverhalten .....	101
Abbildung 16 A-D: beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Zellen/ CPE .....	105
Abbildung 17: IFN- $\beta$ Sekretion von A549-Zellen 24 h nach Infektion .....	108
Abbildung 18: IFN- $\lambda$ 2 Sekretion von A549-Zellen 24 h nach Infektion .....	113

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Generischer Primer für reverse Transkription und segmentspezifische Primer für Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente.....	36
Tabelle 2: Sequenzierprimer und Kolonie-PCR-Primer .....	37
Tabelle 3: Pyrosequenzierungs-PCR- und Pyrosequenzierungsprimer .....	39
Tabelle 4: cDNA-Mastermix 1 .....	46
Tabelle 5: cDNA-Mastermix 2 .....	46

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente der Influenzaviren .....	47
Tabelle 7: Temperaturprofil für die Amplifikation der vollständigen genomischen Segmente der Influenzaviren .....	47
Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR.....	48
Tabelle 9: Temperaturprofil der Kolonie-PCR.....	48
Tabelle 10: Reaktionsansatz für PCR mit nachfolgender Pyrosequenzierung ..	49
Tabelle 11: Temperaturprofil für PCR mit nachfolgender Pyrosequenzierung .	49
Tabelle 12: Sequenzieransatz .....	52
Tabelle 13: Temperaturprofil für die Cycle-Sequencing-Reaktion .....	52
Tabelle 14: Reaktionsansatz für Immobilisierung des Biotin-PCR-Produkts....	53
Tabelle 15: Reaktionsansatz für Primerannealing .....	53
Tabelle 16: Restriktionsenzyme, enzymatisch verdaute PCR-Produkte/ Plasmide und Reaktionsbedingungen.....	54
Tabelle 17: Ligationsansatz .....	55
Tabelle 18: Kriterien für die Beurteilung des beobachteten CPE.....	66
Tabelle 19: Beschreibung des CPEs und Zuordnung zu einem Scorewert .....	66
Tabelle 20: Identität der Genprodukte zwischen den Parentalviren A/NSA/58/2007 (porcines H1N1), A/NewCaledonia/20/99 (humanes H1N1) und A/whooperswan/R65/2006 (aviäres H5N1) .....	70
Tabelle 21: bedeutende Virulenzfaktoren/ Polymorphismen und Existenz des Merkmals in den PB1-, PB2-, HA- und NA-Proteinen der Parentalviren .....	72
Tabelle 22: Parentalviren (K, B, L) und rekombinante Viren, die durch reverse Genetik generiert wurden .....	75

Tabelle 23: Polymeraseaktivität der definierten Polymerase-Kombinationen..	77
Tabelle 24: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PB1-Proteins.....	81
Tabelle 25: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PB2-Proteins.....	83
Tabelle 26: Veränderung der Polymeraseaktivität bei Austausch des PA-Proteins.....	86
Tabelle 27: Vergleich der Polymeraseaktivität von generierten Viren.....	88
Tabelle 28: Titer zu definierten Zeitpunkten nach Infektion .....	91
Tabelle 29: Vergleich des Replikationsverhaltens von Parentalviren und Reassortanten .....	103
Tabelle 30: Zellzustand/ Grad des CPEs zu definierten Zeitpunkten der Replikationskinetik.....	106
Tabelle 31: Beschreibung des Zellzustandes/ CPEs und Zuordnung zu einem Scorewertebereich .....	106
Tabelle 32: IFN- $\beta$ Sekretion von A549-Zellen nach Infektion.....	108
Tabelle 33: Signifikanzniveau der IFN- $\beta$ Sekretion von A549-Zellen nach Infektion.....	109
Tabelle 34: Vergleich der IFN- $\beta$ Sekretion nach Infektion mit generierten Viren .....	111
Tabelle 35: IFN- $\lambda$ 2 Sekretion von A549-Zellen nach Infektion.....	113
Tabelle 36: Signifikanzniveau der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion von A549-Zellen nach Infektion.....	114
Tabelle 37: Vergleich der IFN- $\lambda$ 2 Sekretion nach Infektion mit generierten Viren.....	116

Tabelle 38: bekannte Virulenzfaktoren/ Polymorphismen und Existenz des Merkmals in den Parentalviren.....	203
---	-----

## Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Palese, P. and J.F. Young, *Variation of influenza A, B, and C viruses*. Science, 1982. **215**(4539): p. 1468-1474.
2. Fouchier, R.A., et al., *Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2814-22.
3. Lamb, R.A. and R.M. Krug, *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe, P.M. Howley, and D.E. Griffin, Editors. 2006, Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia.
4. Tong, S., et al., *New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10).
5. WHO, *A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum*. Bull World Health Organ, 1980. **58**(4): p. 585-91.
6. Alford, R.H., et al., *Human influenza resulting from aerosol inhalation*. Proc Soc Exp Biol Med, 1966. **122**(3): p. 800-4.
7. Wright, P.F., und Webster, R.G., *Fields Virology* 2007: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
8. Sprenger, M.J., et al., *Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease, 1967-1989*. Int J Epidemiol, 1993. **22**(2): p. 334-40.
9. Choppin, P.W., J.S. Murphy, and I. Tamm, *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, 1960. **112**: p. 945-52.
10. Chu, C.M., I.M. Dawson, and W.J. Elford, *Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus*. Lancet, 1949. **1**(6554): p. 602.
11. Smirnov Yu, A., M.A. Kuznetsova, and N.V. Kaverin, *The genetic aspects of influenza virus filamentous particle formation*. Arch Virol, 1991. **118**(3-4): p. 279-84.
12. Kates, M., et al., *Origin of Lipids in Influenza Virus*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1962. **27**: p. 293-301.

13. Murti, K.G. and R.G. Webster, *Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy*. Virology, 1986. **149**(1): p. 36-43.
14. Wrigley, N.G., *Electron microscopy of influenza virus*. Br Med Bull, 1979. **35**(1): p. 35-8.
15. Zebedee, S.L. and R.A. Lamb, *Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2762-72.
16. Sugrue, R.J. and A.J. Hay, *Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel*. Virology, 1991. **180**(2): p. 617-24.
17. Gregoriades, A. and B. Frangione, *Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion*. J Virol, 1981. **40**(1): p. 323-8.
18. Wakefield, L. and G.G. Brownlee, *RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(21): p. 8569-80.
19. Richardson, J.C. and R.K. Akkina, *NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells*. Arch Virol, 1991. **116**(1-4): p. 69-80.
20. Chen, W., et al., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.
21. Stech, J., 2008, Deutsche Presse-Agentur GmbH.
22. Desselberger, U., et al., *The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity*. Gene, 1980. **8**(3): p. 315-28.
23. Tiley, L.S., et al., *Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5108-16.
24. Flick, R., et al., *Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure*. RNA, 1996. **2**(10): p. 1046-57.
25. Hsu, M.T., et al., *Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(22): p. 8140-4.
26. Compans, R.W., J. Content, and P.H. Duesberg, *Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus*. J Virol, 1972. **10**(4): p. 795-800.
27. Murti, K.G., et al., *Composition of the helical internal components of influenza virus as revealed by immunogold labeling/electron microscopy*. Virology, 1992. **186**(1): p. 294-9.

28. Baudin, F., et al., *Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent.* EMBO J, 1994. **13**(13): p. 3158-65.
29. Palese, P. and M. Shaw, *Fields virology; Orthomyxoviridae.* 5th Edition ed2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
30. Wise, H.M., et al., *A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA.* J Virol, 2009. **83**(16): p. 8021-31.
31. Dalton, R.M., et al., *Temperature sensitive influenza a virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes.* Virol J, 2006. **3**.
32. Braam, J., I. Ulmanen, and R.M. Krug, *Molecular model of a eucaryotic transcription complex: Functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription.* Cell, 1983. **34**(2): p. 611-618.
33. Digard, P., V.C. Blok, and S.C. Inglis, *Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in Xenopus oocytes.* Virology, 1989. **171**(1): p. 162-169.
34. Nath, S.T. and D.P. Nayak, *Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1).* Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4139-45.
35. Mukaigawa, J. and D.P. Nayak, *Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2.* J Virol, 1991. **65**(1): p. 245-53.
36. Nieto, A., et al., *Nuclear transport of influenza virus polymerase PA protein.* Virus Res, 1992. **24**(1): p. 65-75.
37. Fodor, E. and M. Smith, *The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex.* J Virol, 2004. **78**(17): p. 9144-53.
38. Deng, T., et al., *In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex.* J Virol, 2005. **79**(13): p. 8669-74.
39. Gonzalez, S. and J. Ortin, *Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates.* EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3767-75.
40. González, S., T. Zürcher, and J. Ortín, *Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: A model for the viral RNA polymerase structure.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4456-4463.

41. Ohtsu, Y., et al., *Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase*. Microbiol Immunol, 2002. **46**(3): p. 167-175.
42. Biswas, S.K. and D.P. Nayak, *Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1819-1826.
43. Ulmanen, I., B.A. Broni, and R.M. Krug, *Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7355-9.
44. Blaas, D., E. Patzelt, and E. Kuechler, *Identification of the cap binding protein of influenza virus*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(15): p. 4803-12.
45. Blaas, D., E. Patzelt, and E. Kuechler, *Cap-recognizing protein of influenza virus*. Virology, 1982. **116**(1): p. 339-348.
46. Dias, A., et al., *The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 914-8.
47. Yuan, P., et al., *Crystal structure of an avian influenza polymerase PA N reveals an endonuclease active site*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 909-913.
48. Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez, and A. Nieto, *Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 5315-24.
49. Gibbs, J.S., et al., *The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7214-24.
50. Zamarin, D., et al., *Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1*. PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e4.
51. Conenello, G.M. and P. Palese, *Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(4): p. 207-9.
52. Le Goffic, R., et al., *Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4812-23.
53. Zamarin, D., M.B. Ortigoza, and P. Palese, *Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7976-83.
54. Le Goffic, R., et al., *Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002202.

55. Conenello, G.M., et al., *A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence*. PLoS Pathog, 2007. **3**(10): p. 1414-21.
56. Conenello, G.M., et al., *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, 2011. **85**(2): p. 652-62.
57. Tauber, S., et al., *Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 4): p. 840-9.
58. Helenius, A. and M. Aebi, *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2364-9.
59. Klenk, H.D., et al., *Activation of influenza A viruses by trypsin treatment*. Virology, 1975. **68**(2): p. 426-39.
60. Lazarowitz, S.G. and P.W. Choppin, *Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide*. Virology, 1975. **68**(2): p. 440-54.
61. Kido, H., et al., *Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13573-9.
62. Kido, H., et al., *Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses*. Mol Cells, 1999. **9**(3): p. 235-44.
63. Bottcher, E., et al., *Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9896-8.
64. Steinhauer, D.A., *Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus*. Virology, 1999. **258**(1): p. 1-20.
65. Klenk, H.D. and W. Garten, *Host cell proteases controlling virus pathogenicity*. Trends Microbiol, 1994. **2**(2): p. 39-43.
66. Stieneke-Grober, A., et al., *Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2407-14.
67. Senne, D.A., et al., *Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential*. Avian Dis, 1996. **40**(2): p. 425-37.
68. Perdue, M.L., et al., *Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses*. Virus Res, 1997. **49**(2): p. 173-86.

69. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 531-69.
70. Connor, R.J., et al., *Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates*. *Virology*, 1994. **205**(1): p. 17-23.
71. Matlin, K.S., et al., *Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line*. *J Cell Biol*, 1981. **91**(3 Pt 1): p. 601-13.
72. Bullough, P.A., et al., *Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion*. *Nature*, 1994. **371**(6492): p. 37-43.
73. Wiley, D.C. and J.J. Skehel, *The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 365-94.
74. Colman, P.M., J.N. Varghese, and W.G. Laver, *Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase*. *Nature*, 1983. **303**(5912): p. 41-4.
75. Burnet, F.M., *Principles of animal virology* 1960, Wisconsin - Madison: Academic Press. 486.
76. Matrosovich, M.N., et al., *Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12665-7.
77. Palese, P., et al., *Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase*. *Virology*, 1974. **61**(2): p. 397-410.
78. Palese, P. and R.W. Compans, *Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action*. *J Gen Virol*, 1976. **33**(1): p. 159-63.
79. Takahashi, T., et al., *Duck and human pandemic influenza A viruses retain sialidase activity under low pH conditions*. *J Biochem*, 2001. **130**(2): p. 279-83.
80. Baum, L.G. and J.C. Paulson, *The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity*. *Virology*, 1991. **180**(1): p. 10-5.
81. Katinger, D., et al., *Specificity of neuraminidase activity from influenza viruses isolated in different hosts tested with novel substrates*. *Arch Virol*, 2004. **149**(11): p. 2131-40.
82. Mochalova, L., et al., *Oligosaccharide specificity of influenza H1N1 virus neuraminidases*. *Arch Virol*, 2007. **152**(11): p. 2047-57.

83. Kobasa, D., et al., *Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6743-51.
84. Wagner, R., et al., *Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6316-23.
85. Wagner, R., M. Matrosovich, and H.D. Klenk, *Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections*. Rev Med Virol, 2002. **12**(3): p. 159-66.
86. Xu, X., et al., *Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses*. Virology, 1996. **224**(1): p. 175-83.
87. Pons, M.W., et al., *Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus*. Virology, 1969. **39**(2): p. 250-9.
88. Ruigrok, R.W. and F. Baudin, *Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 4): p. 1009-14.
89. Biswas, S.K., P.L. Boutz, and D.P. Nayak, *Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5493-501.
90. Portela, A. and P. Digard, *The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 723-34.
91. Digard, P., et al., *Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2222-31.
92. O'Neill, R.E., et al., *Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 22701-4.
93. O'Neill, R.E. and P. Palese, *NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein*. Virology, 1995. **206**(1): p. 116-25.
94. Elton, D., et al., *Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 408-19.
95. Neumann, G., M.R. Castrucci, and Y. Kawaoka, *Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9690-700.

96. Wang, P., P. Palese, and R.E. O'Neill, *The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1850-6.
97. Weber, F., et al., *A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins*. Virology, 1998. **250**(1): p. 9-18.
98. Bullido, R., et al., *Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 1): p. 135-42.
99. Cros, J.F., A. Garcia-Sastre, and P. Palese, *An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 205-13.
100. Honda, A., et al., *RNA polymerase of influenza virus: Role of NP in RNA chain elongation*. J Biochem, 1988. **104**(6): p. 1021-1026.
101. Zhang, J. and R.A. Lamb, *Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells*. Virology, 1996. **225**(2): p. 255-66.
102. Ruigrok, R.W., et al., *Membrane interaction of influenza virus M1 protein*. Virology, 2000. **267**(2): p. 289-98.
103. Zhao, H., M. Ekstrom, and H. Garoff, *The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 10): p. 2435-46.
104. Huang, X., et al., *Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export*. Virology, 2001. **287**(2): p. 405-16.
105. Chen, B.J., et al., *The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding*. J Virol, 2008. **82**(20): p. 10059-70.
106. Martin, K. and A. Helenius, *Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import*. Cell, 1991. **67**(1): p. 117-30.
107. Watanabe, K., et al., *Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B*. Virus Res, 2001. **77**(1): p. 31-42.
108. Pinto, L.H., L.J. Holsinger, and R.A. Lamb, *Influenza virus M2 protein has ion channel activity*. Cell, 1992. **69**(3): p. 517-28.

109. Helenius, A., *Unpacking the incoming influenza virus*. Cell, 1992. **69**(4): p. 577-8.
110. Wharton, S.A., et al., *Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine*. J Gen Virol, 1994. **75 ( Pt 4)**: p. 945-8.
111. Davies, W.L., et al., *Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine)*. Science, 1964. **144**(3620): p. 862-3.
112. Schnell, J.R. and J.J. Chou, *Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 591-5.
113. Bright, R.A., et al., *Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1175-81.
114. Wang, W., et al., *Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(15): p. 4913-28.
115. Qiu, Y. and R.M. Krug, *The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A)*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2425-32.
116. Hatada, E., T. Takizawa, and R. Fukuda, *Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro*. J Gen Virol, 1992. **73 ( Pt 1)**: p. 17-25.
117. Mibayashi, M., et al., *Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 514-24.
118. Opitz, B., et al., *IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 930-8.
119. Min, J.Y., et al., *A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis*. Virology, 2007. **363**(1): p. 236-43.
120. Egorov, A., et al., *Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6437-41.
121. Garcia-Sastre, A., et al., *Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems*. Virology, 1998. **252**(2): p. 324-30.
122. Kochs, G., A. Garcia-Sastre, and L. Martinez-Sobrido, *Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7011-21.

123. Ludwig, S., et al., *The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors*. J Virol, 2002. **76**(21): p. 11166-71.
124. Wolff, T., et al., *Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses*. Biol Chem, 2008. **389**(10): p. 1299-305.
125. Alonso-Caplen, F.V. and R.M. Krug, *Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(2): p. 1092-8.
126. O'Neill, R.E., J. Talon, and P. Palese, *The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins*. EMBO J, 1998. **17**(1): p. 288-96.
127. Ward, A.C., et al., *Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus*. Arch Virol, 1995. **140**(11): p. 2067-73.
128. Yasuda, J., et al., *Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix*. Virology, 1993. **196**(1): p. 249-55.
129. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
130. Dourmashkin, R.R. and D.A. Tyrrell, *Electron microscopic observations on the entry of influenza virus into susceptible cells*. J Gen Virol, 1974. **24**(1): p. 129-41.
131. Patterson, S., J.S. Oxford, and R.R. Dourmashkin, *Studies on the mechanism of influenza virus entry into cells*. J Gen Virol, 1979. **43**(1): p. 223-9.
132. White, J., K. Matlin, and A. Helenius, *Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses*. J Cell Biol, 1981. **89**(3): p. 674-9.
133. Floyd, D.L., et al., *Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15382-7.
134. Whittaker, G., M. Bui, and A. Helenius, *Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 2743-56.
135. Whittaker, G.R., M. Kann, and A. Helenius, *Viral entry into the nucleus*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 627-51.
136. Plotch, S.J., et al., *A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription*. Cell, 1981. **23**(3): p. 847-58.

137. Robertson, J.S., M. Schubert, and R.A. Lazzarini, *Polyadenylation sites for influenza virus mRNA*. J Virol, 1981. **38**(1): p. 157-63.
138. Luo, G.X., et al., *The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure*. J Virol, 1991. **65**(6): p. 2861-7.
139. Poon, L.L., et al., *Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3473-6.
140. Sugrue, R.J., R.B. Belshe, and A.J. Hay, *Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein*. Virology, 1990. **179**(1): p. 51-6.
141. Veit, M. and M.F. Schmidt, *Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin*. FEBS Lett, 1993. **336**(2): p. 243-7.
142. Leser, G.P. and R.A. Lamb, *Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins*. Virology, 2005. **342**(2): p. 215-27.
143. Mena, I., et al., *Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1186-94.
144. Vreede, F.T., T.E. Jung, and G.G. Brownlee, *Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9568-72.
145. Klumpp, K., R.W. Ruigrok, and F. Baudin, *Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1248-57.
146. Neumann, G., M.T. Hughes, and Y. Kawaoka, *Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1*. EMBO J, 2000. **19**(24): p. 6751-8.
147. Enami, M. and K. Enami, *Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6653-7.
148. Gomez-Puertas, P., et al., *Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11538-47.
149. Latham, T. and J.M. Galarza, *Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6154-65.
150. Holland, J., et al., *Rapid evolution of RNA genomes*. Science, 1982. **215**(4540): p. 1577-85.

151. Steinhauer, D.A. and J.J. Holland, *Rapid evolution of RNA viruses*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**: p. 409-33.
152. Parvin, J.D., et al., *Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1*. J Virol, 1986. **59**(2): p. 377-83.
153. Palese, P., *The genes of influenza virus*. Cell, 1977. **10**(1): p. 1-10.
154. Sugiura, A., *Influenza virus genetics*, in *The influenza viruses and influenza*, E.D. Kilbourne, Editor 1975, Academic Press: Orlando. p. 171-214.
155. Young, J.F. and P. Palese, *Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6547-51.
156. Webster, R.G., C.H. Campbell, and A. Granoff, *The "in vivo" production of "new" influenza A viruses. I. Genetic recombination between avian and mammalian influenza viruses*. Virology, 1971. **44**(2): p. 317-28.
157. Webster, R.G., et al., *Molecular mechanisms of variation in influenza viruses*. Nature, 1982. **296**(5853): p. 115-21.
158. Trifonov, V., H. Khiabani, and R. Rabadan, *Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 115-9.
159. Shope, R.E., *The Etiology of Swine Influenza*. Science, 1931. **73**(1886): p. 214-5.
160. Waddell, G.H., M.B. Teigland, and M.M. Sigel, *A New Influenza Virus Associated with Equine Respiratory Disease*. J Am Vet Med Assoc, 1963. **143**: p. 587-90.
161. Crawford, P.C., et al., *Transmission of equine influenza virus to dogs*. Science, 2005. **310**(5747): p. 482-5.
162. Anthony, S.J., et al., *Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals*. MBio, 2012. **3**(4): p. e00166-12.
163. Manz, B., M. Schwemmler, and L. Brunotte, *Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier*. J Virol, 2013. **87**(13): p. 7200-9.
164. Guo, Y.J., et al., *Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus*. J Gen Virol, 1983. **64** (Pt 1): p. 177-82.
165. Osterhaus, A.D., et al., *Influenza B virus in seals*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1051-3.

166. Gao, R., et al., *Human infection with a novel avian-origin*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(20): p. 1888-1897.
167. Li, Q., et al., *Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(6): p. 520-532.
168. Peiris, M., et al., *Human infection with influenza H9N2*. Lancet, 1999. **354**(9182): p. 916-7.
169. Ito, T., et al., *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7367-73.
170. Shinya, K., et al., *Avian flu: influenza virus receptors in the human airway*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 435-6.
171. Matrosovich, M., et al., *Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8502-12.
172. Stevens, J., et al., *Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities*. J Mol Biol, 2006. **355**(5): p. 1143-55.
173. Glaser, L., et al., *A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11533-6.
174. Stevens, J., et al., *Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus*. Science, 2006. **312**(5772): p. 404-10.
175. Gamblin, S.J., et al., *The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1838-42.
176. Chutinimitkul, S., et al., *Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 11802-13.
177. Neumann, G. and Y. Kawaoka, *Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(6): p. 881-6.
178. Kida, H., et al., *Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs*. J Gen Virol, 1994. **75 ( Pt 9)**: p. 2183-8.
179. Claas, E.C., et al., *Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe*. Virology, 1994. **204**(1): p. 453-7.

180. Smith, G.J., et al., *Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic*. *Nature*, 2009. **459**(7250): p. 1122-5.
181. Rambaut, A., et al., *The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus*. *Nature*, 2008. **453**(7195): p. 615-9.
182. Sykes, J.F.J., *The influenza epidemic of 1889-1890*. *Public Health*, 1889. **2**(C): p. 373-376.
183. Palese, P., *Influenza: old and new threats*. *Nat Med*, 2004. **10**(12 Suppl): p. S82-7.
184. Nelson, M.I., et al., *Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(2): p. e1000012.
185. Gorman, O.T., et al., *Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses*. *J Virol*, 1991. **65**(7): p. 3704-14.
186. Taubenberger, J.K., *The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus*. *Proc Am Philos Soc*, 2006. **150**(1): p. 86-112.
187. Karasin, A.I., et al., *Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes*. *Virus Res*, 2000. **68**(1): p. 71-85.
188. Zhou, N.N., et al., *Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs*. *J Virol*, 1999. **73**(10): p. 8851-6.
189. Pensaert, M., et al., *Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man*. *Bull World Health Organ*, 1981. **59**(1): p. 75-8.
190. Castrucci, M.R., et al., *Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs*. *Virology*, 1993. **193**(1): p. 503-6.
191. Castrucci, M.R., et al., *Antigenic and sequence analysis of H3 influenza virus haemagglutinins from pigs in Italy*. *J Gen Virol*, 1994. **75** ( Pt 2): p. 371-9.
192. Sims, L.D., et al., *Avian influenza in Hong Kong 1997-2002*. *Avian Dis*, 2003. **47**(3 Suppl): p. 832-8.
193. WHO. *Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003 - 2016*. 09.05.2016; Available from: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/EN\\_GIP\\_20160509cumulativenumberH5N1cases.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20160509cumulativenumberH5N1cases.pdf).

194. Alexander, D.J., *A review of avian influenza in different bird species*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 3-13.
195. Brown, J.D., et al., *Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(11): p. 1663-70.
196. Brown, J.D., D.E. Stallknecht, and D.E. Swayne, *Experimental infections of herring gulls (*Larus argentatus*) with H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses by intranasal inoculation of virus and ingestion of virus-infected chicken meat*. Avian Pathol, 2008. **37**(4): p. 393-7.
197. Keawcharoen, J., et al., *Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(4): p. 600-7.
198. Munster, V.J. and R.A. Fouchier, *Avian influenza virus: of virus and bird ecology*. Vaccine, 2009. **27**(45): p. 6340-4.
199. Claas, E.C., et al., *Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus*. Lancet, 1998. **351**(9101): p. 472-7.
200. Subbarao, K., et al., *Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness*. Science, 1998. **279**(5349): p. 393-6.
201. de Jong, M.D., et al., *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1203-7.
202. Nidom, C.A., et al., *Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(10): p. 1515-23.
203. Taubenberger, J.K., et al., *Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes*. Nature, 2005. **437**(7060): p. 889-93.
204. Vana, G. and K.M. Westover, *Origin of the 1918 Spanish influenza virus: a comparative genomic analysis*. Mol Phylogenet Evol, 2008. **47**(3): p. 1100-10.
205. Kawaoka, Y., S. Krauss, and R.G. Webster, *Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics*. J Virol, 1989. **63**(11): p. 4603-8.
206. Scholtissek, C., et al., *On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2*. Virology, 1978. **87**(1): p. 13-20.
207. Newman, A.P., et al., *Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(9): p. 1470-2.

208. Shinde, V., et al., *Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2616-25.
209. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
210. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
211. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1249-55.
212. Le Bon, A., et al., *Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 461-70.
213. Gack, M.U., et al., *Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(5): p. 439-49.
214. Guo, Z., et al., *NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(3): p. 263-9.
215. Ludwig, S. and T. Wolff, *Influenza A virus TRIMs the type I interferon response*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(5): p. 420-1.
216. Talon, J., et al., *Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 7989-96.
217. Wang, X., et al., *Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11566-73.
218. Wolff, T. and S. Ludwig, *Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(9): p. 549-57.
219. Hatada, E., S. Saito, and R. Fukuda, *Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2425-33.
220. Lu, Y., et al., *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, 1995. **214**(1): p. 222-8.
221. Min, J.Y. and R.M. Krug, *The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo*

- (A) synthetase/RNase L pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7100-5.
222. Tan, S.L. and M.G. Katze, *Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(9): p. 757-66.
  223. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
  224. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
  225. Seo, Y.J. and B. Hahm, *Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses*. Adv Appl Microbiol, 2010. **73**: p. 83-101.
  226. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 69-77.
  227. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 63-8.
  228. Sommereyns, C., et al., *IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000017.
  229. Mordstein, M., et al., *Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses*. PLoS Pathog, 2008. **4**(9): p. e1000151.
  230. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
  231. Hoffmann, E., et al., *A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 6108-13.
  232. Bussey, K.A., et al., *PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4395-406.
  233. Chen, G.W., et al., *Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(9): p. 1353-60.
  234. Chen, H., et al., *Polygenic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice*. Virus Res, 2007. **128**(1-2): p. 159-63.

235. Hatta, M., et al., *Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses*. Science, 2001. **293**(5536): p. 1840-2.
236. Hatta, M., et al., *Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice*. PLoS Pathog, 2007. **3**(10): p. 1374-9.
237. Hudjetz, B. and G. Gabriel, *Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin-alpha1 and -alpha7*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002488.
238. Kuzuhara, T., et al., *Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 6855-60.
239. Labadie, K., et al., *Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells*. Virology, 2007. **362**(2): p. 271-82.
240. Li, J., et al., *Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2*. Virus Res, 2009. **144**(1-2): p. 123-9.
241. Mase, M., et al., *Recent H5N1 avian influenza A virus increases rapidly in virulence to mice after a single passage in mice*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 12): p. 3655-9.
242. Mehle, A. and J.A. Doudna, *An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(2): p. 111-22.
243. Naffakh, N., et al., *Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 5): p. 1283-91.
244. Naffakh, N., et al., *Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 403-24.
245. Salomon, R., et al., *The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 689-97.
246. Shinya, K., et al., *PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice*. Virology, 2004. **320**(2): p. 258-66.
247. Shinya, K., et al., *Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 547-53.

248. Subbarao, E.K., W. London, and B.R. Murphy, *A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 1761-4.
249. Boivin, S. and D.J. Hart, *Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin alpha isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10439-48.
250. Czudai-Matwich, V., et al., *PB2 mutations D701N and S714R promote adaptation of an influenza H5N1 virus to a mammalian host*. J Virol, 2014. **88**(16): p. 8735-42.
251. Gabriel, G., et al., *The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18590-5.
252. Gabriel, G., A. Herwig, and H.D. Klenk, *Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e11.
253. Gabriel, G., et al., *Differential use of importin-alpha isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 156.
254. Le, Q.M., et al., *Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5278-81.
255. Li, Z., et al., *Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12058-64.
256. Bender, C., et al., *Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998*. Virology, 1999. **254**(1): p. 115-23.
257. Lycett, S.J., et al., *Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 9901-10.
258. Matrosovich, M., et al., *The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1146-55.
259. Li, C., et al., *Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11880-8.
260. Octaviani, C.P., H. Goto, and Y. Kawaoka, *Reassortment between seasonal H1N1 and pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses is restricted by limited compatibility among polymerase subunits*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 8449-52.

261. Rudneva, I.A., et al., *Influenza A virus reassortants with surface glycoprotein genes of the avian parent viruses: effects of HA and NA gene combinations on virus aggregation*. Arch Virol, 1993. **133**(3-4): p. 437-50.
262. Rudneva, I.A., et al., *Phenotypic expression of HA-NA combinations in human-avian influenza A virus reassortants*. Arch Virol, 1996. **141**(6): p. 1091-9.
263. Wanitchang, A., et al., *Atypical characteristics of nucleoprotein of pandemic influenza virus H1N1 and their roles in reassortment restriction*. Arch Virol, 2011. **156**(6): p. 1031-40.
264. Essere, B., et al., *Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(40): p. E3840-8.
265. Fournier, E., et al., *A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(5): p. 2197-209.
266. Fujii, K., et al., *Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3766-3774.
267. Fujii, Y., et al., *Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2002-7.
268. Gavazzi, C., et al., *An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(2): p. 1241-54.
269. Gerber, M., et al., *Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment*. Trends Microbiol, 2014. **22**(8): p. 446-55.
270. Gog, J.R., et al., *Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): p. 1897-907.
271. Hutchinson, E.C., et al., *Genome packaging in influenza A virus*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 313-28.
272. Marsh, G.A., R. Hatami, and P. Palese, *Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9727-36.
273. Marsh, G.A., et al., *Highly conserved regions of influenza a virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2295-304.

274. Noda, T., et al., *Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 490-2.
275. Watanabe, T., et al., *Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10575-83.
276. Jackson, S., et al., *Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8131-40.
277. Octaviani, C.P., et al., *High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses*. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10918-22.
278. Hatta, M., et al., *Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine*. Virology, 2002. **295**(2): p. 250-255.
279. Maines, T.R., et al., *Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12121-6.
280. Chen, L.M., et al., *Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5): p. e1000072.
281. Li, C., et al., *Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4687-4692.
282. Li, O.T., et al., *Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5658.
283. Lam, W.Y., K.L. Ngai, and P.K. Chan, *Polymerase activity of hybrid ribonucleoprotein complexes generated from reassortment between 2009 pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza A viruses*. Virol J, 2011. **8**: p. 528.
284. Ngai, K.L., M.C. Chan, and P.K. Chan, *Replication and transcription activities of ribonucleoprotein complexes reconstituted from avian H5N1, H1N1pdm09 and H3N2 influenza A viruses*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65038.
285. Zhang, Y., et al., *H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet*. Science, 2013. **340**(6139): p. 1459-63.
286. Xu, C., et al., *Amino acids 473V and 598P of PB1 from an avian-origin influenza A virus contribute to polymerase activity, especially in mammalian cells*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 531-40.

287. Mazur, I., et al., *The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein.* Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1140-52.
288. Zhou, B., et al., *PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice.* J Virol, 2011. **85**(1): p. 357-65.
289. Mok, C.K., et al., *Amino acid residues 253 and 591 of the PB2 protein of avian influenza virus A H9N2 contribute to mammalian pathogenesis.* J Virol, 2011. **85**(18): p. 9641-5.
290. Mehle, A. and J.A. Doudna, *Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21312-6.
291. Massin, P., S. van der Werf, and N. Naffakh, *Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses.* J Virol, 2001. **75**(11): p. 5398-404.
292. Mehle, A., et al., *Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase PA subunit overcome species barriers.* J Virol, 2012. **86**(3): p. 1750-7.
293. Gabriel, G., et al., *Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus.* J Virol, 2007. **81**(17): p. 9601-4.
294. Sun, Y., et al., *High genetic compatibility and increased pathogenicity of reassortants derived from avian H9N2 and pandemic H1N1/2009 influenza viruses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(10): p. 4164-4169.
295. Sun, H., et al., *The infection of turkeys and chickens by reassortants derived from pandemic H1N1 2009 and avian H9N2 influenza viruses.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 10130.
296. Hara, K., et al., *Co-incorporation of the PB2 and PA polymerase subunits from human H3N2 influenza virus is a critical determinant of the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes.* J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 11): p. 2406-16.
297. Zeldovich, K.B., et al., *Positive Selection Drives Preferred Segment Combinations during Influenza Virus Reassortment.* Mol Biol Evol, 2015. **32**(6): p. 1519-32.
298. Dlugolenski, D., et al., *Swine Influenza Virus PA and Neuraminidase Gene Reassortment into Human H1N1 Influenza Virus Is Associated with an Altered Pathogenic Phenotype Linked to Increased MIP-2 Expression.* J Virol, 2015. **89**(10): p. 5651-67.

299. Tao, H., et al., *Influenza A Virus Coinfection through Transmission Can Support High Levels of Reassortment*. J Virol, 2015. **89**(16): p. 8453-61.
300. Clements, M.L., et al., *Evaluation of avian-human reassortant influenza A/Washington/897/80 x A/Pintail/119/79 virus in monkeys and adult volunteers*. J Clin Microbiol, 1986. **24**(1): p. 47-51.
301. Clements, M.L., et al., *Use of single-gene reassortant viruses to study the role of avian influenza A virus genes in attenuation of wild-type human influenza A virus for squirrel monkeys and adult human volunteers*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(3): p. 655-62.
302. Scholtissek, C., et al., *Correlation of pathogenicity and gene constellation of an influenza A virus (fowl plague). I. Exchange of a single gene*. Virology, 1977. **81**(1): p. 74-80.
303. Scholtissek, C., et al., *Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1781-6.
304. Snyder, M.H., et al., *The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys*. J Virol, 1987. **61**(9): p. 2857-2863.
305. Tian, S.F., et al., *Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract*. J Virol, 1985. **53**(3): p. 771-775.
306. Marshall, N., et al., *Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003421.
307. Suzuki, Y., *A phylogenetic approach to detecting reassortments in viruses with segmented genomes*. Gene, 2010. **464**(1-2): p. 11-6.
308. Karasin, A.I., et al., *Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 1073-1079.
309. Karasin, A.I., C.W. Olsen, and G.A. Anderson, *Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2453-2456.
310. Lekcharoensuk, P., et al., *Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(5): p. 787-794.
311. Ma, W., et al., *Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 5092-5096.

312. Ma, W., et al., *Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States*. *Virus Genes*, 2010. **40**(1): p. 28-36.
313. Webby, R.J., et al., *Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States*. *J Virol*, 2000. **74**(18): p. 8243-8251.
314. Biere, B., NRZ Influenza, Robert Koch-Institut, personal communication, Juni 2015.
315. Dürrwald, R., IDT Biologika, personal communication, Mai 2015.
316. Jagger, B.W., et al., *An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response*. *Science*, 2012. **337**(6091): p. 199-204.
317. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
318. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
319. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
320. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. *J Exp Med*, 2003. **198**(3): p. 513-20.
321. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1143**: p. 1-20.
322. Baum, A. and A. Garcia-Sastre, *Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates*. *Amino Acids*, 2010. **38**(5): p. 1283-99.
323. Seth, R.B., L. Sun, and Z.J. Chen, *Antiviral innate immunity pathways*. *Cell Res*, 2006. **16**(2): p. 141-7.
324. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
325. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
326. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. *Science*, 2006. **314**(5801): p. 994-7.

327. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p. 981-8.
328. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. *Science*, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
329. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 669-82.
330. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. *Mol Cell*, 2005. **19**(6): p. 727-40.
331. Garcia-Sastre, A. and C.A. Biron, *Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente*. *Science*, 2006. **312**(5775): p. 879-82.
332. Sadler, A.J. and B.R. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 559-68.
333. Ocaña-Macchi, M., et al., *Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells*. *J Virol*, 2009. **83**(24): p. 12947-12955.
334. Chan, M.C., et al., *Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells*. *Respir Res*, 2005. **6**: p. 135.
335. Cheung, C.Y., et al., *Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?* *Lancet*, 2002. **360**(9348): p. 1831-7.
336. Zeng, H., et al., *Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12439-12449.
337. Seo, S.H., E. Hoffmann, and R.G. Webster, *Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses*. *Nat Med*, 2002. **8**(9): p. 950-4.
338. Silversides, D.W., et al., *Investigation of the species origin of the St. Jude Porcine Lung Epithelial Cell Line (SJPL) made available to researchers*. *J Virol*, 2010. **84**(10): p. 5454-5455.
339. Szretter, K.J., et al., *Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice*. *J Virol*, 2009. **83**(11): p. 5825-5834.
340. Jiao, P., et al., *A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice*. *J Virol*, 2008. **82**(3): p. 1146-54.

341. Twu, K.Y., et al., *The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 8112-21.
342. Golebiewski, L., et al., *The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions*. J Virol, 2011. **85**(20): p. 10639-48.
343. Jackson, D., et al., *A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4381-6.
344. Liu, H., et al., *The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble*. J Virol, 2010. **84**(21): p. 11164-74.
345. Thomas, M., et al., *Analysis of the PDZ binding specificities of Influenza A virus NS1 proteins*. Virol J, 2011. **8**: p. 25.
346. WHO, *Pandemic Influenza Risk Management - WHO Interim Guidance*, 2013.
347. Apisarnthanarak, A., et al., *Seroprevalence of anti-H5 antibody among Thai health care workers after exposure to avian influenza (H5N1) in a tertiary care center*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2005. **40**(2): p. e16-18.
348. Cavailler, P., et al., *Seroprevalence of anti-H5 antibody in rural Cambodia, 2007*. Journal of Clinical Virology, 2010. **48**(2): p. 123-126.
349. Dejpicchai, R., et al., *Seroprevalence of antibodies to avian influenza virus A (H5N1) among residents of villages with human cases, Thailand, 2005*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 756-760.
350. Gomaa, M.R., et al., *Avian influenza A(H5N1) and A(H9N2) seroprevalence and risk factors for infection among egyptians: A prospective, controlled seroepidemiological study*. Journal of Infectious Diseases, 2015. **211**(9): p. 1399-1407.
351. Huo, X., et al., *Seroprevalence of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers in Jiangsu Province, China: An observational study*. BMC Infect Dis, 2012. **12**.
352. Krumbholz, A., et al., *Prevalence of antibodies to swine influenza viruses in humans with occupational exposure to pigs, Thuringia, Germany, 2008-2009*. J Med Virol, 2010. **82**(9): p. 1617-1625.
353. Nguyen, T.L., et al., *Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 210-215.

354. Ortiz, J.R., et al., *Lack of evidence of avian-to-human transmission of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers, Kano, Nigeria, 2006*. Journal of Infectious Diseases, 2007. **196**(11): p. 1685-1691.
355. Santhia, K., et al., *Avian influenza A H5N1 infections in Bali province, Indonesia: A behavioral, virological and seroepidemiological study*. Influenza Other Respir Viruses, 2009. **3**(3): p. 81-89.
356. Toner, E.S., et al., *Assessment of serosurveys for H5N1*. Clinical Infectious Diseases, 2013. **56**(9): p. 1206-1212.
357. Uyeki, T.M., et al., *Seroprevalence of antibodies to Avian influenza A (H5) and A (H9) viruses among market poultry workers, Hanoi, Vietnam, 2001*. PLoS One, 2012. **7**(8).
358. Yang, P., et al., *Avian influenza A(H7N9) and (H5N1) infections among poultry and swine workers and the general population in Beijing, China, 2013-2015*. Sci Rep, 2016. **6**.
359. Yang, P., et al., *A Serological Survey of Antibodies to H5, H7 and H9 Avian Influenza Viruses amongst the Duck-Related Workers in Beijing, China*. PLoS One, 2012. **7**(11).
360. Katz, J.M., et al., *Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10807-10.
361. Lee, M.S., et al., *Characterization of an H5N1 avian influenza virus from Taiwan*. Vet Microbiol, 2007. **124**(3-4): p. 193-201.
362. Yamada, S., et al., *Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001034.
363. Subbarao, K. and M.W. Shaw, *Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans*. Rev Med Virol, 2000. **10**(5): p. 337-48.
364. Otte, A., *Charakterisierung der Pathogenität und Transmissibilität von 2009 pandemischen H1N1 Influenza A Viren in Kleintiermodellen, in Fachbereich Biologie in der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften 2013*, Universität Hamburg: Hamburg. p. 160.
365. Long, J.X., et al., *Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene*. Virus Genes, 2008. **36**(3): p. 471-8.
366. Hrinčius, E.R., et al., *A single point mutation (Y89F) within the non-structural protein 1 of influenza A viruses limits epithelial cell tropism and virulence in mice*. Am J Pathol, 2012. **180**(6): p. 2361-74.
367. Obenauer, J.C., et al., *Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates*. Science, 2006. **311**(5767): p. 1576-80.

368. Manz, B., et al., *Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 802.

# Anhang

## i. Analyse der Parentalviren hinsichtlich bekannter Wirtsdeterminanten und Virulenzfaktoren

In der Fachliteratur sind eine Reihe von Wirtsdeterminanten und Virulenzfaktoren für Influenza A-Viren beschrieben, die einen Einfluss auf die Polymeraseaktivität, die Virusreplikation in vitro und in vivo, die Pathogenität, die Immunantwort der infizierten Zelle sowie die Wirtsspezifität des Virus haben. Da in der vorliegenden Arbeit Austausche der Genomsegmente vorgenommen wurden, sind viele der bekannten Virulenzfaktoren hinsichtlich des Vorhandenseins des Merkmals im Genom der Parentalviren analysiert worden (Tabelle 38).

**Tabelle 38: bekannte Virulenzfaktoren/ Polymorphismen und Existenz des Merkmals in den Parentalviren**

Protein	Merkmal	Folge des Merkmals	Merkmal vorhanden (Aminosäure)			Referenz
			A/NSA/58/07	A/NewCaledonia/20/99	A/whooperswan/R65/06	
PB1	PB1-F2 (Protein)	<p>ein Verlust der PB1-F2-Expression bleibt ohne Auswirkung auf die Polymeraseaktivität und die Virusreplikation in Zellkultur;                      ohne PB1-F2 kommt es in Mäusen zu verminderter Pathogenität und früherer Virus-clearance; die Expression von PB1-F2 erhöht die Pathogenität in Mäusen;                      PB1-F2 moduliert die frühe Immunantwort des Wirtes: PB1-F2-Expression steigert angeborene Immunantwort und führt zu erhöhter IFN-beta Expression;</p> <p>Expression des PB1-F2 führt zu Zerstörung des mitochondrialen Membran-Potentials und induziert vermutlich auf diese Weise (in lymphozytären Zellen) Apoptose</p>	ja	nein	ja	[20, 49-54, 57]

<b>PB1</b>	<b>PB1-F2, N66S</b>	steigert Virusreplikation und erhöht die Pathogenität; Verzögerung der angeborenen Immunantwort; erhöhte Cytokinexpression in Mäusen	<b>nein (N)</b>	-	<b>nein (N)</b>	<b>[55, 56]</b>
<b>PB1</b>	<b>PB1-N40 (Protein)</b>	Auswirkungen sind von der Anwesenheit des PB1-F2-Proteins abhängig:  in vitro (Säugerzellen): -ohne PB1-N40 (mit PB1-F2): Polymeraseaktivität verringert -ohne PB1-N40 (ohne PB1-F2): Polymeraseaktivität stärker verringert; -ohne PB1-N40 (unabhängig von PB1-F2) ist Virusreplikation etwas reduziert; -gesteigerte PB1-N40-Expression (ohne PB1-F2) führt zu eingeschränkter Virusreplikation  in vivo: -ohne PB1-N40 (mit PB1-F2): Pathogenität wie WT -ohne PB1-N40 (ohne PB1-F2): etwas verringerte Pathogenität	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>[30, 57]</b>
<b>PB1</b>	<b>L13P</b>	kann erhöhend oder vermindern auf die Polymeraseaktivität in Säugerzellen wirken	<b>ja (P)</b>	<b>ja (P)</b>	<b>ja (P)</b>	<b>[201, 251]</b>
<b>PB1</b>	<b>V171M</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (M)</b>	<b>ja (M)</b>	<b>ja (M)</b>	<b>[234]</b>
<b>PB1</b>	<b>R198K</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (K)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>[234, 360, 361]</b>
<b>PB1</b>	<b>MV317I</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>nein (V)</b>	<b>nein (M)</b>	<b>nein (M)</b>	<b>[234, 257, 360]</b>
<b>PB1</b>	<b>L473V</b>	kompensiert fehlendes PB2-627K bezüglich der Polymeraseaktivität und Virusreplikation in Säugerzellen	<b>ja (V)</b>	<b>nein (L)</b>	<b>ja (V)</b>	<b>[286]</b>
<b>PB1</b>	<b>L598P</b>	kompensiert fehlendes PB2-627K bezüglich der Polymeraseaktivität in Säugerzellen	<b>nein (L)</b>	<b>nein (L)</b>	<b>nein (L)</b>	<b>[286]</b>
<b>PB1</b>	<b>S678N</b>	kann erhöhend oder vermindern auf die Polymeraseaktivität in Säugerzellen wirken	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>[251]</b>
<b>PB2</b>	<b>L89V</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virulez in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (G309D, T339K, R477G, I495V, A676T) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (V)</b>	<b>ja (V)</b>	<b>ja (V)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>E158G</b>	steigert Polymeraseaktivität in humanem Zellen	<b>nein (E)</b>	<b>nein (E)</b>	<b>nein (E)</b>	<b>[288]</b>
<b>PB2</b>	<b>S199A</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (A)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>ja (A)</b>	<b>[234]</b>

<b>PB2</b>	<b>D253N</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen	<b>nein (D)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>[259, 289]</b>
<b>PB2</b>	<b>(T)271A</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen	<b>- (I)</b>	<b>ja (A)</b>	<b>nein (T)</b>	<b>[232]</b>
<b>PB2</b>	<b>G309D</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virulez in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (L89V, T339K, R477G, I495V, A676T) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (D)</b>	<b>ja (D)</b>	<b>ja (D)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>R318K</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>nein (R)</b>	<b>nein (R)</b>	<b>nein (R)</b>	<b>[234, 257]</b>
<b>PB2</b>	<b>T333I</b>	verminderte Polymeraseaktivität in Säugerzellen	<b>nein (T)</b>	<b>nein (T)</b>	<b>nein (T)</b>	<b>[251]</b>
<b>PB2</b>	<b>T339K</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virulez in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (L89V, G309D, R477G, I495V, A676T) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (K)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>nein (T)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>RQ355K</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>nein (R)</b>	<b>- (T)</b>	<b>nein (R)</b>	<b>[234, 257, 360]</b>
<b>PB2</b>	<b>R477G</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virulez in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (L89V, G309D, T339K, I495V, A676T) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (G)</b>	<b>ja (G)</b>	<b>ja (G)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>I495V</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virulez in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (L89V, G309D, T339K, R477G, A676T) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (V)</b>	<b>ja (V)</b>	<b>ja (V)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>Q508R</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (R)</b>	<b>ja (R)</b>	<b>ja (R)</b>	<b>[234]</b>
<b>PB2</b>	<b>G590S</b>	steigert in Verbindung mit Q591R (bei vorhandener 627E) die Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen	<b>nein (G)</b>	<b>nein (G)</b>	<b>nein (G)</b>	<b>[290]</b>
<b>PB2</b>	<b>Q591KR oder andere basische AS</b>	steigert allein oder in Verbindung mit G590S (bei vorhandener 627E) die Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Virusreplikation aviärer H5N1-Viren in humanen Zellen und erhöhte Virulez aviärer H5N1 in Mäusen; kann die Abwesenheit von 627K kompensieren	<b>nein (Q)</b>	<b>nein (Q)</b>	<b>nein (Q)</b>	<b>[289, 290, 362]</b>

<b>PB2</b>	<b>E627K</b>	E: vorwiegend bei aviären Isolaten K: vorwiegend bei humanen Isolaten; steigert Polymeraseaktivität in Säugerzellen aufgrund erhöhter Bindung von PB2 an NP (im vRNP) und RNA; steigert Replikation in Säugerzellen (z.B. Maus) und Säugern (Mäuse, Totenkopffäffchen); erhöhte Pathogenität in Säugern (Mäusen); beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; somit an Adaptation von Viren an Säuger beteiligt	<b>nein (E)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>[232-248]</b>
<b>PB2</b>	<b>I675L</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (L)</b>	<b>ja (L)</b>	<b>ja (L)</b>	<b>[234]</b>
<b>PB2</b>	<b>A676T</b>	steigert Polymeraseaktivität und Virusreplikation in humanen Zellen; erhöhte Pathogenität in Mäusen; kann in Verbindung mit weiteren Mutationen (L89V, G309D, T339K, R477G, I495V) das Fehlen von 627K kompensieren	<b>ja (T)</b>	<b>ja (T)</b>	<b>ja (T)</b>	<b>[240]</b>
<b>PB2</b>	<b>A683T</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (T)</b>	<b>ja (T)</b>	<b>ja (T)</b>	<b>[234]</b>
<b>PB2</b>	<b>D701N</b>	steigert Polymeraseaktivität und Replikation in Säugerzellen; Steigerung der Pathogenität in Mäusen; kann wirtsspezifisch die Abwesenheit von 627K z.T. kompensieren; beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; steigert nukleären PB2-Import in Säugerzellen (nicht jedoch in aviären Zellen); somit an Adaptation aviärer Viren an Säuger beteiligt	<b>ja (N)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>[242, 249-255]</b>
<b>PB2</b>	<b>R702K</b>	beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; somit an Adaptation aviärer Viren an Säuger beteiligt	<b>ja (K)</b>	<b>nein (R)</b>	<b>ja (K)</b>	<b>[249]</b>
<b>PB2</b>	<b>S714I</b>	steigert Polymeraseaktivität in Säugerzellen; in Verbindung mit D701N Steigerung der Replikation in Säugerzellen	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>[250]</b>
<b>PB2</b>	<b>S714R</b>	steigert Polymeraseaktivität in Säugerzellen; in Verbindung mit D701N Steigerung der Replikation in Säugerzellen und der Pathogenität in Mäusen; beeinflusst PB2-Bindung an nukleäre Importrezeptoren; somit an Adaptation aviärer Viren an Säuger beteiligt	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>[249-251]</b>
<b>PA</b>	<b>PA-X (Protein)</b>	PA-X unterdrückt die zelluläre Genexpression und ist am host-cell shut-off beteiligt; ohne PA-X: in infizierten Zellen werden Gene für die Immunreaktion früher und stärker aktiviert; dies führt zu einer starken Immunantwort und Apoptose und somit einer höheren Pathogenität; mit PA-X: Reduktion der Pathogenität	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>[316]</b>
<b>PA</b>	<b>V127I</b>	erhöhte Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern	<b>nein (V)</b>	<b>nein (V)</b>	<b>nein (V)</b>	<b>[257, 363]</b>

<b>PA</b>	<b>L336M</b>	erhöhte Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern	<b>nein (L)</b>	<b>nein (L)</b>	<b>nein (L)</b>	<b>[257, 363]</b>
<b>PA</b>	<b>T552S</b>	für aviäre Polymerasen gilt: erhöhte Polymeraseaktivität, Virusreplikation (A549-Zellen), Pathogenität in Mäusen	<b>nein (T)</b>	<b>ja (S)</b>	<b>nein (T)</b>	<b>[292]</b>
<b>PA</b>	<b>K615NR</b>	möglicherweise erhöhte Pathogenität in Säugern	<b>nein (K)</b>	<b>ja (R)</b>	<b>nein (K)</b>	<b>[251]</b>
<b>NP</b>	<b>V100I</b> (basierend auf H1-Nummerierung)	erhöhte Pathogenität in Mäusen	<b>- (R)</b>	<b>nein (V)</b>	<b>- (R)</b>	<b>[364]</b>
<b>NP</b>	<b>I133L</b> (basierend auf H1-Nummerierung)	erhöhte Pathogenität in Mäusen	<b>ja (L)</b>	<b>ja (L)</b>	<b>ja (L)</b>	<b>[364]</b>
<b>NP</b>	<b>(N)319K</b>	steigert Polymeraseaktivität in Säugerzellen; in Verbindung mit PA-615R steigert es die Pathogenität in Mäusen; erhöht den nuklären Import von NP in Säugerzellen	<b>nein (N)</b>	<b>nein (N)</b>	<b>nein (N)</b>	<b>[251-253, 293]</b>
<b>NP</b>	<b>I373T</b> (basierend auf H1-Nummerierung)	erhöhte Pathogenität in Mäusen	<b>ja (T)</b>	<b>nein (A)</b>	<b>nein (A)</b>	<b>[364]</b>
<b>HA</b>	<b>E190D</b> (basierend auf H3-Nummerierung)	Verantwortlich für Rezeptorspezifität (alpha-2,3 oder 2,6) in H1-Viren: E: Präferenz für aviären Rezeptor (alpha-2,3) D: erhöht alpha-2,6 Bindung in H1; Präferenz für humanen Rezeptor (alpha-2,6)  E190D vermindert alpha-2,3 und -2,6 Bindung in H5-Viren	<b>ja (D)</b>	<b>- (N)</b>	<b>nein (E)</b>	<b>[171-175]</b>
<b>HA</b>	<b>S220T</b> (basierend auf panH1-Nummerierung)	erhöhte Pathogenität in Mäusen (in H1-Viren)	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>ja (T)</b>	<b>[364]</b>

<b>HA</b>	<b>K222L</b> (basierend auf H3-Nummerierung)	deutliche Verringerung der alpha-2,3 Bindung (in H1); keine alpha-2,6 Bindung	<b>- (E)</b>	<b>nein (K)</b>	<b>nein (K)</b>	<b>[172]</b>
<b>HA</b>	<b>G225D(E)</b> (basierend auf H3-Nummerierung)	Verantwortlich für Rezeptorspezifität (alpha-2,3 oder 2,6) in H1-Viren: G: erhöht alpha-2,3 Bindung in H1; Präferenz für aviären Rezeptor (alpha-2,3) D(E): vermindert alpha-2,3 Bindung in H1; erhöht alpha-2,6 Bindung in H1; Präferenz für humanen Rezeptor (alpha-2,6)  G225D vermindert in Kombination mit E190D alpha-2,3 und -2,6 Bindung in H5-Viren	<b>- (R)</b>	<b>ja (D)</b>	<b>nein (G)</b>	<b>[171-174, 176]</b>
<b>HA</b>	<b>monobasische HA0-Spaltstelle</b>	Spaltung des HA0 (HA-Reifung) nur durch spez. Proteasen, die nur im Respirationstrakt vorkommen: Proteasen Clara und Mini-Plasmin, Serinproteasen TMPRSS2 und HAT; Spaltung erfolgt nach Virion-Freisetzung aus Zelle, also extrazellulär; folglich Einfluss auf Pathogenität, da Ausbreitung der Infektion auf Respirationstrakt beschränkt	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>[61-64]</b>
<b>HA</b>	<b>multibasische HA0-Spaltstelle</b>	Spaltung des HA0 (HA-Reifung) durch intrazelluläre Proteasen: Furin (in Golgi-Vesikeln), weitere subtilisinähnliche Proteasen wie PC6 (ubiquitär in vielen Gewebstypen); Spaltung erfolgt bereits intrazellulär (durch häufig in Geweben vorkommende Proteasen); folglich Einfluss auf Pathogenität, da systemische Ausbreitung der Infektion möglich (hohe Pathogenität mgl.)	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>[64-68]</b>
<b>NA</b>	<b>allgemein</b>	Neuraminidasen unterscheiden auch zwischen a2,3- und a2,6-verknüpften Sialinsäuren: -aviäre NAs: spalten sehr stark bevorzugt a2,3-verknüpfte Sialinsäuren; kaum a2,6-verknüpfte Sialinsäuren -porcine NAs: spalten zwar bevorzugt a2,3-verknüpfte Sialinsäuren; aber auch a2,6-verknüpfte Sialinsäuren -humane NAs: spalten leicht bevorzugt a2,3-SAs, aber auch a2,6-verknüpfte Sialinsäuren	<b>porcines NA</b>	<b>humanes NA</b>	<b>aviäres NA</b>	<b>[80-83]</b>
<b>NA</b>	<b>T29I</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (I)</b>	<b>ja (I)</b>	<b>- (M)</b>	<b>[234]</b>
<b>NA</b>	<b>K39Q</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (Q)</b>	<b>ja (Q)</b>	<b>ja (Q)</b>	<b>[234]</b>

<b>NA</b>	<b>Deletion in NA-Stiel-region</b>	Deletion in NA-Stielregion vermindert Fähigkeit den Sialinsäurerezeptor zu spalten; dies führt u.a. zu verminderter Freisetzung neugebildeter Viruspartikel von der Wirtszelloberfläche; Deletion in NA-Stielregion bei H5N1-Isolaten aus Menschen häufig; mit erhöhter Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern assoziiert	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>ja (49-68)</b>	<b>[256-258]</b>
<b>NA</b>	<b>T223I</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (I)</b>	<b>ja (I)</b>	<b>ja (I)</b>	<b>[234, 360, 361]</b>
<b>M1</b>	<b>VT15I</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (I)</b>	<b>nein (V)</b>	<b>ja (I)</b>	<b>[234, 360, 361]</b>
<b>M2</b>	<b>P64S</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (S)</b>	<b>ja (S)</b>	<b>ja (S)</b>	<b>[234]</b>
<b>M2</b>	<b>L69P</b>	in Verbindung mit weiteren Mutationen mit erhöhter Pathogenität von H5N1 in Mäusen assoziiert	<b>ja (P)</b>	<b>ja (P)</b>	<b>ja (P)</b>	<b>[234]</b>
<b>NS1</b>	<b>P42S</b>	erhöhte Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern; wirkt Interferoninduktion in Wirtszellen entgegen	<b>ja (S)</b>	<b>ja (S)</b>	<b>ja (S)</b>	<b>[257, 340]</b>
<b>NS1</b>	<b>Deletion AS80-84</b>	erhöhte Replikation und Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>[365]</b>
<b>NS1</b>	<b>Y89F</b>	verminderter Tropismus für tracheale und bronchiale Epithelzellen; verminderte Virulenz in Mäusen	<b>nein (Y)</b>	<b>nein (Y)</b>	<b>nein (Y)</b>	<b>[366]</b>
<b>NS1</b>	<b>D92E</b>	erhöhte Pathogenität in Säugern	<b>nein (D)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>nein (D)</b>	<b>[257, 337]</b>
<b>NS1</b>	<b>103F + 106M</b>	ermöglicht Bindung von HPAIV H5N1 NS1 an CPSF30; resultiert in verminderter IFN- $\beta$ -Transkription	<b>ja (F+M)</b>	<b>ja (F+M)</b>	<b>ja (F+M)</b>	<b>[341]</b>
<b>NS1</b>	<b>S228P</b>	erhöhte Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern	<b>ja (P)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>[257, 343, 367]</b>

<b>NS1</b>	<b>'ESEV' PDZ Domäne im C-terminus</b>	Störung von Protein-Protein-Interaktionen (z.B. bei IFN-vermittelten Signalwegen); Reduktion von Apoptose	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>[342-345]</b>
<b>NS2 (NEP)</b>	<b>S7L</b>	kompensiert fehlendes PB2-627K; steigert Polymeraseaktivität aviärer Polymerasen in humanen Zellen	<b>n.a.</b>	<b>nein (S)</b>	<b>nein (S)</b>	<b>[368]</b>
<b>NS2 (NEP)</b>	<b>Y41C</b>	kompensiert fehlendes PB2-627K; steigert Polymeraseaktivität aviärer Polymerasen in humanen Zellen	<b>nein (Y)</b>	<b>nein (Y)</b>	<b>nein (Y)</b>	<b>[368]</b>
<b>NS2 (NEP)</b>	<b>E75G</b>	kompensiert fehlendes PB2-627K; steigert Polymeraseaktivität aviärer Polymerasen in humanen Zellen	<b>nein (E)</b>	<b>nein (E)</b>	<b>nein (E)</b>	<b>[368]</b>

## **Danksagung**

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Tagungsbeiträge

- 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 05.-08.03.2008, Heidelberg: Poster
- Third European Influenza Conference, 14.-17.09.2008, Vilamoura (Portugal): Poster
- 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 18.-21.03.2009, Leipzig: Poster
- RKI Diplomanden und Doktorandentreffen, 11.09.2009, Berlin: Poster
- RKI Diplomanden und Doktorandentreffen, 26.11.2010, Berlin: Poster
- 21. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 23.-26.03.2011, Freiburg: Poster
- RKI Diplomanden und Doktorandentreffen, 25-26.11.2011, Wernigerode: Präsentation
- 22. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 14.-17.03.2012, Essen: Poster

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Potsdam, den

---

Christian Holdack